

¹⁴C 標識 AT-2266 のラットにおける体内動態 第2報 反復投与試験

藤井敏彦・古川日出男・宮崎 亀・橋本昌久
大日本製薬株式会社総合研究所

ラットにおいて [¹⁴C]AT-2266 を1日1回、7日間反復経口投与を行い、その体内動態を検討した。

1) [¹⁴C]AT-2266 放射活性の血中濃度は、初回および最終投与後において基本的に同様であった。各投与後1時間における血中総放射活性濃度は2.5 μg eq./ml 前後であった。最終投与後1時間の血漿中未変化体は、総放射活性の約60%であった。

2) [¹⁴C]AT-2266 最終投与後1時間の組織内放射活性濃度は、被験組織のうち消化管、肝臓、腎臓、精嚢腺、前立腺で最も高かった。しかし、後者2組織は組織摘出時の尿による汚染、すなわち死後変化により高い濃度を示した可能性が強い。ほとんどの組織内濃度は血中濃度より高かったが、精巣、脂肪等はこれより低かった。脳中放射活性濃度は有意な検出限界以下であった。未変化 [¹⁴C]AT-2266 は肝臓、腎臓では総放射活性の70%以上、肺、心臓では90%以上であった。最終投与後24時間において、ほとんどの組織の放射活性濃度は検出限界以下、あるいは1 μg eq./g 以下であった。オートラジオグラフィーの結果は上記ラジオメトリーの結果と一致した。

3) 反復投与期間中および後において、尿および糞にそれぞれ約30%および60%の放射活性が排泄された。

4) 尿中放射活性の67%が未変化体で、21%がそのグルクロン酸抱合体であった。

5) [¹⁴C]AT-2266 を反復投与後の体内動態は、1回投与後のそれと基本的に同様であった。

以上の結果、反復投与によって [¹⁴C]AT-2266 放射活性の組織への蓄積、排泄の遅延、代謝の変動等をきたすものではなく、反復服用時の安全性を示唆するものであると考えられる。

AT-2266 [1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid] は、緑膿菌、セラチアを含むグラム陰性菌をはじめ、多くの細菌に対して広い抗菌スペクトルを有する新しい化学療法剤である^{1,2)}。前報³⁾で本剤のラットにおける1回経口投与後の吸収、分布、代謝、排泄について、¹⁴C 標識 AT-2266 を用いて詳細な検討を行い、その結果を報告した。

AT-2266 の消化管からの吸収は良好で、組織への移行性が優れ、体内に広く分布し、尿および胆汁を介して排泄され、尿中には未変化体およびその抱合体が主として排泄されることを明らかにした。本報告では、ラットにおける [¹⁴C]AT-2266 反復投与後の体内動態を検討した結果について報告する。

I. 実験方法

1. 標識化合物

前報³⁾と同様、当研究所で合成された放射化学的純度99%以上の[ethyl-1-¹⁴C]AT-2266⁴⁾を非標識 AT-2266 で適宜希釈し、0.2%カルボキシメチルセルロース懸濁液として用いた。

2. 実験動物

体重約200gの雄性Wistar系ラットを用いた。実験期間中は代謝ケージ中で飼育し、水、食餌は自由に摂取させた。

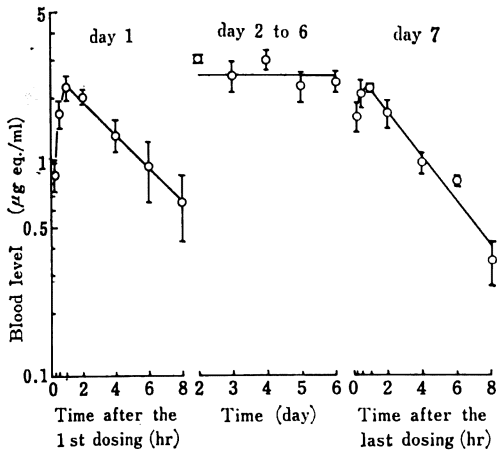
3. 動物実験

[¹⁴C]AT-2266 を50 mg/kg (ラジオメトリー: 54.5 μCi/kg, オートラジオグラフィー: 90 μCi/kg) 1日1回、7日間反復経口投与を行った。初回および最終投与後は経時的に、また2~6日目は投与後1時間に、尾静脈より採血した。尿および糞は代謝ケージで毎日分離採取した。7回投与後1時間および24時間で腹部大動脈より全採血を行い、ラットを脱血死させ、組織、臓器を摘出し、計測による分布実験の試料とした。また上記時間でラットをエーテル吸入により殺処分し、オートラジオグラフィーを行った。

4. 放射活性測定

生物試料を前報³⁾と同様に処理し、Packard TriCarb 液体シンチレーションスペクトロメーター、Model 3380 (Packard 社製)にて液体シンチレーション測定を行った。

Fig. 1 Blood levels of radioactivity following daily oral dosings of [¹⁴C]AT-2266 in rats



Each point is a mean of 3 rats \pm S. E. Rats received 7 consecutive daily dosings of [¹⁴C]AT-2266 (54.5 μ Ci/50mg/kg). Blood levels from day 2 to 6 were determined 1 hr after each dosing.

