

AT-2266 の生体内動態 III

ヒトにおける AT-2266 と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄

山口俊和・鈴木玲子・関根 豊

大日本製薬株式会社総合研究所

健康人被験者に AT-2266 の 1 回投与試験 (投与量 100, 200, 400, 800 mg) および反復投与試験 (投与量 400 mg, 1 日 2 回 7 日間計 13 回服用) を行い, 血漿中濃度および尿中排泄について検討し, 以下の知見を得た。

1. 血漿中には AT-2266 と oxo 体 (M-2) とが, 尿中にはこの他に amino 体 (M-1), formyl 体 (M-3), acetyl 体 (M-4), ethylenediamino 体 (M-5) が検出された。
2. 血漿中未変化体濃度は, 投与後 1~2 時間で最高値に達し, その値は 100, 200, 400, 800 mg 投与で 0.5, 1.6, 2.7, 6.0 $\mu\text{g/ml}$ と投与量にはほぼ対応して増加した。血漿中からの消失は二相性で, β 相の見かけの半減期は 5.4~5.8 時間であった。血漿中 oxo 体濃度は未変化体よりも低く, ピーク時でも未変化体の 1/10 にすぎなかった。
3. AT-2266 の血漿たんぱくとの結合率は, 32.0% であった。
4. 24 時間までの尿中総排泄量は, 投与量の 53~59% と投与量によらずほぼ一定であった。尿中排泄物の 80% 以上は未変化体で, oxo 体は未変化体の 1/5 もしくはそれ以下と少量であった。他の代謝物はさらに少なく, 4 種合計でも投与量の 2% 以下であった。
5. AT-2266 の血中動態, 尿中排泄に食事の影響は認められなかった。
6. AT-2266 の反復投与により, 血漿中未変化体濃度は投与 3 日目から steady-state に達し, 最高濃度は初回投与よりも 1.6 倍増加したが, 消失半減期および血漿中, 尿中の未変化体と oxo 体の割合は変化しなかった。
7. 以上の結果から, AT-2266 服用後の抗菌活性は, 主として未変化体によるものと考えられる。

AT-2266 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid] (Fig. 1) の実験動物およびヒトにおける代謝¹⁾ならびに実験動物における生体内動態²⁾についてはすでに報告した。その結果, a) ヒトの尿中には, 未変化体の他, Fig. 1 に示す 5 種の代謝物が排泄されること, b) AT-2266 は代謝を受けにくく, 血中, 尿中共に未変化体が大部分を占めるが, 代謝物の割合は動物種によって変動すること等を明らかにした。

ヒトにおける AT-2266 の生体内動態に関しては, すでに bio-assay³⁾を用いた検討がなされているが, これは抗菌活性の生体内動態をみたもので, 未変化体と代謝物の量的関係は明らかでない。今回, ヒトについて, AT-2266 経口投与後の未変化体と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄量を, 高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したので, その結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 試料

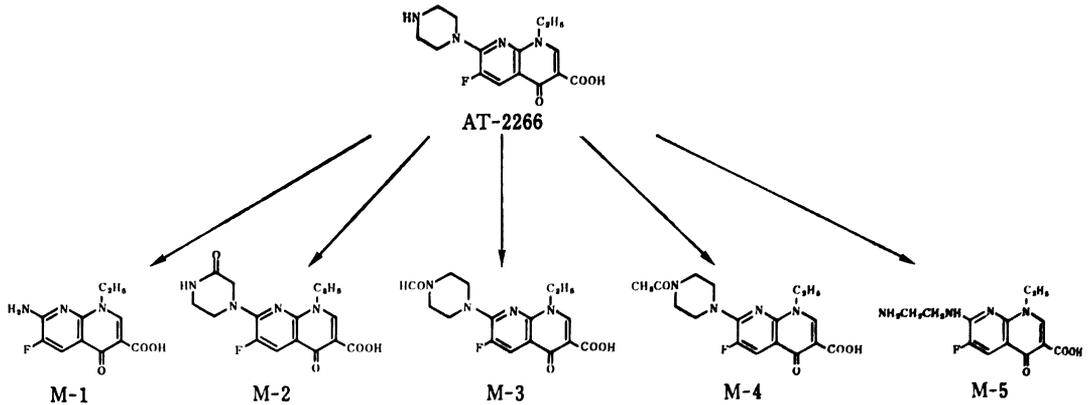
本研究で使用した血漿および尿は, 川合ら³⁾より提供された臨床第一相試験実施時のもので, 1 回投与 (投与量 100, 200, 400, 800 mg) および反復投与 (投与量 400

mg, 1 日 2 回 7 日間計 13 回服用) 試験における試料である。いずれの試験も健康人被験者各群 6 名に対し, 軽食摂取後 30 分に AT-2266 を水 180ml とともに服薬させた。また, 食事の影響を検討するために, あらかじめ 400 mg 1 回投与試験を実施した同一の被験者について, 絶食下 (前日夕食以降飲食させず) 400 mg を服薬させた。

