4'-Chloro-5-methoxy-3-biphenylacetic Acid (DKA-9) のヒトおよび
各種動物における代謝に関する研究¹⁾

杉山 信, 立脇信清, 杉本剛敏, 奥山義男, 中川 隆
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 Human and Various Animal Species¹⁾

MAKOTO SUGIYAMA, NOBUKIYO TATEWAKI, TAKETOSHI SUGIMOTO,
YOSHIO OKUYAMA and TAKASHI NAKAGAWA
Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.²⁾

(Received August 5, 1977)

The metabolic fate and species difference of 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetic acid (DKA-9), a newly developed anti-inflammatory drug, were studied in human and various animal species (mouse, guinea pig, rabbit, beagle dog, rhesus monkey) by intravenous, intraperitoneal, or oral administration of DKA-9. It was found that men, mice, guinea pigs, and rabbits excreted DKA-9 and its metabolites mainly in urine and the dog mainly in feces (78.8, 75.3, 77.3, 88.7 and 79.1% of the dose, respectively) and there was prolongation of urinary excretion in guinea pigs and rabbits.

The detection and fractionation of metabolites in urine and bile were performed by the combination of solvent extraction, enzymic and chemical hydrolysis, and thin-layer chromatography, and nine metabolites were detected. The structures of metabolites fractionated were investigated from spectral analysis data and identified to be 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetic acid, 5-carboxymethyl-4'-chloro-3-biphenyl hydrogen sulfate (mainly in mice, guinea pigs, and monkeys), 2-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl)-2-hydroxyacetic acid (mainly in dogs), 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetyl β -D-glucopyranosiduronic acid (mainly in men), 5-carboxymethyl-4'-chloro-3-biphenyl β -D-glucopyranosiduronic acid (mainly in rabbits), and 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetyl β -D-glucopyranosiduronic acid. A metabolite which may be hydroxylated at the 4- or 6-position of DKA-9, its sulfate, and its glucuronide were also detected in mouse and dog urine but not identified yet.

Though there are considerable species difference of the metabolic pattern in urine, the main metabolite in the bile was 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetyl β -D-glucopyranosiduronic acid, common to all species.

Keywords—metabolism; anti-inflammatory drug; mass spectrometry; species differences; identification; derivatization; infrared spectra

DKA-9 は吉本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⁾ 前報⁵⁾ において DKA-9 のラットにおける代謝と代謝物の抗炎症作用について検討した。その結果尿中には 5-carboxymethyl-4'-chloro-3-biphenyl hydrogen sulfate (DKA-24S) が, 胆汁中には 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl acetyl β -D-glucopyranosiduronic acid (DKA-9G) が主代謝物として同定された。また代謝物の抗炎症作用についてラットカラゲニン浮腫抑制作用を指標として検討した結果抗炎症作用は認められず DKA-9 が薬効発揮の本体であることを明らかにした。本報ではヒトおよび各種動物における代謝の種差を明らかにする目的で検討を行

1) 日本薬学会第 96 年会で発表, 名古屋, 1976 年 4 月。

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

3) Y. Tamura, Y. Yoshimoto, K. Kunitomo, 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) 杉山 信, 奥山義男, 吉本吉彦, 薬誌, **98**, 31 (1978).

なったので報告する。

実 験 の 部

試験化合物 DKA-9,³⁾ ¹⁴C-DKA-9 (カルボキシル基の炭素に標識した, 32 μ Ci/mg),⁵⁾ 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenyl acetic acid (DKA-24),³⁾ N-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl acetyl)glycine (DKA-9 gly.),⁵⁾ 2-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl)-2-hydroxyacetic acid (α -OHDKA-9),⁵⁾ 5-carboxymethyl-4'-chloro-3-biphenyl β -D-glucopyranosiduronic acid (DKA-24OG),⁵⁾ DKA-24S,⁵⁾ methylated-acetylated DKA-9G,⁵⁾ および methyl 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl acetate (DKA-9M)⁵⁾ および methyl 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetate (DKA-24M)⁵⁾ の9種類を用いた。

