

## 【原著・基礎】

## ラットおよびイヌにおける micafungin の代謝物

金子 勇人・山戸 康弘・寺村有理子・藤原 友一

鈴木 昭・河村 章生・寺川 雅人・加賀山 彰

藤沢薬品工業株式会社薬物動態研究所\*

キャンディン系抗真菌薬である micafungin (MCFG) のラットおよびイヌにおける代謝について検討し、以下の結果を得た。

1.  $^{14}\text{C}$  で標識した MCFG ( $^{14}\text{C}$  MCFG) をラットおよびイヌに静脈内投与後の血漿中では MCFG および M5 が主に検出され、抗真菌活性を有する M1 および M2 はほとんど検出されなかった。尿中では主に M5 が、糞及び胆汁中には主に MCFG が認められた。

2. 肺、肝臓、脾臓および腎臓では、M1 および M2 の比率は血漿に比べて高く、投与後 24 時間の肝臓中では試料中放射能に対し M1 が 26.9%、M2 が 22.8% となり、MCFG の 8.9% より高値を示した。

3. ラットおよびイヌに  $^{14}\text{C}$  MCFG を静脈内投与後の血漿、尿、胆汁および糞をもとに、M1 はカテコール体、M2 はメトキシ体、M3 は開環体および M5 は側鎖の水酸化体と推定された。

**Key words:** micafungin, 代謝物, 構造推定

Micafungin (MCFG) は、藤沢薬品工業株式会社が創製されたキャンディン系抗真菌薬である。本薬は、真菌に特異的な細胞壁の主要な構成成分のひとつである 1,3- $\beta$ -D-glucan の生合成を阻害する新規作用機序を有し、深在性真菌症の主要起因菌であるカンジダ属、アスペルギルス属などに対して優れた抗真菌活性を示した。

MCFG の各種実験動物における体内動態について、これまでに非標識体および  $^{14}\text{C}$  標識体 ( $^{14}\text{C}$  MCFG) を用いて検討が行われた<sup>1,2)</sup>。 $^{14}\text{C}$  MCFG を用いたラットの検討では、静脈内投与後の投与放射能は主に糞中に排泄され、投与後 240 時間までの糞中排泄率は投与放射能の 83.5%、尿中排泄率は 14.4%、尿と糞の合計排泄率は 97.9% であった。

今回、各種実験動物における MCFG の代謝パターンを検討する目的で、ラットおよびイヌにおける生体試料および排泄物中での代謝物比率および代謝物の構造について検討した。

#### I. 材料および方法

##### 1. 被験薬物、代謝物標品および試薬

実験に用いた MCFG は、藤沢薬品工業 (株) において合成された。 $^{14}\text{C}$  MCFG は Amersham 社 (Buckinghamshire, UK) において合成され、比放射能は 1.39 MBq/mg であった。薄層クロマトグラフ (TLC) 法で測定した放射化学的純度は 98.6% 以上、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法で測定した化学的純度は 96.3% であった。

代謝物標品として MCFG のカテコール体 (脱硫酸体)、メトキシ体、開環体および側鎖の水酸化体を藤沢薬品工業 (株) で合成した。

その他の試薬および溶媒はいずれも市販の特級品もしくは HPLC 用溶媒を用いた。

##### 2. 実験動物

生後 7 週齢の SD 系雄性ラット (日本クレア (株)) および生後 7~9 か月齢の雄性ビーグル犬 (LRE, HRP Inc.) を使用した。

##### 3. 薬物の投与

代謝物の構造決定および生体試料および排泄物中の代謝物比率についての検討の目的で、 $^{14}\text{C}$  MCFG を生理食塩水に溶解し、ラットおよびイヌに 1 mg/kg 単回静脈内投与した。

##### 4. 試料の採取

尿には容器への放射能の吸着を防ぐためにメタノールを加えて約 50% メタノールを含む尿試料とし、胆汁には胆汁中で MCFG を安定に保つためにあらかじめ採取容器に 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を適量添加して試料中の pH が 5 から 6 の範囲になるようにした。糞には、適量の水を加えてポリトロン (KINEMATICA) でホモジネートして各ホモジネート試料とした。未変化体あるいは代謝物分析のための血漿には、MCFG の安定化のために 3 倍希釈リン酸水溶液を容積に対して 100 分の 1 加えて血漿試料とした。

