

DL-8280 の体内動態

第1報 Bioassay 法と HPLC 法によるイヌとサルにおける吸収、排泄の比較

津村光義・佐藤敬喜・采 孟・立澤晴男

第一製薬株式会社中央研究所

DL-8280 20 mg/kg をイヌおよびサルに単回経口投与し、DL-8280 の吸収および排泄を bioassay 法および HPLC 法により検討した。

DL-8280 の血清中濃度は、投与後急速に上昇し、イヌおよびサルで、それぞれ、投与後 1.5 および 2 hr に最高濃度 (C_{max}) に達した。 C_{max} は、イヌおよびサルで、それぞれ、13.1 および 9.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、投与後 6 hr まで 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度が認められ、3~5 hr のみかけの半減期で減衰した。すなわち、DL-8280 の両動物種における経口吸収性は極めて良好であった。血清中濃度から算出した DL-8280 の分布容量は、いずれも 1 L/kg 以上であり、組織移行性が高いことが示唆された。

経口投与後、DL-8280 は急速に尿中へ排泄され、尿中濃度は投与後 24 hr にわたりイヌ、サルともに 150 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度であった。DL-8280 の尿中排泄率は、投与後 48 hr でイヌ、サルで投与量の約 42% であった。また、イヌおよびサルにおける DL-8280 のグルクロン酸抱合体の排泄率は、いずれも低く、投与後 48 hr で、それぞれ、投与量の 1.7 および 3.1% であった。

DL-8280 の血清中および尿中濃度を HPLC 法と bioassay 法により比較測定した結果、イヌおよびサルのいずれにおいても両測定値間には概略 1 : 1 の良好な相関性が認められ、未変化体の DL-8280 以外に抗菌活性を有する代謝物がほとんど存在しないことが明らかとなった。

DL-8280(±)-9-fluoro-2, 3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1, 2, 3-de][1, 4]benzoxazine-6-carboxylic acid は第一製薬株式会社で開発された新規合成経口抗菌剤であり、グラム陽性菌および緑膿菌を含むグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を有することが明らかにされている¹⁾。本研究においては、DL-8280 のイヌとサルにおける体内動態を明らかにする目的で経口投与後、DL-8280 の血清中濃度および尿中排泄を bioassay 法と高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) により測定し、比較検討したので、その結果を報告する。

実験材料および方法

1. 投与検体

DL-8280 は、Fig. 1 に示す化学構造を有し、淡黄色結晶または結晶性粉末で、融点 252~257.5° (分解) を有し、含量は 99.7% であった。

2. 実験動物および投与量

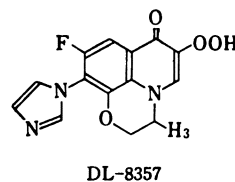
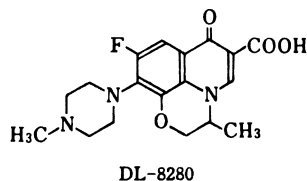
雄性ビーグル犬 (体重 10.0~14.5 kg) 5 頭および雌性カンクイザル (体重 2.3~2.8 kg) 5 頭を投与前約 20 hr 絶食して使用した。実験期間中飲料水は自由摂取させ、投与後 4 hr 以降固型飼料を与えた。

投与量は、イヌおよびサルのいずれにおいても 20 mg/kg とした。

3. 投与液の調製および投与方法

イヌおよびサル用投与液は、DL-8280 を、それぞれ、

Fig. 1 Chemical structure of DL-8280, and that of DL-8357 used as an internal standard in HPLC



20 あるいは 10 mg/ml の割合で 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し調製した。

イヌでは投与液をゴム製経口ゾンデにより胃内へ強制投与し、直後水 20 ml を与えた。サルでは投与液を小児用経鼻カテーテルにより経鼻的に胃内投与した。投与は、いずれも単回投与とした。