実験動物 雄性の ddy 系マウス (30—35 g), Hartley 系モルモット (0.5—1.0 kg), 日本家兎 (2.7—3.5 kg), 赤毛ザル (5.3 kg) およびビーグル犬 (9.5—11.5 kg) を使用した。なおヒトについては健康な成人男子 (39 才, 体重 68 kg) のボランティアについて投与実験を行なった。

投与方法および投与量 1) ¹⁴C-DKA-9⁵⁾ の投与——¹⁴C-DKA-9 を Na 塩として少量の水に溶解後, 生理食塩水を加えて投与液を調製した。マウス, 家兎, 犬では一夜絶食後 12.5 mg/kg (32 μ Ci, 3.7 μ Ci, 138 μ Ci) の DKA-9 を静脈内に, モルモットには 12.5 mg/kg (32 μ Ci) を腹腔内に投与し, 経時的に尿と糞を採取した。また家兎, 犬, モルモットはペントバルビタール麻酔下で胆のうを結紮して総胆管カニューレーションを行ない, ¹⁴C-DKA-9 12.5 mg/kg (3.7 μ Ci, 2.5 μ Ci, 32 μ Ci) を静脈内投与後経時的に胆汁を採取した。

2) DKA-9 の投与 一夜絶食後のサルに DKA-9 12.5 mg/kg を静脈内に, ヒトには DKA-9 100 mg をカプセルに充填して経口的にそれぞれ投与し, 経時的に尿を採取した。なお代謝物の単離精製を行なう場合はマウス, 家兎および犬に 12.5 mg/kg の DKA-9 を静脈内投与し 24 時間までの尿を採取した。

放射活性 (¹⁴C) の測定 前報⁵⁾ に準じた。ただし糞中の ¹⁴C の測定において犬では水を加えて均質化後に乾燥してマウス, モルモット, 家兎ではそのまま乾燥して粉碎後その一部を取り燃焼法⁶⁾ により ¹⁴C を測定した。

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: CHCl₃·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: CHCl₃·acetone·AcOH (5:12:5, v/v), solv. 5: CHCl₃·MeOH benzene·28% ammonia 水 (8:6:5:1, v/v), solv. 6: benzene·EtOH·40% dimethylamine (3:10:2, v/v), solv. 7: acetone·ether·AcOH (16:3:1, 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。

代謝物の検索 DKA-9 投与尿 (24 時間), 胆汁 (6 時間) について凍結乾燥, 酵素処理 [β -glucuronidase (東京臓器化学製), arylsulfatase (Sigma 社 type H-2 型), pH 5.5, 37°, 24 時間], アルカリ分解 pH 13, 50° 2 時間, 溶媒抽出を行なった。得られた試料について TLC を行ない代謝物を検索した。

代謝物の単離同定 1) 犬の尿中代謝物——24 時間尿を凍結乾燥したのち, 残渣に少量の水を加えて溶解した。不溶物を除去したのち HCl を加えて pH 1 に調整後 2 倍量の benzene で 3 回抽出を行なった。抽出後の尿は pH 5.5 に調整し β -glucuronidase 処理後 benzene で同様に抽出を行なった。それぞれの benzene 層は減圧下で濃縮後, preparative TLC (solv. 1, solv. 2, solv. 5 を用いて展開後 MeOH で溶出) を行なった。酵素処理前の benzene 抽出物から α -OHDKA-9 を得, benzene-hexane で再結晶を行ない mp 98—100° の無色砂状結晶を得た。また酵素処理後の benzene 抽出物から未知代謝物 (M₉)⁷⁾ のアグリコンである M₈ をアメ状物質として得た。

2) 家兎の尿中代謝物——24 時間尿を HCl で pH 1 に調整後 3 倍量の AcOEt で 2 回抽出を行ない AcOEt 層を減圧下で濃縮した。濃縮物について preparative TLC (solv. 6 を用いて展開後 MeOH で溶出) を行ない M₆ を得, N, O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) を加えて trimethylsilyl (TMS) 化して, GC-MS 計測定試料とした。