2. 定量標品および試薬

血漿中, 尿中濃度測定の際に, 標品として用いた AT-2266 (Lot. No. T81008) およびその代謝物, amino 体 M-1 [7-amino-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid], oxo 体 M-2 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(3-oxo-1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid], formyl 体 M-3 [1-ethyl-6-fluoro-7-(4-formyl-1-piperazinyl)-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid], acetyl 体 M-4 [7-(4-acetyl-1-piperazinyl)-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid], ethylenediamino 体 M-5 [7-(2-aminoethylamino)-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-

Fig. 1 Metabolic pathway of AT-2266 in man



oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid] は、大日本製薬総合研究所で合成された (Fig. 1)⁴⁾。

使用した試薬は、市販特級品を用いた。

3. 血漿中、尿中 AT-2266 および代謝物の定量

血漿中および尿中の AT-2266 と代謝物の定量は、中村らの方法⁵⁾にしたがい、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行った。

すなわち、血漿中、尿中の未変化体、oxo 体および ethylenediamino 体は、1% ethyl chloroformate 含有クロロホルムで抽出し、HPLC により定量した。また、尿中の amino 体、formyl 体および acetyl 体はクロロホルムで抽出することにより行った。

本定量法の検出限界は、試料 1 ml を使用することにより、AT-2266、代謝物ともに血漿中で 0.01 μg/ml、尿中で 0.1 μg/ml であった。

なお、血漿中および尿中の AT-2266 と代謝物は、37°C で少なくとも 24 時間、-20°C で 3 ヶ月間安定であった⁵⁾。

4. 血漿中濃度の解析

血漿中濃度の解析は、非線型最小二乗法プログラム MULTI⁶⁾ を用いて次式により行った。

$$C_t = Ae^{-\alpha(t-t_0)} + Be^{-\beta(t-t_0)} - (A+B)e^{-k_{ab}(t-t_0)}$$

ここで C_t は投与 t 時間後の血漿中濃度、 t_0 は lag time、 k_{ab} は吸収速度定数、 α 、 β はそれぞれ α 相、 β 相の見かけの消失速度定数である。

血漿中濃度-時間曲線下の面積 (AUC) は、台形法により計算した。

5. たんぱく結合

400、800 mg 1 回投与後 1 時間の血漿を試料とした。血漿をセントリフロー CF 25 型 (アミコン) で遠心分離 (1,000 × g, 20 分, 4°C) し、ろ液中濃度と遠心分離前

の血漿中濃度から、たんぱく結合率を求めた。

II. 結 果

1. 1 回投与試験

AT-2266 経口投与後のヒト血漿中には、マウス、ラット、イス、サル²⁾と同様、未変化体とともに oxo 体 (M-2) が検出されたので、両者の濃度測定を行った。

Fig. 2 に被験者 6 名に AT-2266 100、200、400 および 800 mg 1 回投与後の未変化体と oxo 体の平均血漿中濃度推移を示す。未変化体濃度は、投与後 1~2 時間に最高値に達し、その濃度は 100、200、400、800 mg 投与で 0.5、1.6、2.7、6.0 μg/ml であった。以後徐々に減衰して、24 時間後には最高値の 1/20~1/30 となった。血漿中からの消失は二相性を示し、見かけの半減期は α 相で 0.6~0.8 時間、 β 相で 5.4~5.8 時間と投与量によらず一定であった。なお、100 mg 投与時の被験者 6 名中 3 名は、投与 24 時間後の血漿中濃度が検出限界 (0.01 μg/ml) 以下となり、 β 相を正確に算出できなかったため、計算から除外した。oxo 体の平均血漿中濃度は、未変化体に比べ低く、ピーク時でも未変化体の約 1/10 であった。