尿および糞の採取は、投与後の動物を個別の代謝ケージに収容して行った。ラットの胆汁採取は、総胆管にカニューレを挿入後、ボールマンケージに固定し行った。また、血漿、肺、肝臓、脾臓および腎臓を採取し、組織については適量の水を添加後ポリトロンによりホモジネ

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

ートを作成した。

ラット尿および糞は投与後 0~96 時間に採取されたものを、また胆汁は投与後 0~48 時間に採取されたものをそれぞれの試料として用いた。イヌの場合、尿は投与後 0~120 時間、糞は投与後 0~96 時間に採取されたものを用いた。ラット血漿、肺、肝臓、脾臓および腎臓試料、イヌ血漿試料は投与後 24 時間のものを使用した。

#### 5. 試料の前処理

ラットの血漿、尿および胆汁とイヌの血漿及び尿の前

処理は Dispo SPE C<sub>18</sub> カートリッジを用いた固相抽出法で行った。すなわち、血漿、尿および胆汁試料を 0.05 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で 4~6 倍希釈した後、あらかじめ処理されたカートリッジに注入し、次いで 0.05 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を 4 mL 加えて洗浄した後、メタノール 4 mL で溶出した。溶出液は窒素気流下で乾固させ、残渣を少量のメタノールで溶解して使用した。