3) ヒトの尿中代謝物——4 時間尿を酸性にした後 2 倍量の benzene を加え 3 回抽出を行ない減圧下有機溶媒を濃縮後 BSA を加え TMS 化して GC-MS 計測定試料とした。別に抱合体を単離するため 12 時間までの尿について HCl を加えて pH 1 に調整後, 3 倍量の AcOEt で 2 回抽出し, AcOEt 層を減圧濃縮後 preparative TLC (solv. 4, solv. 7) を行ない DKA-9G, M₆ および M₇ をそれぞれ無色アメ状物質として単離した。DKA-9G は前報⁵⁾ に準じて methyl-acetyl 化後 MS 測定を行ない, M₇ は methyl-acetyl 化および diazoethane を用いて ethyl-acetyl 化後 MS 測定を行なった。M₆ は家兎と同様の分離操作を行ない TMS 化後 GC-MS 測定を行なった。また DKA-24S は前報⁵⁾ に準じて投与尿を XAD-2 樹脂処理後 preparative TLC (solv. 7, MeOH で溶出) を行なって無色粉末状結晶を得, 標品とともに TLC を行なった。

代謝物の定量 1) 尿中代謝物——¹⁴C-DKA-9 投与尿 (24 時間) を採取して一定容積に希釈後, 一定量をシ

6) 井上 祥, 杉山 信, 立脇信清, 安藤富仁, 森野 昭, 奥山義男, 医薬品研究, 6, 260 (1975)。

7) 未知代謝物の仮称は前報⁵⁾ よりの通し番号とした。

リカゲルプレートにスポットして solv. 1 で展開した。各代謝物に相当する部位 (DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 および M_8) のシリカゲルを削りとり, MeOH 1 ml に分散したのち液体シンチレーションカウンタ (LSC, 堀場 LC 500) により ^{14}C を測定した。次に硫酸抱合体を定量するために, 尿を pH 1 に調整後 2 倍量の AcOEt で 3 回抽出⁸⁾ を行ない減圧下濃縮後一定量をシリカゲルプレートにスポットして展開し DKA-24 および M_8 部位を削りとり ^{14}C を測定した。さらに glucuronide を定量するため, 尿を pH 5.5 に調整し酵素処理を行なったのち HCl で pH 1 に調整して 2 倍量の AcOEt で 3 回抽出した。AcOEt 層を減圧下濃縮後一定量をシリカゲルプレートにスポットして展開し, DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 および M_8 部位を削りとり ^{14}C を測定した。各代謝物の排泄率は各代謝物に相当する部位の ^{14}C とスポットした ^{14}C の比を求め, 尿中総排泄率を乗じて算出した。また抱合体の排泄量は処理尿と未処理尿の差として求めた。なお各代謝物 (DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 および M_8) は solv. 2 および solv. 3 で展開した場合も単一ピークを示した。⁵⁾ ヒトおよびサルについては微量の α -OHDKA-9 を除いて排泄される代謝物が DKA-9, DKA-24 の抱合体であることに着目し, 各抱合体の安定性の差を利用してガスクロマトグラフ法⁹⁾ によって定量を行なった。

2) 胆汁中代謝物——前報⁵⁾ に準じて行なった。

赤外線吸収 (IR) およびマススペクトル 前報⁵⁾ に準じて測定を行なった。

実験結果

尿中, 糞中排泄率

ヒトおよび各動物における DKA-9 投与後の DKA-9 および代謝物の総排泄率を Table I に示した。なおヒトおよびサルの尿中排泄率は DKA-9 および代謝物を定量して得た値の総和で, 他動物種は総放射活性を測定した値で示した。その結果, サルは 24 時間, ヒトおよびマウスはラット⁵⁾ 同様 48 時間で排泄が終了するのに対し, 犬は 120 時間, モルモット, 家兎は 144 時間を要し排泄の持続する傾向を認めた。またヒト, マウス, モルモットおよび家兎ではラット⁵⁾ 同様に投与した DKA-9 および代謝物が主に尿中に排泄されるのに対して犬では糞中に排泄され排泄経路に種差の存在することが判明した。