AT-2266 400 および 800 mg 1 回投与後 24 時間の未変化体と代謝物 M-1~M-5 の尿中排泄を Table 1 に示す。平均尿中総排泄量は、400 および 800 mg 投与でそれぞれ投与量の 53.2、56.6% で、このうち未変化体が 44.1、47.3% (尿中総排泄量の 83%) と最も多く、ついで oxo 体が 7.5~7.6% (14%) で、以下 ethylenediamino 体 (M-5) 0.8~1.1%、amino 体 (M-1) 0.3%、acetyl 体 (M-4) 0.3%、formyl 体 (M-3) 0.1% の順であった。

以上の結果から、oxo 体以外の代謝物の排泄量は少なく、投与量が下がると定量が困難であると予想されたため、AT-2266 100 および 200 mg 投与後の尿中排泄は、未変化体と oxo 体だけを測定した。その結果、100、200 mg

投与で未変化体と oxo 体合計の平均排泄量は、それぞれ投与量の 53.6, 59.3% で、うち未変化体が 39.5, 47.8% と 400, 800 mg 投与後の尿中排泄量とほぼ同様の結果が得られた。

Fig. 3 に 1 回投与試験で得られた薬動学的パラメーターを示す。図から明らかなように、最高血漿中濃度、AUC、尿中排泄量は、投与量に対応して増加すること、またピーク時間、血漿中からの消失半減期は、投与量によらずほぼ一定であることが認められた。

2. 反復投与試験

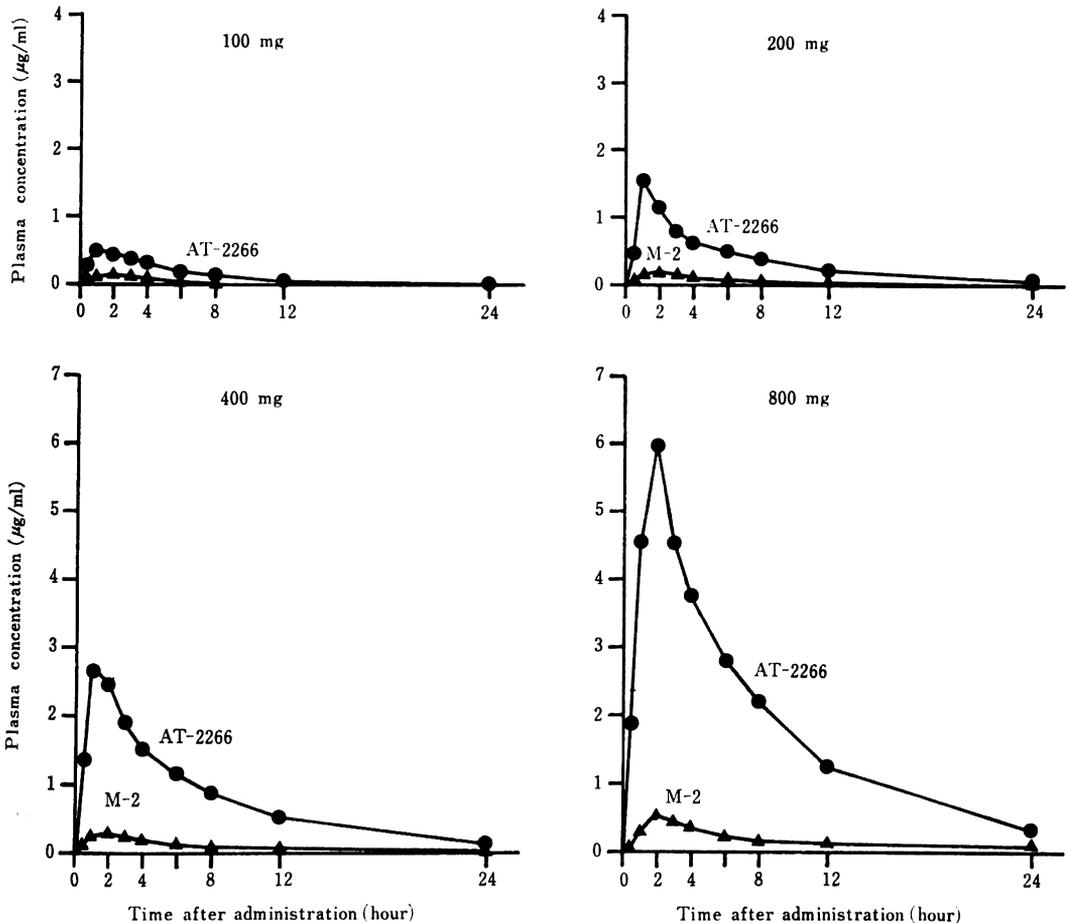
Fig. 4 に AT-2266 400 mg 1 日 2 回 7 日間計 13 回反復投与試験における、未変化体と oxo 体の平均血漿中濃度推移を示す。投与 1 日目の血漿中動態は、1 回投与試験のそれとほぼ等しく、平均血漿中未変化体濃度の最高値