糞および組織 (肺、肝臓、脾臓および腎臓) ホモジネートは、その 1 mL を凍結乾燥した後、90% メタノー

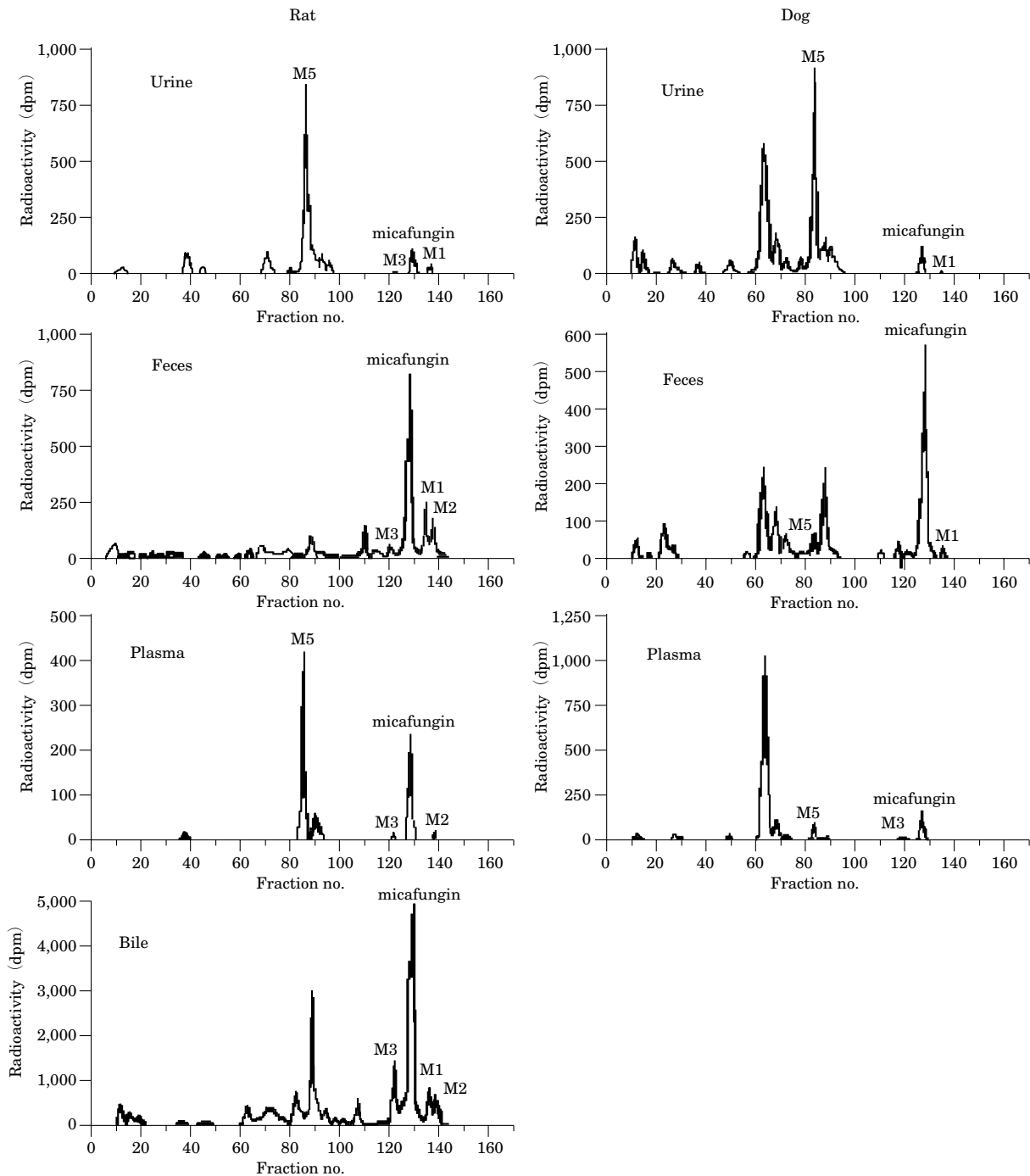


Fig. 1. HPLC-radiochromatograms of metabolites in urine, feces, plasma and bile after intravenous administration of [<sup>14</sup>C] micafungin to rats and dogs.

ルを4 mL加えて振盪を10分間、遠心分離を5分間行い、上清を採取した。次いで、上清を窒素気流下で乾固させ、残渣を同様にメタノールで溶解して使用した。

#### 6. 試料中代謝物の分析

試料中代謝物の分析は、HPLC法およびTLC法により行った。

HPLC法はBeckman System Goldを用い、カラムはTSKgel ODS-80 TM, 5  $\mu$ m (4.6 $\times$ 250 mm, 東ソー)を用い、流速は1.0 mL/minとし、以下の移動相条件を使用した。

(条件) A液: 0.02 mol/Lリン酸塩緩衝液 (pH 3.5), B液: アセトニトリル, 0~10分までB液20%, 10~30分はB液20%からB液45%となる直線グラジエント, 30~45分までB液45%, 45~46分はB液45%からB液80%となる直線グラジエント

TLC法は、TLCプレート(担体: RP-8 F 254 s 0.25 mm; Merck)をアセトン/5%塩化カリウム水溶液/酢酸(3:2:1)で展開した後、イメージングプレート(富士写真フィルム(株))と共に密着させてシールドボックス内で1~3日間露出した。露出後、イメージングプレートをバイオイメージングアナライザー(BAS 2000; 富士写真フィルム(株))により解析した。

#### 7. 質量分析(MS)スペクトル

質量分析にはFinnigan TSQ 7000を用いた。HPLC/エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)法は、カラムにSymmetry C 18 (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm), 移動相にアセトニトリル/0.01 mol/L酢酸アンモニウム(45:55, v/v)を用い、流速0.2 mL/minで行った。

#### 8. 紫外線吸収(UV)スペクトル測定

日立分光光度計557型を用い、スキャン波長200 nm~400 nm, スキャン速度120.0 nm/minで測定した。

## II. 結果

### 1. 排泄物および組織中の代謝物の検索

ラットおよびイヌに $^{14}$ C-MCFGを1 mg/kg静脈内投与した時の血漿, 尿, 胆汁および糞をHPLC法で分析した際のクロマトグラムをFig. 1に示す。投与後24時間のラット血漿を分析した時のMCFG, M1, M2, M3およびM5の試料中比率は, それぞれ7.9, 0.0, 0.4, 0.3および11.9%であった。0~96時間に採取されたラット尿を分析した結果においても主にM5が認められ, その試料中比率は48.8%であった。一方, ラット糞および胆汁中には主にMCFGが認められ, その試料中比率はそれぞれ27.5および26.0%であった。イヌにおいては, 血漿中にはMCFGとM5がほぼ同程度認められ, それぞれ3.3および2.5%であった。また, 尿中では主にM5(22.5%)が, 糞中には主にMCFG(20.0%)が認められた。