4. 生体試料の採取

1) 血液

イヌでは、経口投与後所定時間に前肢静脈より採血した。採血後約 1 hr 室温放置し遠心分離して血清を採取した。

サルでは、経口投与後所定時間に大腿部伏在静脈より採血し、以後イヌ血液と同様に処理して血清を得た。血清は分析に供するまでフリーザー中で凍結保存した。

2) 尿

経口投与後イヌおよびサルを代謝ケージに入れて所定時間に代謝ケージより自然排泄尿を採取した。また、イヌにおいては、同時に導尿カテーテルにより膀胱尿を採取し、自然排泄尿に合わせた。尿は分析に供するまでフリーザー中で凍結保存した。

5. 定量法

A. HPLC 法

測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、内部標準物質として Fig. 1 に構造を示す DL-8357 を用いて行った。

1) 血清中 DL-8280 定量法

血清 1 ml に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 50 μ g/ml の濃度に溶解した内部標準物質 (I.S.) DL-8357 溶液 1 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml およびクロロホルム 5 ml を加えて 10 min 振とう抽出し、3,000 r.p.m. 5 min 遠心分離した。クロロホルム層 4 ml を分取し、窒素気流下蒸発乾固した。残渣にアセトニトリル 0.2 ml を加え、15 sec 間超音波処理し、その 10 μ l を HPLC に注入した。DL-8280 標準液は、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 1 mg/ml の濃度に溶解した DL-8280 溶液 0.2 ml にブランク血清 3.8 ml を加えて 50 μ g/ml 溶液を調製後、ブランク血清で順次 2 倍希釈して調製した。検量線は、DL-8280 標準液 1 ml を用いて作成し、HPLC 上の I.S. に対する DL-8280 のピーク高比を求め、検量線により DL-8280 の血清中濃度を算出した。

2) 尿中 DL-8280 定量法

尿は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で適宜希釈し、各試料について希釈倍率の異なる 2 試料を分析した。

希釈尿 1 ml に I.S. 溶液 (150 μ g/ml) 1 ml および 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml, クロロホルム 5 ml を加えて、血清と同様に抽出分離した。残渣にアセトニトリル 0.5 ml を加え、15 sec 間超音波処理し、その 10 μ l を HPLC に注入した。DL-8280 標準液は、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 1 mg/ml の濃度に溶解した DL-8280 溶液 1 ml に希釈したブランク尿 9 ml を加えて 100 μ g/ml 溶液を調製後、順次 2 倍希釈して調製し

た。検量線は標準液 1 ml を用いて作成し、DL-8280 の尿中濃度は血清中濃度と同様に算出した。

3) 尿中抱合体定量法

希釈倍率の異なる 2 試料について β -glucuronidase によりグルクロン酸抱合体を水解後 DL-8280 濃度を測定し、得られた値より水解前の DL-8280 濃度を差し引くことによりグルクロン酸抱合体量とした。すなわち、希釈尿 1 ml に I.S. 溶液 (150 μ g/ml) 1 ml および β -glucuronidase 溶液 [type IX, *Escherichia coli* 由来, Sigma 社, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 3,000 units/ml に溶解] 1 ml を加え、37°C 1 hr インキュベーション後、尿中 DL-8280 定量法に従って DL-8280 濃度を測定した。

4) HPLC 条件

装置は日立製 635 A 型液体クロマトグラフを使用した。固定相として Nucleosil 5 CN (Nagel 社製) を用い、4.6 ϕ × 300 mm および 4.6 ϕ × 30 mm (プレカラム) のステンレススチールカラムに充填し使用した。移動相としてアセトニトリル/0.04 M リン酸 (90/10, v/v) を 1.8 ml/min の流速で使用した。検出は紫外吸収 (295 nm) により行った。本測定条件下における DL-8280 および I.S. の保持時間は、それぞれ、10.1 および 7.8 min であった。