Table 1 24-Hour urinary excretion of AT-2266 and its metabolites in man following single oral administration at doses of 400 and 800 mg of AT-2266

Metabolites	Urinary excretion (% of dose)	
	400 mg	800 mg
AT-2266	44.1 ± 2.6	47.3 ± 2.2
M-1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
M-2	7.5 ± 0.4	7.6 ± 0.8
M-3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
M-4	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
M-5	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2
Total	53.2 ± 2.6	56.6 ± 2.5

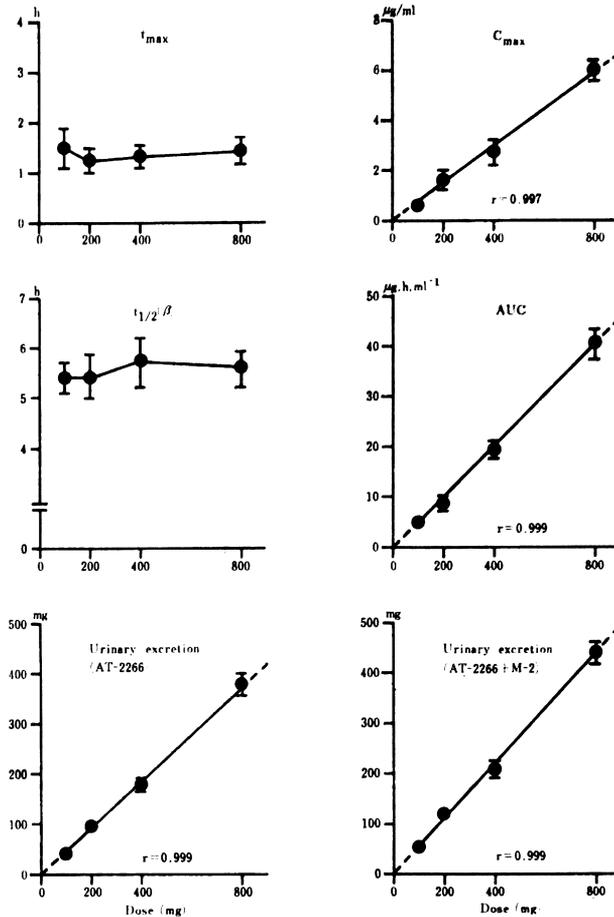
Values are means ± S. E. from 6 subjects.

Fig. 2 Plasma levels of AT-2266 and its metabolite, M-2, in man following single oral administration at doses of 100, 200, 400 and 800 mg of AT-2266



Plottings are mean values from 6 subjects.

Fig. 3 Correlation of dose and pharmacokinetic parameters of AT-2266 in man



Plottings are mean values \pm S. E. from 6 subjects.

は $3.1 \mu\text{g/ml}$ で、 β 相の消失半減期は 6.2 時間であった。投与 7 日目 (13 回投与後) の未変化体濃度は、0 時間で $2.1 \mu\text{g/ml}$ 、ピークで $5.1 \mu\text{g/ml}$ で、初回投与よりベーンサルで 2.7 倍、ピークで 1.6 倍それぞれ増加した。半減期は 7.7 時間と 1 回目投与より遅延したが、Student の t 検定で有意差は認められなかった。血漿中 oxo 体濃度は、未変化体のほぼ 1/10 で、1 回投与試験時と変わらなかった。