ラットに投与後24時間の組織試料をTLC法により分析すると, MCFG, M1およびM2の比率は肺で18.7,

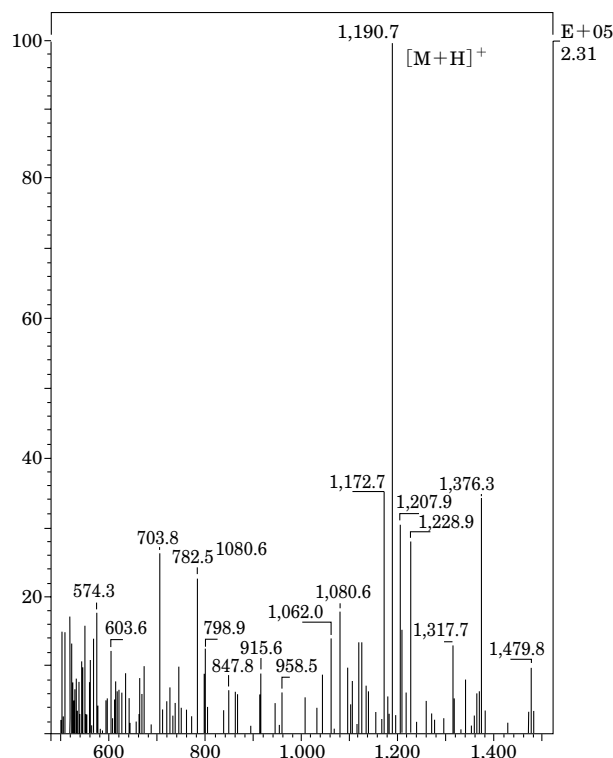


Fig. 2. HPLC/ESI-MS spectrum of M1 (Positive ion mode).

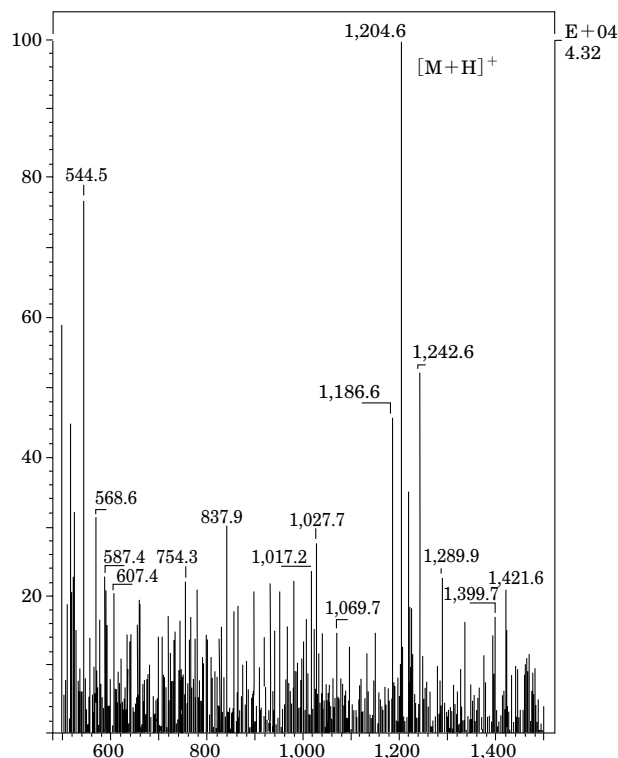


Fig. 3. ESI-MS spectrum of M2 (Positive ion mode).