胆汁中排泄率

各動物における DKA-9 投与後 6 時間までの DKA-9 および代謝物の胆汁排泄率を Table II に示した。排泄率は犬, ラット,⁵⁾ モルモット, 家兎の順で減少した。

尿中代謝物の検索

マウス, モルモット, 家兎, 犬に ^{14}C -DKA-9 を投与して得られた 24 時間尿についてつぎの各条件で処理後, TLC を行なった結果を Fig. 1 に示した。なお条件 (1) は凍結乾燥尿, (2) は硫酸抱合体が加水分解される条件^{5,8)} の下での AcOEt 抽出物, (3) は β -グルクロニダーゼ処理後の AcOEt 抽出物でグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体が加水分解される条件である。

TABLE I. Urinary and Fecal Excretion of DKA-9 and Its Metabolites in Human and Various Animal Species after Intravenous(*i.v.*), Oral(*p.o.*) and Intraperitoneal(*i.p.*) Administration of DKA-9

Species	Dose (mg/kg)	% of dose administered			Route of administration
		Urine (24 hr)	Urine (hr)	Feces (hr)	
Mouse	12.5	63.5	75.3(48)	13.1(48)	<i>i.v.</i>
Guinea pig	12.5	15.7	77.3(144)	9.4(144)	<i>i.p.</i>
Rabbit	12.5	27.2	88.7(144)	0.7(144)	<i>i.v.</i>
Dog	12.5	11.2	13.6(120)	79.1(120)	<i>i.v.</i>
Monkey	12.5	31.0	31.0(24)	—	<i>i.v.</i>
Human	1.5	74.5	78.8(48)	—	<i>p.o.</i>
Rat ^{a)}	12.5	77.0	81.5(48)	8.5(48)	<i>i.v.</i>

a) Results in the previous report (ref. 5).

8) pH 1, 45 分振盪 AcOEt 抽出によって尿中の放射活性はほぼ 100% 抽出され, DKA-24S および M_{10} が加水分解されて DKA-24, M_8 を定量的に生ずることが判明している。

9) M. Sugiyama, A. Morino, S. Izumi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 「投稿中」。

マウス (1) から DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 の存在が僅かに認められたほか ^{14}C は原点に集中し (2), (3) の DKA-24 ピークの ^{14}C がほぼ等しいことよりラットと同様そのほとんどが DKA-24S であることが判明した. (2), (3) で認められる DKA-9 と DKA-24 の間の小さなピークは犬でも認められる代謝物 (M_8) で (2), (3) の M_8 ピークの ^{14}C がほぼ等しいことより, その硫酸抱合体 (M_{10}) の存在が示唆された.

モルモット (1) より DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 の存在が認められ, (2) より DKA-24S, (3) から DKA-24 glucuronide の存在がそれぞれ示唆された. DKA-24 glucuronide に関しては構造上エーテル型 (DKA-24OG) とエステル型 (DKA-24G) の 2 種が考えられる. そこで前報⁵⁾ に準じて (2) の原点部分の ^{14}C についてアルカリ分解を行なったが DKA-24 は生成せず, solv. 3 で TLC を行なっても DKA-24M の生成を認めなかった. したがってこれらの結果よりモルモット尿中に存在する DKA-24 glucuronide は DKA-24OG であることが判明した.

TABLE II. Biliary Excretion of DKA-9 and Its Metabolites in Various Animal Species after Intravenous Administration of DKA-9 (6hr)

Species	% of administered dose
Guinea pig	10.9
Rabbit	9.7
Dog	53.8
Rat ^{a)}	35.4

a) Results in the previous report (ref. 5).

Fig. 1. Thin-Layer Radiochromatograms of Various Animal Urine after Intravenous or Intraperitoneal Administration of ^{14}C -DKA-9 (12.5mg/kg, 24 hr)

(1) urine. (2) ethyl acetate extract of urine. (3) ethyl acetate extract of urine treated with β -glucuronidase (solv. 1). a; DKA-9, b; DKA-24, c; α -OHDKA-9, d; DKA-24S.