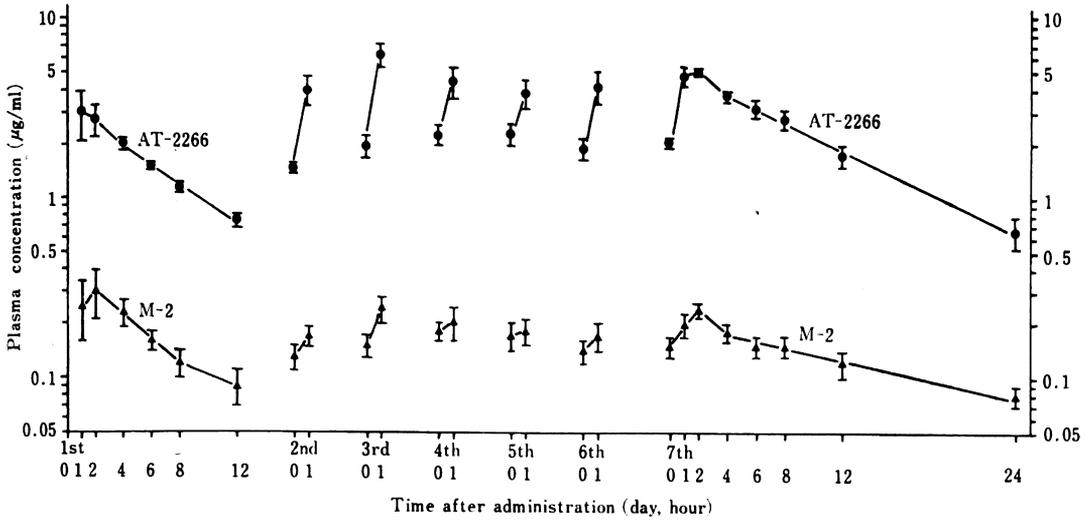
反復投与試験における未変化体と oxo 体の尿中排泄を Fig. 5 に示す。投与 1 日目の尿中には、未変化体と oxo 体合計で、投与量の 50.8% が排泄され、2 日目以後は 1 日投与量 (800 mg) の 70% 前後とはほぼ一定になり、試験期間中には全投与量の 72.3% が排泄された。なお、7 日目の尿中排泄量は、52.4% と 2~6 日目より小さな値が

得られた。これは 7 日目には AT-2266 を 1 回しか投与していない (7 日目の投与量は 400 mg, 1~6 日目は 1 日 800 mg) ためである。主排泄物は未変化体で、oxo 体の割合も 1 回投与試験時と変化しなかった。なお、血漿中および尿中の未変化体と oxo 体の割合が、1 回投与と反復投与とで変化しなかったため、他の代謝物の尿中排泄量は測定していない。

3. 食事の影響

絶食 (投与前日夕食以後約 14 時間) および非絶食 (投与前 30 分に軽食摂取) の被験者 6 名に、AT-2266 400 mg を 1 回服用した際の血漿中濃度および尿中排泄量を Fig. 6 に示す。血漿中濃度および尿中排泄量に、各測定点で統計的 (Student の t 検定) 有意差は認められず、したがって、AT-2266 の生体内動態は食事に影響されない

Fig. 4 Plasma levels of AT-2266 and its metabolite, M-2, in man in a consecutive oral dosing test of AT-2266 (400 mg twice a day for thirteen times)



Plottings are mean values ± S. E. from 6 subjects.

と考えられる。

4. たんぱく結合

AT-2266 および oxo 体のヒト血漿たんぱくに対する結合率を 400 および 800 mg 1 回投与後 1 時間の血漿を試料として測定したところ、結合率は AT-2266 が 32.0 %, oxo 体が 68.0%であった。

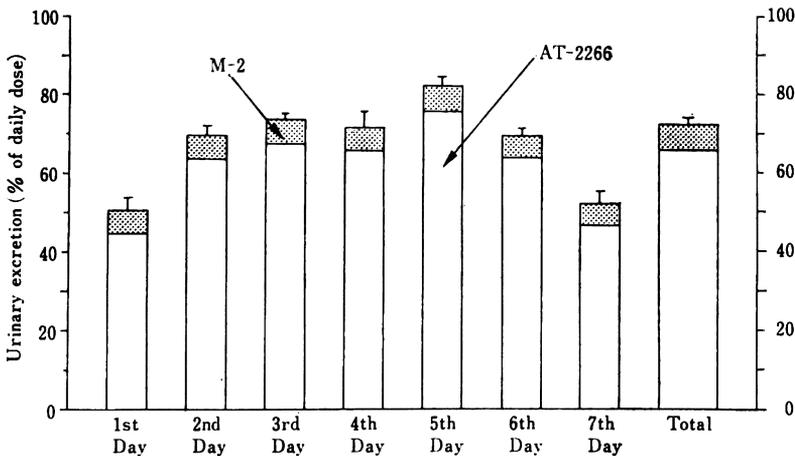
III. 考 察

ヒトにおける AT-2266 の消化管吸収はマウス、ラッ

ト、イヌ、サル²⁾と同様に速やかに、血漿中未変化体濃度の最高値は、投与後 1~2 時間にみられた。その値は 100, 200, 400, 800 mg 投与でそれぞれ 0.5, 1.6, 2.7, 6.0 µg/ml で投与量にほぼ対応して増加した (Fig. 3)。その後の消失は二相性を示し、β相の見かけの半減期は 5.4~5.8 時間で、投与量によらず一定であった。