6.4および33.0%, 肝で8.9, 26.9および22.8%, 脾臓で19.6, 7.5および58.1%, 腎臓で11.7, 10.4および25.4%であった。

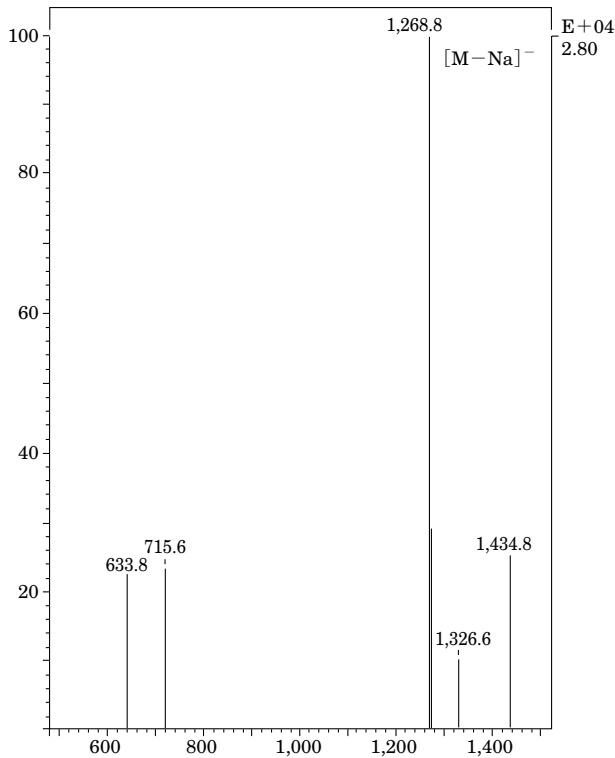


Fig. 4. ESI-MS spectrum of micafungin (Negative ion mode).

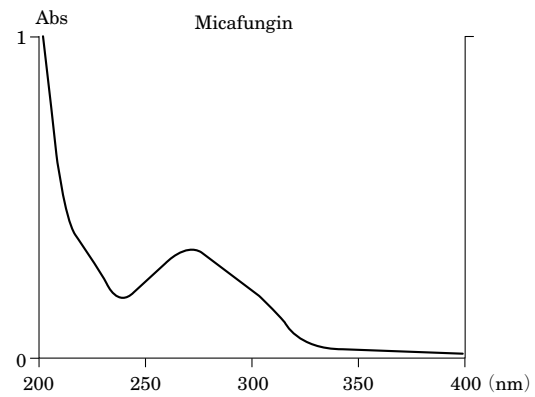
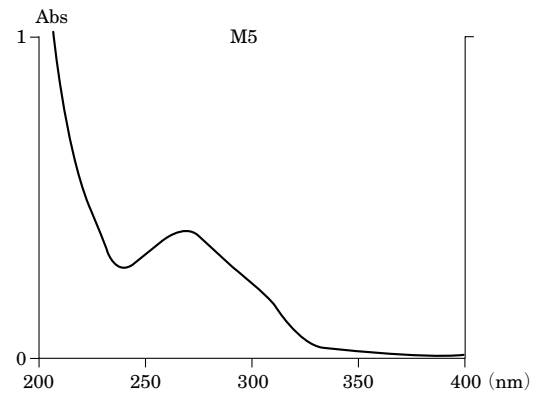


Fig. 6. Ultraviolet spectra of M 5 and micafungin.

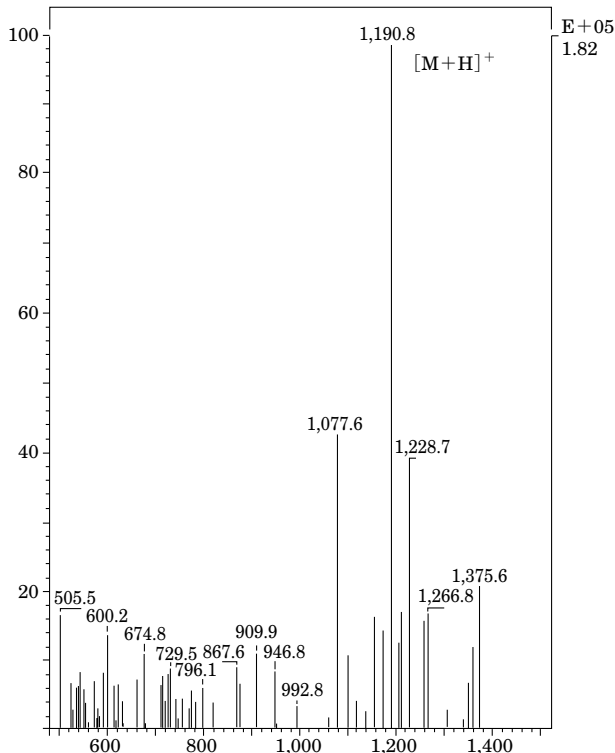


Fig. 5. HPLC/ESI-MS spectrum of catechol form of micafungin (Positive ion mode).