B. Bioassay 法

血清および尿中濃度は薄層寒天ディスク拡散法で測定した。検定菌は *Bacillus subtilis* ATCC 6051 株 (高濃度域) および *E. coli* Kp 株 (低濃度域) である。*B. subtilis* 使用時はその芽胞懸濁液 (10⁸ cfu/ml) を普通寒天培地 (pH 7.2, 栄研) に 1% の割合に混釈し、その 5 ml をあらかじめ滅菌同培地 5 ml を基層として分注・凝固しておいた内径 90 mm のプラスチックシャーレに分注し水平凝固させた。*E. coli* 使用時はそのトリプトソイブイオン (栄研), 37°C, 一夜培養菌液 (10⁹ cfu/ml) をミューラーヒントン寒天培地 (pH 7.2, 栄研) に 1% の割合に混釈し、その 5 ml を水平凝固させた。

血清および希釈尿試料をペーパーディスク (直径 8 mm, 薄手, 東洋濾紙) に浸漬し、それを各寒天平板に静置して、4°C, 1 hr 拡散後、37°C 一夜培養し、得られた阻止円径から標準曲線法²⁾により濃度を算出した。

実験成績

1. 血清中濃度

DL-8280 20 mg/kg 経口投与後の HPLC 法による血清中 DL-8280 濃度を Fig. 2 に示す。血清中濃度は、経口投与後急速に上昇し、イヌおよびサルで、それぞれ、投与後 1.5 および 2 hr に最高濃度 (C_{max}) に達し、5.2 および 3.4 hr のみかけの半減期で減衰した。イヌおよ

びサルにおける C_{max} は、それぞれ、13.1 および 9.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、投与後 6 hr まで 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度が認められた。

HPLC 法により得られたデータを基に one compartment open model により解析し、各パラメータを算出した結果を Table 1 に示す。最高濃度到達時間 (T_{max}) および C_{max} は実測値に近似し、イヌでは、それぞれ、1.34 hr および 14.2 $\mu\text{g/ml}$ であり、サルでは、それぞれ、2.35 hr および 9.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、分布容量 (V_d) は、イヌおよびサルで、それぞれ、1.13 および 1.42 L/kg であった。

2. 尿中排泄

経口投与後の HPLC 法による DL-8280 の尿中濃度お

Fig. 2 Serum levels by HPLC method of DL-8280 in the dog and monkey after a single oral administration of the drug of 20 mg/kg

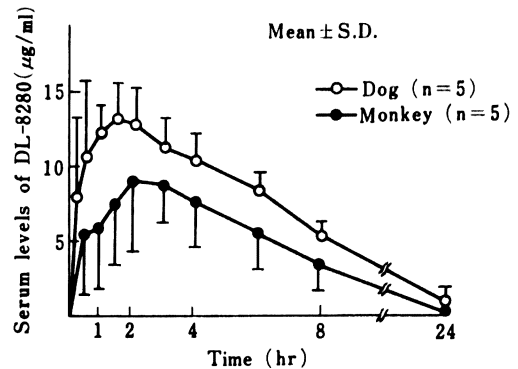


Table 1 Pharmacokinetic parameters for DL-8280 in the dog and monkey

Animal	Pharmacokinetic parameters					
	K_a (hr^{-1})	K_d (hr^{-1})	V_d (L/kg)	$T_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)
Dog	2.76 ± 1.59	0.17 ± 0.05	1.13 ± 0.26	4.37 ± 1.19	1.34 ± 0.70	14.2 ± 1.7
Monkey	1.11 ± 0.85	0.26 ± 0.05	1.42 ± 0.57	2.81 ± 0.56	2.35 ± 1.17	9.3 ± 3.8

Calculation was made on the basis of serum levels determined by HPLC method. Each value represents the mean ± S.D..