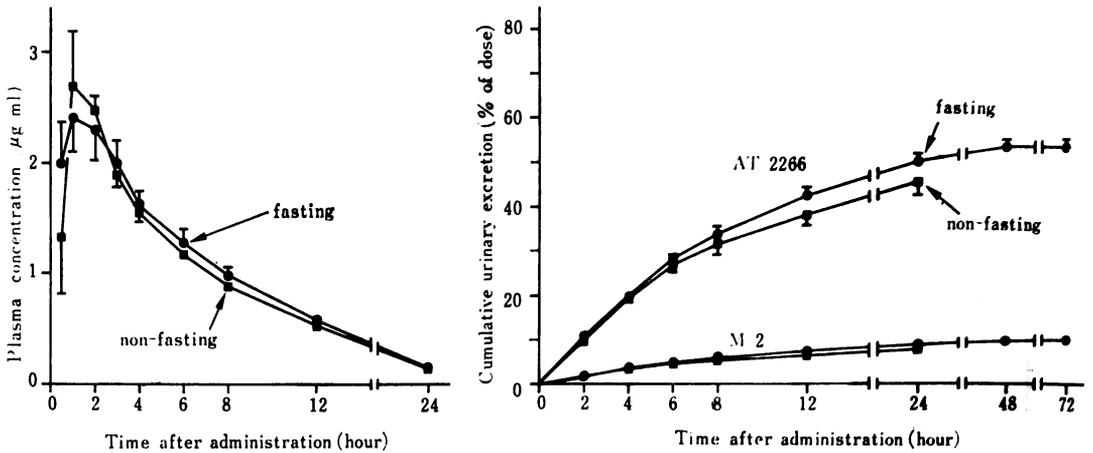
AT-2266 投与後の血漿中には、未変化体とともに oxo 体 (M-2) が検出された。その濃度はピーク時でも未変

Fig. 5 Urinary excretion of AT-2266 and its metabolite, M-2, in man in a consecutive oral dosing test of AT-2266 (400 mg twice a day for thirteen times)



Plottings are mean values ± S. E. from 6 subjects.

Fig. 6 Effect of food on plasma levels and urinary excretion of AT-2266 in man following single oral administration at a dose of 400 mg of AT-2266



Plottings are mean values \pm S. E. from 6 subjects.

化体の約1/10で、サル²⁾の1/3~1/5と低かった。

AT-2266 投与後の未変化体の血漿たんぱくとの結合率は、32.0%で、ラットにおける結合率36.5%²⁾とほぼ類似していた。

AT-2266 は実験動物²⁾と同様ヒトにおいても代謝を受けにくく、尿中の80%以上が未変化体として排泄された。尿中の主代謝物は oxo 体であったが、未変化体の1/5もしくはそれ以下と少なかった。ethylenediamino 体 (M-5) は未変化体の1/40以下で、amino 体 (M-1)、formyl 体 (M-3)、acetyl 体 (M-4) はさらに少なく、微量な代謝物であった (Table 1)。

AT-2266 100~800 mg 投与後24時間の尿中排泄量は、投与量の53~59%と一定であったが、24時間後でも血漿中に未変化体と oxo 体が検出される (Fig. 2) ため、吸収された AT-2266 は、24時間で全量排泄されていない。そこで尿中排泄速度から尿中総排泄量を計算すると、投与量の4~7%が24時間以後排泄されると推定された。実際、本剤400 mg を絶食下投与した時、24~72時間で投与量の5.1% (未変化体3.8%, oxo 体1.3%, Fig. 6) が尿中に排泄され、上記推定値とよく一致した。したがって、AT-2266 の尿中総排泄量は、少なくとも投与量の約60%であり、反復投与時の結果 (Fig. 5) とも合わせると、投与量の60~75%が尿中に排泄されると考えられる。

Fig. 3 から明らかなように、検討した100~800 mg の投与範囲では、最高血漿中未変化体濃度、AUC および尿中排泄量は、投与量に対応して増加し、またピーク時間および見かけの半減期は、投与量によらず一定であ