## 2. 代謝物の推定

ラットの肝臓より M 1 および M 2 の構造の推定を行った。ラット肝臓から抽出した M 1 の正イオン検出モ

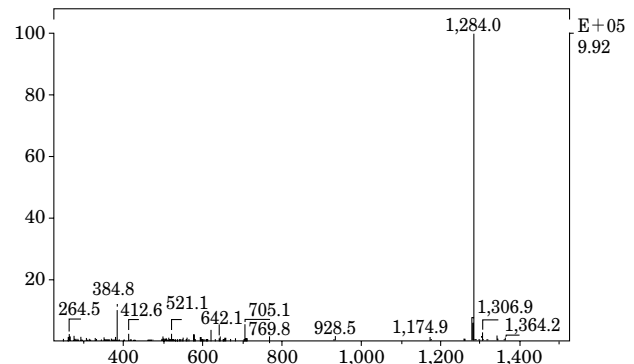


Fig. 7. ESI-MS spectrum of M 5 (Negative ion mode).

ードでの HPLC/ESI-MS スペクトルを Fig. 2 に示す。また、同様にラット肝臓から得た M 2 の正イオン検出モードでの ESI-MS スペクトルを Fig. 3 に示す。MCFG を ESI-MS 法により分析すると、その構造中に硫酸基を有するため、負イオン検出モードで  $[M-Na]^-$  イオンが強いベースピークとして  $m/z$  1,268 に認められた (Fig. 4)。MCFG のカテコール体標品を分析すると、硫酸基がないため負イオン検出モードでは対応するピークが得られず、正イオン検出モードで  $[M+H]^+$  イオンがベースピークとして  $m/z$  1,190 に認められた (Fig. 5)。M 1 の HPLC/ESI-MS スペクトル (Fig. 2) および M 2 の ESI-MS スペクトル (Fig. 3) では、い

いずれもカテコール体標品同様に正イオン検出モードでのみ  $[M+H]^+$  イオンがベースピークとしてそれぞれ  $m/z$  1,190 および 1,204 に認められ, M1 および M2 はともに脱硫酸を受けていることが示唆された。M1 の分子

量は 1,189 であり, カテコール体標品のそれと一致しており, また M2 はその分子量が M1 より 14 大きく, M1 と同様に脱硫酸を受けていることが示唆されることから, M1 がさらにメチル化を受けたものであると考えられた。

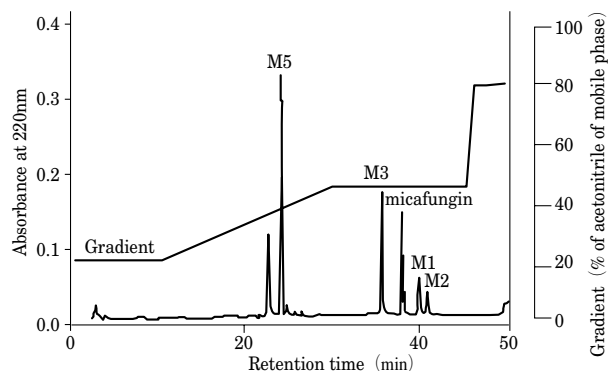


Fig. 8. HPLC-chromatogram of micafungin and its metabolites.

ラット尿より単離された M5 の UV スペクトルは, 270 nm に極大吸収をもつ MCFG と同様のスペクトルを示した (Fig. 6)。このことから, UV 吸収をもつと考えられる芳香環は修飾を受けていないことが推察された。M5 を ESI-MS 法により分析すると, MCFG で得られる分子イオンピーク ( $[M-Na]^+$ )  $m/z$  1,268 (Fig. 4) より, 16 amu 大きい  $m/z$  1,284 の分子イオンピーク ( $[M-Na]^+$ ) が得られ (Fig. 7), 負イオン検出モードで強いベースピークを示したことから硫酸基が保持されていることが示唆された。したがって, M5 は MCFG の側鎖の 1 か所に水酸化を受けていると考えられた。