Table 2 Urinary excretion of DL-8280 in the dog and monkey after a single oral administration of the drug of 20 mg/kg

Animal	Urinary concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				Cumulative excretion (% of dose)			
	Time (hr)				Time (hr)			
	0 ~ 4	4 ~ 8	8 ~ 24	24 ~ 48	4	8	24	48
Dog	546 ± 247	633 ± 309	158 ± 34	17 ± 8	13.8 ± 1.6	25.3 ± 2.4	38.5 ± 2.7	41.9 ± 4.6
Monkey	511 ± 420	378 ± 120	503 ± 296	114 ± 62	11.4 ± 8.8	20.8 ± 4.6	36.4 ± 7.0	41.9 ± 8.8

Each value represents the mean ± S.D. of determinations obtained by HPLC method.

よび排泄率を Table 2 に示す。DL-8280 の尿中濃度は、投与後 4 hr でイヌおよびサルで、それぞれ、546 および 511 $\mu\text{g/ml}$ であり、24 hr 後までいずれも 150 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度が認められた。DL-8280 の尿中排泄率は、投与後 4 hr までにイヌおよびサルで、それぞれ、投与量の 13.8 および 11.4% であり、48 hr 後には、いずれも投与量の 41.9% に達した。

3. Bioassay 法と HPLC 法による測定値の相関性

イヌおよびサル血清中 DL-8280 濃度に関する相関性

を Fig. 3 に示す。いずれの動物においても bioassay 値と HPLC 値との間には良好な相関性が認められ、イヌでは $[\text{HPLC 値}] = 1.069 [\text{bioassay 値}] - 0.22$ (相関係数 0.982) であり、サルでは $[\text{HPLC 値}] = 0.976 [\text{bioassay 値}] - 0.08$ (相関係数 0.977) であり、いずれも概略 1:1 の相関性が認められた。

尿中濃度に関する相関性を Fig. 4 に示す。血清におけると同様に、イヌおよびサル尿中濃度においても、HPLC 値と bioassay 値との間には 1:1 の相関性が認め

Fig. 3 Correlation between serum concentrations by bioassay method and by HPLC method

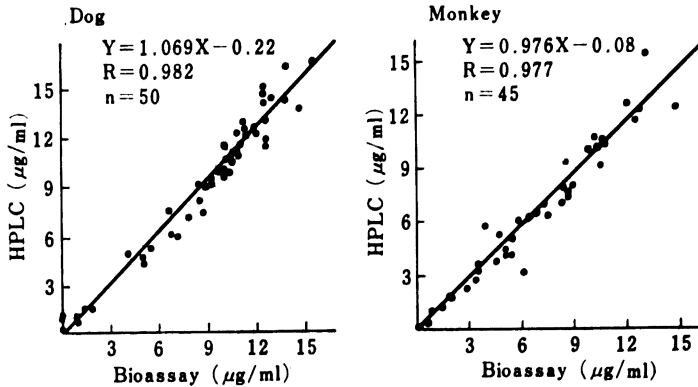
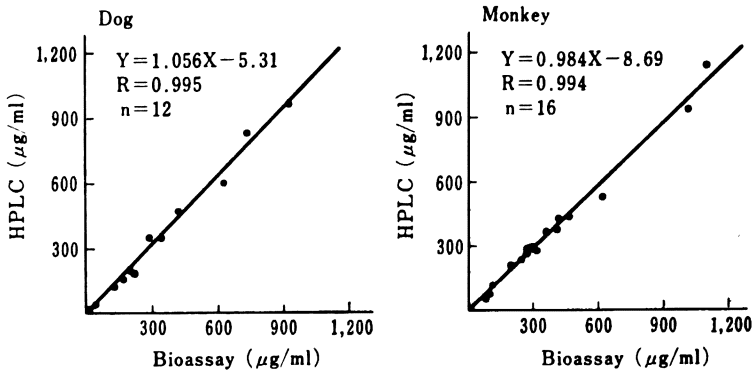