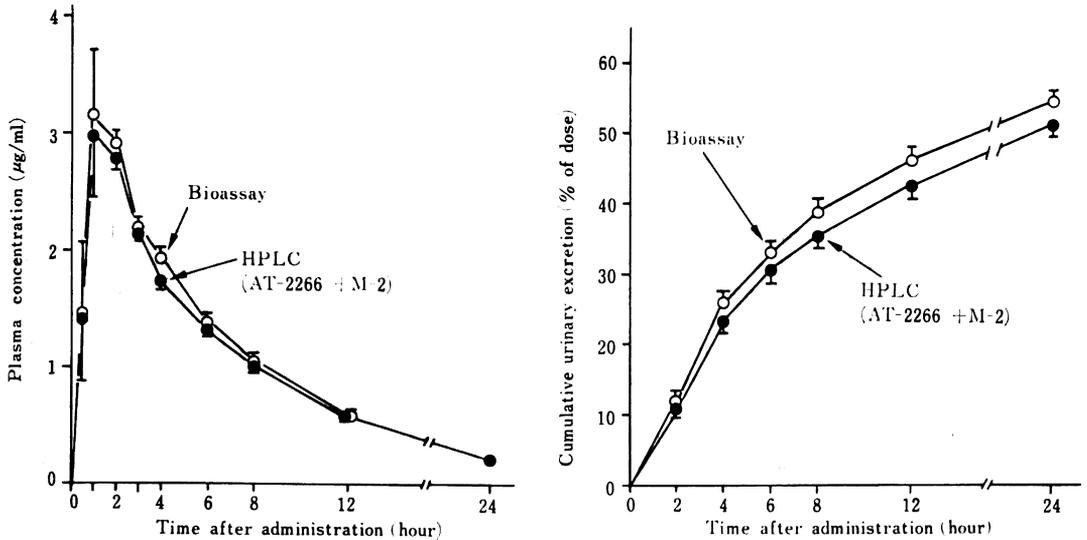
た。このことは本剤の生体内動態は、投与量によって変化しないことを示唆している。

AT-2266 400 mg を1日2回7日間計13回反復投与した時、1日目と7日目の消失半減期に差はみられず、さらに血漿中、尿中の未変化体と oxo 体の割合も変化しなかったことから、AT-2266 の生体内動態は、反復投与によって変化しないと考えられる。なお、投与3日目以後の投与前の血漿中濃度は、1.9~2.2 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ一定であり (Fig. 4)、さらに尿中排泄量も2日目以後1日投与量の70%前後と一定である (Fig. 5) ため、投与3日目には血漿中濃度は steady state に達していると推測される。

今回 HPLC で測定した血漿中濃度および尿中排泄量を、同一の試料を bioassay で測定した川合らの結果²⁾と比較したところ、未変化体だけでは bioassay より低値であったが、未変化体と oxo 体の合計値は、bioassay とほぼ一致しており (Fig. 7)、bioassay の測定値は、未変化体と oxo 体の合計値を示しているとみなせた。これは、代謝物の抗菌活性は、oxo 体も含めて未変化体より1/3~1/10低いが、bioassay の検定菌 *E. coli* Kp に対してだけ、oxo 体の活性は未変化体とほぼ同等である²⁾ため、当然の結果といえよう。しかしながら、すでに述べたように、血漿中、尿中の代謝物は、未変化体より少ないことから、実験動物²⁾と同様ヒトにおいても、代謝物の *in vivo* での抗菌活性への関与は小さいものと考えられる。

類似の化学構造式を有する Norfloxacin のヒトにおける代謝³⁾は、AT-2266 のそれとよく類似しており、尿

Fig. 7 Comparison of plasma levels and urinary excretion of AT-2266 in man between a high-performance liquid chromatographic method and a thin-layer cup-plate method following single oral administration at a dose of 400 mg of AT-2266



Plottings are mean values \pm S. E. from 6 subjects.