代謝物 M1, M2, M3 および M5 の合成標品のクロマトグラムを Fig. 8 に示す。ラットおよびイヌ血漿,

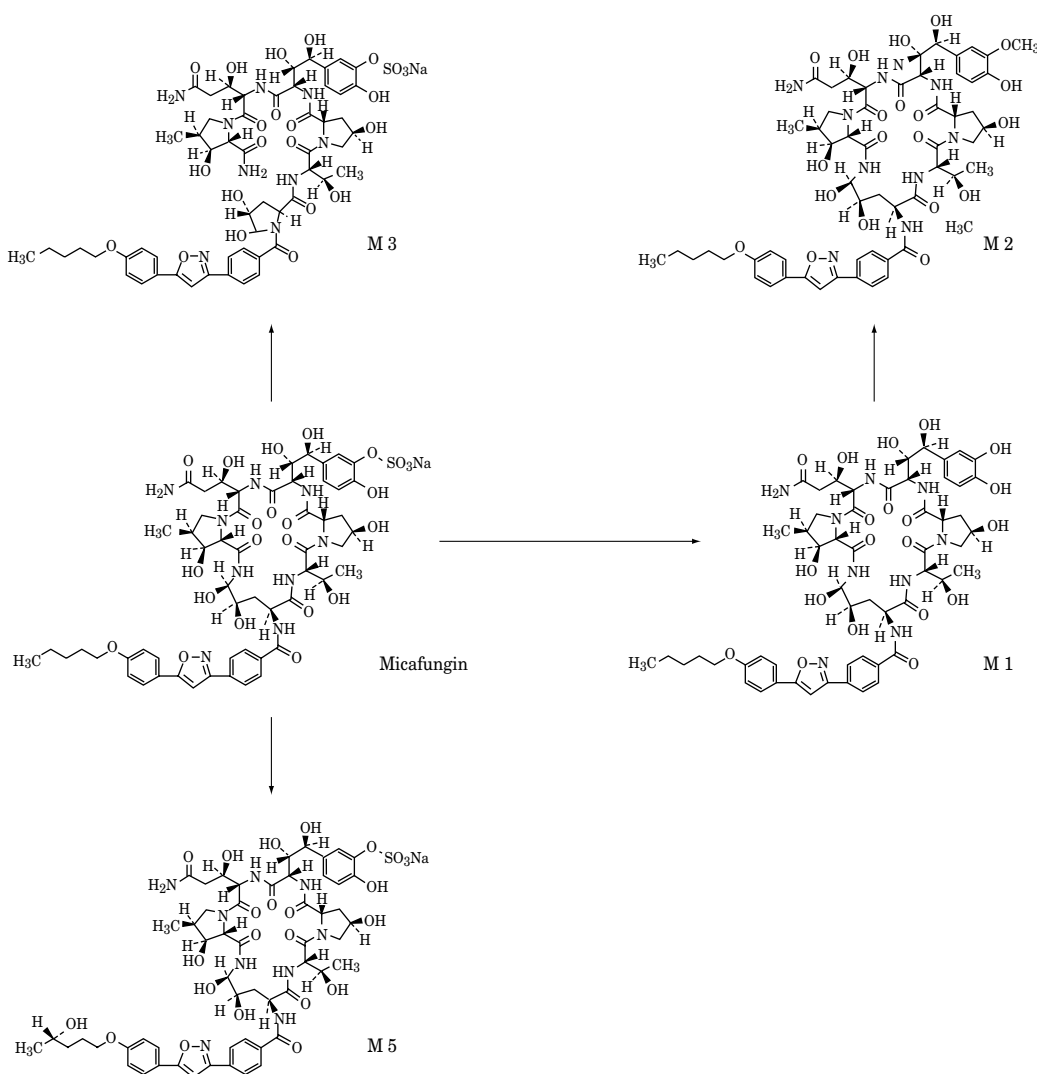


Fig. 9. Proposed metabolic pathways of micafungin in rats and dogs.