Fig. 2. Thin-Layer Chromatograms of Benzene (BE) and Ethyl Acetate Extract (EE) of Monkey Urine after Intravenous Administration of 12.5 mg/kg of DKA-9 (solv. 1)

Fig. 3. Thin-Layer Chromatograms of Benzene (BE) and Ethyl Acetate Extract (EE) of Monkey Urine after Intravenous Administration of 12.5 mg/kg DKA-9 (solv. 3)

家兎 (1) より DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 の存在が認められ, (2) と (1) の DKA-24 ピークの ^{14}C の比較から微量の DKA-24 S の存在が推定された. (3) において DKA-9, DKA-24 ピークの ^{14}C が増加することより, DKA-9 G, DKA-24 glucuronide の存在が明らかになり, DKA-24 glucuronide は DKA-24OG であることがアルカリ分解および TLC の結果判明した.

犬 (1) より DKA-9, α -OHDKA-9 および M_8 の存在を認め, (2) より DKA-24S, (3) より M_8 のグルクロン酸抱合体 (M_9) および DKA-24 glucuronide の存在が明らかとなった. DKA-24 glucuronide については排泄量が微量 (0.64% of dose) でエーテル型かエステル型かの判別は行なえなかった.

サル 24 時間尿の benzene, AcOEt 抽出物について solv. 1 および 3 で TLC を行ない, UV ランプ照射によりクロマトグラムを作成し Fig. 2, Fig. 3, に示した. Fig. 2 において benzene 抽出でブランク尿との対比より DKA-9, DKA-24 の存在が認められたが, α -OHDKA-9, DKA-9 gly. は認められなかった. 一方 AcOEt 抽出ではブランク尿との対比より DKA-24 の存在が認められ, 遊離の DKA-24 は 3 回の benzene 抽出では完全に抽出されることより DKA-24 S のアグリコンと考えられる. また原点部分にかなり強い UV 吸収を示す物質の存在することが認められ, 極性の高い代謝物の存在を示唆した. Fig. 3 は solv. 3 で TLC を行なったクロマトグラムで benzene 抽出では Fig. 2 と同じ傾向を示したが, AcOEt 抽出では DKA-9M, DKA-24M, DKA-9 および DKA-24 の存在が認められ, 前報⁵⁾ の知見より DKA-9G および DKA-24 G の存在が示唆された. そこで AcOEt 抽出の原点部分 (Fig. 2) を EtOH で抽出し, β -glucuronidase を作用させて TLC を行なったところ DKA-9, DKA-24 の生成を確認した. なお DKA-24 OG の存在については確認し得なかった.

ヒト 24 時間尿についてサルと同様の検索を行ない DKA-9, DKA-24, DKA-24 S, DKA-9 G および DKA-24 G の存在を認めた. また微量の代謝物を検索するため, benzene 抽出物を TMS 化して GC-MS 計で検索し, 微量の α -OHDKA-9 の存在を確認した.

胆汁中代謝物の検索

各動物の ^{14}C -DKA-9 投与胆汁について各条件で処理し, TLC を行なった結果を Fig. 4 に示した.

家兎 Fig. 4 の (1) より DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 および原点付近に放射活性の存在が認められ, (2) (3) より原点付近の放射活性のほとんどが DKA-9 G に起因するものであることが判明した.

モルモット (1) より DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 および原点付近に放射活性の存在が認められた. ま

Fig. 4. Thin-Layer Radiochromatograms of Animal Bile after Intravenous Administration of ^{14}C -DKA-9 (12.5 mg/kg, 6 hr)

(1) bile. (2) ethyl acetate extract of bile. (3) ethyl acetate extract of bile hydrolyzed with alkali (solv. 1). a; DKA-9, b; DKA-24, c; α -OHDKA-9, d; DKA-24S.