Fig. 4 Correlation between urinary concentrations by bioassay method and by HPLC method



られた。

4. 抱合体の尿中排泄

β -Glucuronidase による水解前後の DL-8280 の尿中濃度を測定し、その差から求めた DL-8280 のエステル型グルクロナイドの尿中排泄率を Table 3 に示す。イヌにおいては、グルクロナイドの尿中排泄率は小さく、投与後 24 hr で投与量の 1.7% にすぎなかった。サルにおいては、未変化体のグルクロナイドは、投与後 24 および 48 hr で、それぞれ、投与量の 2.8 および 3.1% であった。

考 察

DL-8280 20 mg/kg を絶食したイヌおよびサルに経口投与すると、DL-8280 の血清中濃度は速やかに上昇し、2 hr 以内に最高濃度 (C_{max}) に達した。 C_{max} は、イヌおよびサルで、それぞれ 13.1 および 9.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、これまでに報告されているピペミド酸 (PPA)³⁾ とノルフロキサシン (NFLX)⁴⁾ のイヌおよびサル血清中最高濃度より著しく高い値であった。また、血清中 DL-8280

Table 3 Urinary excretion of DL-8280 glucuronide in the dog and monkey after a single oral administration of DL-8280 of 20 mg/kg

Animal	Cumulative excretion (% of dose)			
	Time (hr)			
	4	8	24	48
Dog	0.4 \pm 0.4	0.6 \pm 0.8	1.7 \pm 1.5	1.7 \pm 1.5
Monkey	1.0 \pm 1.0	1.9 \pm 0.9	2.8 \pm 1.8	3.1 \pm 1.9

Each value represents the mean \pm S.D. of determinations obtained by HPLC method.

濃度の生物学的半減期は、イヌおよびサルで、それぞれ、5.2 および 3.4 hr であり、投与後 6 hr まで 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度が認められ、ほとんどの細菌に対する MIC を上回った。これらの成績から、DL-8280 のイヌ

とサルにおける経口吸収が極めて良好であることが判明した。DL-8280 の血清中濃度から算出した分布容量は、いずれも 1L/kg 以上であり、DL-8280 の組織移行性が高いことが推察された。このことは、ラットにおける組織内分布を詳細に調べた結果、立証されているところである⁵⁾。

経口投与後、DL-8280 は急速に尿中へ排泄され、尿中濃度は、投与後 24 hr にわたり 150 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度であった。DL-8280 の尿中排泄率は、いずれの動物においても投与後 48 hr で投与量の約 42% であり、¹⁴C 標識 DL-8280 を用いて測定した両動物種における尿中 ¹⁴C 排泄率⁵⁾ より小さかった。この差異は、DL-8280 の代謝物が生成することに起因するのではなく、本研究においては尿中 DL-8280 濃度を HPLC 法と bioassay 法で正確に比較するために自然排泄尿を採取し、代謝ケージの洗浄を行わなかったことに起因すると考えられる。本研究において明らかにした DL-8280 の尿中排泄率は、これまでに報告されているミロキサシン (MLX)⁶⁾ および NFLX⁴⁾ のそれより高値を示した。

DL-8280 の血清中および尿中濃度を HPLC 法と bioassay 法により測定し比較した結果、いずれの濃度においても両測定値間には 1:1 の良好な相関性が認められた。この成績から、イヌおよびサル血清中および尿中には、未変化体の DL-8280 以外に抗菌活性を有する代謝物がほとんど存在しないことが示唆され、DL-8280 はイヌとサルの体内で代謝を受けにくく未変化体として挙動すると推察された。事実、本研究で検討したグルクロン

酸抱合体の排泄率は極めて低かった。なお、¹⁴C-DL-8280 をイヌ、サルに投与して代謝物を検索した結果でも、血清および尿中には大部分が未変化体として存在することが確認されている⁷⁾。