中の代謝物組成もよく一致している。しかし、Norfloxacin 100, 200, 400, 800 mg 1回投与後の最高血清中濃度は、それぞれ0.39, 0.97, 1.37, 2.50 $\mu\text{g/ml}$ 、尿中排泄量は投与量の38, 39, 33, 37%と報告されており⁹⁾、同一投与量でAT-2266と比較すると、AT-2266の方が血漿中濃度も高く、尿中排泄量も多く、AT-2266の消化管吸収は、実験動物²⁾と同様ヒトにおいてもNorfloxacinより良好であると推測される。

謝 辞

本研究に際し、試料を御提供いただいた京都大学医学部結核胸部疾患研究所前川暢夫教授、川合満講師に深謝いたします。

(試験期間 昭和56年10月～57年3月)

文 献

- 1) 関根 豊, 山口俊和, 宮本美枝, 鈴木玲子, 吉田耕治, 南 明, 中村信一, 橋本昌久: AT-2266の生体内動態Ⅰ, ラット, イヌ, サル, ヒトにおける代謝。Chemotherapy 32 (S-3): 95~102, 1984
- 2) 山口俊和, 鈴木玲子, 関根 豊: AT-2266の生体内動態Ⅱ, 動物におけるAT-2266と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄。Chemotherapy 32 (S-3): 103~108, 1984

- 3) 川合 満, 他: AT-2266の臨床第一相試験。Chemotherapy 32 (S-3): 334~358, 1984
- 4) MATSUMOTO, J.; T. MIYAMOTO, A. MINAMIDA, Y. NISHIMURA, H. EGAWA & H. NISHIMURA: Pyridone-carboxylic acids as antibacterial agents, 3, J. Med. Chem. 27: 292~301, 1984
- 5) NAKAMURA, R.; T. YAMAGUCHI, Y. SEKINE & M. HASHIMOTO: Determination of a new antibacterial agent (AT-2266) and its metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 278: 321~328, 1983
- 6) YAMAOKA, K.; Y. TANIGAWARA, T. NAKAGAWA & T. UNO: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. J. Pharm. Dyn. 4: 879~885, 1981
- 7) 藤井敏彦, 古川日出男, 吉田耕治, 宮崎 亀, 橋本昌久: ¹⁴C 標識 AT-2266 のラットにおける体内動態, 第1報 1回投与試験。Chemotherapy 32 (S-3): 117~135, 1984
- 8) 尾崎敏夫, 内田 広, 入倉 勉: AM-715のヒトにおける代謝に関する研究—高速液体クロマトグラフィーによる—。Chemotherapy 29 (S-4): 128~135, 1981
- 9) 小川暢也, 内田 広, 村山 哲, 平井敬二, 大森康男, 阿部泰夫, 入倉 勉: AM-715の臨床第一相試験。Chemotherapy 29 (S-4): 136~145, 1981

PHARMACOKINETICS OF A NEW ANTIBACTERIAL AGENT AT-2266 III
PLASMA LEVELS AND URINARY EXCRETION
OF AT-2266 AND ITS METABOLITES IN MAN

TOSHIKAZU YAMAGUCHI, REIKO SUZUKI and YUTAKA SEKINE
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

AT-2266, a new Synthetic antibacterial agent, was administered orally to male healthy volunteers. Plasma levels and urinary excretion of AT-2266 and its metabolites were determined by high-performance liquid chromatography after single dosing (100, 200, 400 and 800 mg, each of 6 subjects) or consecutive dosings (400 mg twice a day for 7 days, 6 subjects). The results were as follows.

1. The unchanged AT-2266 and its metabolite M-2 were found in plasma, and other 4 metabolites M-1, M-3, M-4 and M-5 together with the unchanged drug and M-2 were detected in urine.
2. Mean plasma levels of the unchanged drug were maximal 1-2h after single dosing of 100, 200, 400 and 800 mg of AT-2266 with levels of 0.5, 1.6, 2.7 and 6.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively, in a dose-related manner, followed by a biphasic decrease with an apparent terminal elimination half-life of 5.4-5.8h. Mean plasma levels of M-2 were one tenth of those of the unchanged drug.
3. An average of 32.0% of the unchanged drug was bound to plasma protein.
4. A total amount of urinary excretion for 24h after single dosing was 53-59% of the dose. More than 80% of the urinary excretion was the unchanged AT-2266. Urinary excretion of the major metabolite M-2 was 1/5 or less of that of the unchanged drug, and those of other 4 metabolites M-1, M-3, M-4 and M-5 were less than 1.1% of the dose.
5. Plasma levels and urinary excretion were not significantly changed with or without food.
6. Mean peak level of the unchanged drug after consecutive dosings was 1.6 times higher than that after first dosing, but there were no significant changes in the elimination half-life and the ratios of M-2 to the unchanged drug in plasma and urine.
7. The results indicate that the antibacterial activity in man after single and consecutive oral administration of AT-2266 is mainly due to the unchanged drug.