Fig. 5. Mass Spectra and Infrared Spectra (in CHCl_3) of α -OHDKA-9 and M_3

た (2) において DKA-24 が (1) に比較して増加していることおよび (3) と比較した場合ほぼ等しいことから DKA-24 S の存在が推定された。一方 (3) より (2) で原点部位に存在する放射活性の殆どが DKA-9 G であることが判明した。

犬 家兎と全く同様な結果を示した。

代謝物の構造

1) 犬の尿中代謝物 犬の 24 時間尿を benzene 抽出して α -OHDKA-9 と M_3 を得た。 α -OHDKA-9 は Fig. 5 に示すように合成標品と IR, マススペクトルとも完全に一致したが旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -94.0^\circ$ (EtOH) であった。また M_3 のマススペクトルは Fig. 6 に示したように M^+ は DKA-9 (M^+ 276) に比べ 16 質量数多く、水酸化されていることが示唆された。しかしマススペクトルが α -OHDKA-9 とははっきりと異なることからベンゼン核に水酸化を受けた化合物であることが判明した。また DKA-9, DKA-24 のマススペクトルではフラグメントイオン ($M-45$) $^+$ が強いピークとして観察されるに対し M_3 では ($M-18$) $^+$, ($M-46$) $^+$ に強いピークが認められた。この事実は hydroxyphenylacetic acid¹⁰⁾ のオルト, メタ, パラの各異性体のマススペクトルにおいてオ

Fig. 6. Mass Spectrum of M_3

Fig. 7. Gas Chromatograms and Mass Spectra of DKA-24OG and M_6 (as trimethylsilylated form)

10) E. Stenhagen, S. Abrahamsson, F.W. McLafferty (eds.), "Registry of Mass Spectral Data," Vol. I, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1974, p. 408.

Fig. 8. Gas Chromatogram of Benzene Extract from Urine and Mass Spectra of M_0 (peak A), M_1 (peak B), M_3 (peak C), DKA-9, DKA-24, and α -OHDKA-9 (as trimethylsilylated form)

Column temperature 105 (14 min)-250° 2°/min.

Fig. 9. Mass Spectra of Methylated-acetylated M_7 (m, a- M_7) and Ethylated-acetylated M_7 (e, a- M_7)

ルト体のみが $(M-18)^+$, $(M-46)^+$ に強い相対強度のピークを与えるのに対してメタ, パラ体では $(M-45)^+$ に強い相対強度のピークを与えることと符合し, この代謝物は酢酸基のオルト位 (2 位または 6 位) に水酸化を受けた化合物 (DKA-9 H) であると推定した. またマウスについても AcOEt 抽出により M_6 を得て, 犬と同一のマススペクトルが得られたことよりその硫酸抱合体と推定した.

2) 家兎の尿中代謝物 家兎の AcOEt 抽出物から M_6 を得, TMS 化したのち GC-MS 計で測定したところ Fig. 7 に示すように合成標品 DKA-24 OG の TMS 体と t_R およびマススペクトルが完全に一致し M_6 を DKA-24OG と同定した.

3) ヒトの尿中代謝物 投与尿の benzene 抽出物を TMS 化後 GC-MS 計で測定したところ, Fig. 8 に示すように DKA-9, DKA-24, α -OHDKA-9 が認められ標品と比較したところ t_R およびマススペクトルが一致した. DKA-9G については単離精製物を methyl-acetyl 化後マススペクトルを測定したところ合成標品 methylated-acetylated DKA-9G⁵⁾ と一致した. M_7 は methyl-acetyl 化を行なうと DKA-9G の場合と同一のマススペクトルを与えることを利用して, methyl-acetyl 化と ethyl-acetyl 化を行なってマススペクトルを測定したところ Fig. 9 に示すように methyl-acetyl 化では合成標品 methylated-acetylated DKA-9G⁵⁾ と一致し, ethyl-acetyl 化では DKA-9G の methyl-acetyl 化体より 28 質量数多い M^+ を示した. また TLC の結果, solv. 7 で合成標品 DKA-24OG と R_f 値が異なり, フェノール性水酸基に特異的な, Pauly 試薬に対して陽性を示した. 以上の結果 M_7 を DKA-24G と同定した. M_6 は TMS 化後 GC-MS を測定し, 合成標品 DKA-24 OG の TMS 化体と t_R , マススペクトルとも一致した. DKA-24 S は合成標品と 4 種 (solv. 2, 3, 4, 6) の溶媒で TLC を行