なお、本研究は昭和56年2月から昭和57年3月に実施した。

文 献

- 1) SATO, K.; Y. MATSUURA, M. INOUE, T. UNE, Y. OSADA, H. OGAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 22: 548~553, 1982
- 2) 厚生省薬務局監修: 日本抗生物質医薬品基準解説, 一般試験法, 力価試験法 II, 517~519頁, 薬業時報社, 1974
- 3) 清水当尚, 中村信一, 黒部陽之, 高瀬善行: Pipemidic acid の吸収, 分布および排泄. *Chemotherapy* 23: 2724~2729, 1975
- 4) 村山 哲, 平井敬二, 伊藤 明, 阿部泰夫, 入倉 勉: 各種動物における AM-715 の Bioassay による体内動態に関する研究. *Chemotherapy* 29 (S-4): 98~104, 1981
- 5) 岡崎 治, 倉田忠司, 橋本浩一, 須藤賢一, 津村光義, 立澤晴男: DL-8280 の体内動態, 第 2 報 ¹⁴C-DL-8280 の各種動物における吸収, 分布, 排泄. *Chemotherapy* 32 (S-1): 1185~1202, 1984
- 6) 井沢昭雄, 木崎容子, 甲田 彰, 山森 芬, 小松敏昭, 吉武 彬: 踏動物における新化学療法剤 AB-206 の吸収, 体内分布および排泄 — Bioassay による検討 —. *Chemotherapy* 26 (S-4): 71~75, 1978
- 7) 須藤賢一, 橋本浩一, 倉田忠司, 岡崎 治, 津村光義, 立澤晴男: DL-8280 の体内動態, 第 3 報 ¹⁴C-DL-8280 の各種動物における代謝. *Chemotherapy* 32 (S-1): 1203~1210, 1984

METABOLIC DISPOSITION OF DL-8280
THE FIRST REPORT: COMPARISON BETWEEN ABSORPTION
AND EXCRETION OF DL-8280 IN THE DOG AND MONKEY
BY BIOASSAY AND HPLC METHODS

MITSUYOSHI TSUMURA, KEIKI SATO, TSUTOMU UNE and HARUO TACHIZAWA
Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

The absorption and excretion of DL-8280 in the dog and monkey were studied using bioassay and HPLC methods after a single oral administration of the drug at a dose level of 20 mg/kg.

Serum concentrations of DL-8280 were increased rapidly and reached a peak concentration (C_{max}) at 1.5 and 2 hr after the administration of the drug to the dog and monkey, respectively. C_{max} were 13.1 and 9.1 $\mu\text{g/ml}$ in the dog and monkey, respectively, and high concentration of more than 5 $\mu\text{g/ml}$ lasted up to 6 hr post-medication. Apparent biological half lives of serum concentration of DL-8280 were 5.2 and 3.4 hr in the dog and monkey, respectively. These results indicated high oral absorbability of DL-8280 in both animal species. A volume of distribution (V_d) of DL-8280 calculated from serum concentrations was more than 1 L/kg in the both animal species, suggesting that the tissue transfer of the drug might be remarkably high.

DL-8280 was excreted rapidly in the urine after the oral administration, and its urinary concentration in the dog and monkey was at high concentration of more than 150 $\mu\text{g/ml}$ up to 24 hr post-medication. Urinary excretion rate of DL-8280 was approximately 42% of the dose in the dog and monkey within 48 hr post-medication. Urinary excretion rate of DL-8280 glucuronide was 1.7 and 3.1% of the dose in the dog and monkey, respectively, 48 hr after dosing.

Concentrations of DL-8280 in the serum and urine were compared between bioassay and HPLC values. As a result, a good correlation of approximately 1 : 1 was found between both assay values for DL-8280 concentrations in the serum and urine of the dog and monkey. This result suggests that DL-8280 as unchanged form is antimicrobial substance *in vivo* in the dog and monkey but not its metabolites.