尿、胆汁および糞におけるクロマトグラム (Fig. 1) と各合成標品のリテンションタイムの比較から、M 1 はカテコール体、M 2 は M 1 のメトキシ体、M 3 は開環体、M 5 は側鎖の水酸化体と推定した (Fig. 9)。

### III. 考 察

ラットおよびイヌに [<sup>14</sup>C]MCFG を 1 mg/kg 静脈内投与した時の血漿、尿、胆汁および糞をもとに、MCFG のカテコール体 (M 1)、メトキシ体 (M 2)、開環体 (M 3) および側鎖の水酸化体 (M 5) がそれぞれ推定された。M 1 は MCFG が脱硫酸を受けた構造を示し、その生成にはサルファターゼの寄与が考えられた。また、M 2 は M 1 のカテコール部分がメチル化を受けた構造を示したことから、COMT (catechol O-methyltransferase) の寄与により M 1 から生成すると考えられた。

構造が同定された M 1、M 2 および M 5 について抗真菌活性を調べたところ、M 5 は MCFG に比べて著しく活性の弱い代謝物であったが、M 1 および M 2 は MCFG に比してやや弱いなし同程度の抗真菌活性を有することが示唆されている<sup>3)</sup>。 [<sup>14</sup>C]MCFG をラットおよびイヌに静脈内投与後の血漿中では MCFG および M 5 が主に検出され、抗真菌活性を有する M 1 および

M 2 はほとんど検出されなかった。MCFG の第 I 相試験においても血漿中の M 1 および M 2 濃度測定が実施されたが、動物試験と同様に血漿中濃度は低いものであった<sup>4)</sup>。一方、肺、肝臓、脾臓および腎臓では、M 1 および M 2 の比率は血漿に比べて高く、投与後 24 時間の肝臓中では試料中放射能に対し M 1 が 26.9%、M 2 が 22.8% となり、MCFG の 8.9% より高値を示した。血漿中濃度推移からは M 1 および M 2 の寄与は少ないと考えられたが、組織中では M 1 および M 2 が MCFG を補い抗真菌作用に寄与する可能性が示唆された。

### 文 献

- 1) 山戸康弘, 金子勇人, 橋本知子, 他: マウス, ラットおよびイヌにおける micafungin 単回静脈内投与後の体内動態, *in vitro* 血清蛋白結合および血球移行性。日化療会誌 50 (S-1): 74~79, 2002
- 2) 山戸康弘, 金子勇人, 山崎佐知子, 他: ラットにおける<sup>14</sup>C 標識 micafungin 単回静脈内投与後の分布および排泄。日化療会誌 50 (S-1): 80~87, 2002
- 3) 池田文昭, 大友寿美, 若井芳美, 他: Micafungin の代謝物 M 1, M 2 および M 5 の抗真菌活性。日化療会誌 50 (S-1): 54~57, 2002
- 4) 東 純一, 中原邦夫, 加賀山彰, 他: Micafungin の第 I 相試験。日化療会誌 50 (S-1): 104~147, 2002

## Metabolites of micafungin in rats and dogs

Hayato Kaneko, Yasuhiro Yamato, Yuriko Teramura,  
Tomoichi Fujiwara, Akira Suzuki, Akio Kawamura,  
Masato Terakawa and Akira Kagayama

Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

The metabolism of micafungin (MCFG), a new echinocandin-like lipopeptide antifungal agent, was evaluated in rats and dogs, and the following results were obtained.

1. After an intravenous administration of <sup>14</sup>C labeled MCFG to rats and dogs, MCFG and M 5 were mainly observed in plasma samples, and M 1 and M 2, which have antifungal activity, were barely detectable. The main compound observed was M 5 in urine samples and MCFG in feces and bile samples.

2. The relative ratios of M 1 and M 2 to the total radioactivity in lung, liver, spleen and kidney samples were higher than that in the plasma samples. In the liver sample at 24 hours after administration, M 1, M 2 and MCFG were 26.9%, 22.8% and 8.9% of total radioactivity, respectively.

3. From the analysis of plasma, urine, feces and bile samples, the catechol form of MCFG (M 1), methylated form of M 1 (M 2), open-ring form (M 3) and hydroxyl form at the side chain (M 5) were estimated.