TABLE III. Urinary Excretion of DKA-9 and Its Metabolites in Human and Various Animal Species after Intravenous, Oral and Intraperitoneal Administration of DKA-9 (24 hr)

Species	DKA-9	DKA-24	DKA-24S	α -OHDKA-9	DKA-9G	DKA-9 gly.
Mouse	0.3%	$\cong 0\%$	55.9%	0.5%	$\cong 0\%$	$\cong 0\%$
Guinea pig	0.4	1.6	7.3	2.9	$\cong 0$	$\cong 0$
Rabbit	1.0	0.8	2.3	0.5	6.3	$\cong 0$
Dog	0.3	$\cong 0$	2.7	5.0	$\cong 0$	$\cong 0$
Monkey	2.5	1.7	12.6	$\cong 0$	5.7	$\cong 0$
Human	1.7	0.3	9.2	>0.1	54.2	$\cong 0$
Rat ^{a)}	1.2	1.8	72.4	0.5	$\cong 0$	>0.1

Species	DKA-24OG	DKA-24G	DKA-9H	DKA-9HG	DKA-9HS	Total	Unknown
Mouse	$\cong 0\%$	$\cong 0\%$	$\cong 0\%$	$\cong 0\%$	5.5%	62.2%	1.3%
Guinea pig	1.9	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	14.1	1.6
Rabbit	13.2	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	24.1	3.1
Dog		(0.6)	0.4	1.3	$\cong 0$	10.3	0.9
Monkey		(8.5)	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	31.0	—
Human	2.2	6.9	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	74.5	—
Rat ^{a)}	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	75.9	1.1

Values represent % of dose.

a) Results in previous report (ref. 5).

TABLE IV. Biliary Excretion of DKA-9 and Its Metabolites in Various Animal Species after Intravenous Administration of DKA-9 (6 hr)

Species	DKA-9	DKA-24	DKA-24S	α -OHDKA-9	DKA-9G	Total	Unknown
Guinea pig	2.6%	1.6%	0.6%	1.3%	3.5%	9.6%	1.3%
Rabbit	0.9	0.2	$\cong 0$	0.2	8.3	9.6	$\cong 0$
Dog	0.4	$\cong 0$	0.6	0.3	49.3	50.6	3.2
Rat ^{a)}	0.9	0.2	4.2	0.2	28.1	33.4	1.8

Values represent % of dose.

a) Results in previous report (ref. 5).

なった結果いずれの溶媒においても R_f 値が一致した。

尿中代謝物の定量

投与後 24 時間までにヒトおよび各動物尿中に排泄される代謝物について定量を行ない Table III に示した。その結果マウス、モルモットおよびサルでは DKA-24 S, 家兎では DKA-24 OG, 犬では α -OHDKA-9, ヒトでは DKA-9G がそれぞれ主代謝物であることが判明した。

胆汁中代謝物の定量

投与後 6 時間までに各動物胆汁中に排泄される代謝物について定量を行ない Table IV に示した。その結果、いずれの動物種についても排泄率に差は存するものの主代謝物は DKA-9 G であることが判明した。

したがっていずれの種についても投与された DKA-9 が肝臓でグルクロン酸抱合を受けるか、脱メチル化されたのち抱合を受ける経路で代謝が進行し、肝臓（胆汁）および腎臓（尿）より排泄されることが判明した。

考 察

前報⁵⁾ につづき本報では DKA-9 の代謝の種差についてヒトおよび数種の動物種を用いて検討を行なった。

¹⁴C-DKA-9 を投与した場合の排泄量に関してはいずれも最終総排泄量が投与量のほぼ 90%を示し、¹⁴C の体

内への残留はないものと考えられる. DKA-9 を用いたヒトでの検討においても投与後 48 時間で尿中に約 80% が排泄されることから同様の結論が得られるものとする.

代謝物の検索, 同定において前報⁵⁾ で検出した代謝物に加えてさらに 5 種類の代謝物を同定あるいは推定した. α -OHDKA-9 は前報⁵⁾ では合成標品 (*dl* 体) とのマススペクトルの比較によって同定を行なったが, 本報ではさらに IR, MS 測定によって同定を行なうとともに旋光度を測定し 1 体であることを確認した. DKA-9 H についてはマススペクトルおよび hydroxyphenylacetic acid の各異性体のマススペクトルよりその構造を推定したが, 一般に代謝物の水酸化は電子密度の高い位置に生起すると考えられている.¹¹⁻¹³⁾ したがって DKA-9 の場合, 量子化学的に 4 位の電子密度が最も高く, 水酸化を受けやすいことが示唆され, 上述の推定を支持している. DKA-9 HS については DKA-24 S で得られた知見に基づいてその存在を推定した. なお DKA-9HG についてはエステル型とエーテル型の存在が考えられるがその構造は不明である. ヒトについては, DKA-9 および 6 種の代謝物を同定した. DKA-24 G については合成標品が得られなかったので methylated-acetylated DKA-9G を用いて M_r の methyl 化と ethyl 化の差より同定を行なうことを試み目的を達した.

Chart 1. Possible Metabolic Pathways of DKA-9 in Human and Various Animal Species

11) V. Ullrich, "Biological Hydroxylation Mechanism," Academic Press Inc., New York, 1972, pp. 11—19.

12) 吉村英敏, "月刊薬事," 10, 359 (1968).

13) 渡部 烈, "化学と薬学の教室," 13, 88 (1966).

種差に関しては排泄経路および代謝物組成ともヒトおよび各種動物でかなりの差が認められた。排泄経路は犬のみ糞中排泄が大で胆汁排泄量を反映しているが、同様な傾向がインドメサチン,¹⁴⁾ ナプロキセン,¹⁵⁾ アルクロフェナック¹⁶⁾ などにおいても報告されている。一方尿中排泄の大なる他種動物(ヒトを含めて)において、排泄速度に種差が認められ家兎、モルモットでは排泄が持続する傾向が認められた。しかし両種とも胆汁排泄量は少なく再吸収の寄与は小さいことが考えられ、DKA-9の排泄量が少ないことより、DKA-9の蛋白結合等による代謝遅延の結果によるものと考えられる。代謝物組成の種差は尿中代謝物に多く認められ、主として尿中に代謝物を排泄する種ではいずれもDKA-9, DKA-24の抱合体が主代謝物であるが、犬では α -OHDKA-9が主代謝物として排泄された。一方胆汁中代謝物については、いずれもDKA-9Gが大半を占め、この物質が胆汁中に排泄されやすいことを示しているが家兎でDKA-24 OGが全く排泄されないこと、ヒトにおいてDKA-9Gが主に尿中に排泄されること¹⁷⁾等必ずしもWilliams¹⁸⁾の考えに合致しない現象が認められた。なお糞中代謝物については犬のみについて検討し、ラット⁵⁾と同様DKA-9が大半を占めることを認め、DKA-9Gが消化管内で加水分解を受けて排泄されることが判明した。その結果、加水分解を受ける部位とその部位以降のDKA-9の吸収性が排泄経路に影響を及ぼしていることが示唆された。

以上DKA-9の代謝の種差について検討した結果Chart 1に示すように脱メチル化、水酸化、抱合を含む経路で代謝が進行し、ヒトは排泄経路は異なるものの代謝物組成、排泄速度などラット、マウス、犬と類似した挙動をとることが判明した。

-
- 14) H.B. Huckler, A. Gzacchei, S.V. Cox, D.A. Brodie, N.H.R. Cantwell, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**, 237 (1966).
  - 15) R. Runkel, H. Chaplin, G. Boost, E. Segre, E. Forchielli, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 703 (1972).
  - 16) 横島徹熹, 南保俊雄, 作本 稔, 潮田浩司, 遠藤信夫, 加藤 脩, 医薬品研究, **5**, 22 (1974).
  - 17) ヒトについてはDKA-9 (100 mg) 投与後6時間までに約20%が胆汁中に排泄され、その大半がDKA-9Gであることを確かめている。
  - 18) R.J. Williams, *Biochem. J.*, **105**, 1296 (1967).