5. オートラジオグラフィ

前報³⁾と同様に、Kodak SB film (Kodak 社製)を用いて行った。密着期間は48日間である。

6. 代謝

尿、血漿、主要組織については、代謝物の薄層クロマトグラフ (TLC) パターンを前報³⁾と同様にして分析、検討した。

II. 実験結果および考察

1. 血中濃度

[¹⁴C]AT-2266, 50 mg/kg を初回経口投与後、血中総放射活性は1時間で2.2 μ g eq./ml と最大に達し、以後半減期3.8時間で消失した (Fig. 1)。投与2回目から最終投与7日目まで各投与1時間後の血中濃度は約2.5 μ g eq./ml とほぼ一定であった。さらに最終投与後の血中濃度は初回投与とほぼ類似した推移を示し、半減期2.8時間で消失した。これらの結果は既報の1回投与の実験結果³⁾と比較しても、消失パターンや濃度に特に大きな変化を認めるものではなかった。

2. 体内分布

1) ラジオメトリー

[¹⁴C]AT-2266 を50 mg/kg, 1日1回7日間反復経口投与後1時間では、組織内放射活性は消化管を除くと腎臓が最大で、ついで精囊腺、前立腺、肝臓の順で、血漿の6~3倍であった (Table 1)。すでに前報³⁾で報告し

Table 1 Tissue levels of radioactivity after 7 oral consecutive daily dosings of [¹⁴C]AT-2266 (54.5 μ Ci/50 mg/kg) in rats

Tissue	Time after the last dosing (hr)	
	1	24
	μ g eq./g tissue	
Blood	2.4 \pm 0.3	*
Plasma	3.2 \pm 0.4	*
Red blood cells	1.4 \pm 0.2	*
Brain	*	*
Eye ball	0.7 \pm 0.0	*
Tongue	4.3 \pm 0.3	*
Heart	3.6 \pm 0.2	*
Lung	3.6 \pm 0.2	*
Spleen	4.7 \pm 0.4	*
Thymus	3.5 \pm 0.2	*
Aorta	5.1 \pm 2.6	*
Harderian gland	1.3 \pm 0.2	*
Submaxillary gland	5.6 \pm 0.5	*
Pancreas	6.3 \pm 0.3	*
Hypophysis	*	*
Adrenal	2.6 \pm 0.3	*
Testicle	1.1 \pm 0.1	*
Epididymis	2.5 \pm 0.1	*
Seminal vesicle	15.9 \pm 2.5	*
Prostate	13.8 \pm 4.2	*
Liver	11.7 \pm 2.6	0.8 \pm 0.1
Kidney	18.0 \pm 2.0	0.5 \pm 0.0
Stomach	22.4 \pm 5.2	*
Small intestine	42.4 \pm 3.9	*
Large intestine	3.0 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3
Muscle	3.1 \pm 0.4	*
Fat	0.8 \pm 0.3	*
Bone	4.3 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
Trachea	4.3 \pm 0.3	*
Skin	2.8 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3

Values are means of 3 rats \pm S. E.

* <0.3; Sample radioactivity was less than 70 dpm (under reliable limit).

たと同様に、AT-2266 の組織移行性は良好で、反復投与後においても血漿と同程度かあるいはより高い濃度が認められた。しかし精巣、脂肪等では血漿中濃度より低かった (Table 1)。以上の結果を1回投与時と比較すると、精囊腺、前立腺濃度において1回投与時より高く、差が認められた。しかし、死亡直後のラット膀胱内に色素溶液を大量注入するとこれらの組織の一部が濃染されるが、生存ラットではこのような変化は認められないこと、

Fig. 2 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the rat 1 hr after 7 consecutive daily dosings of [¹⁴C]AT-2266 (90 μCi/50mg/kg, p.o.)

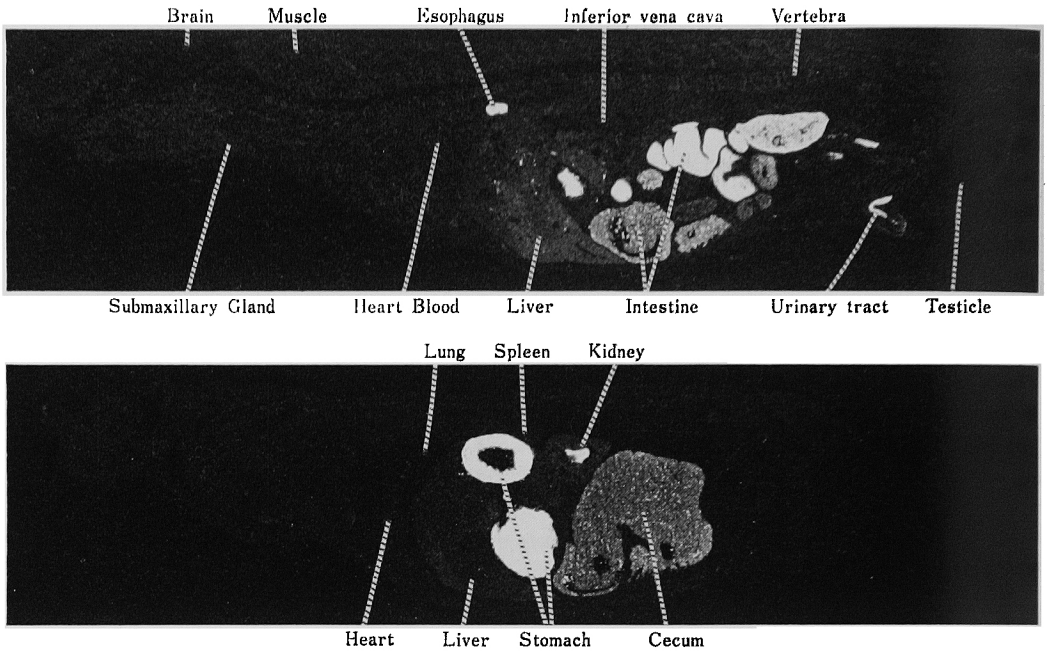
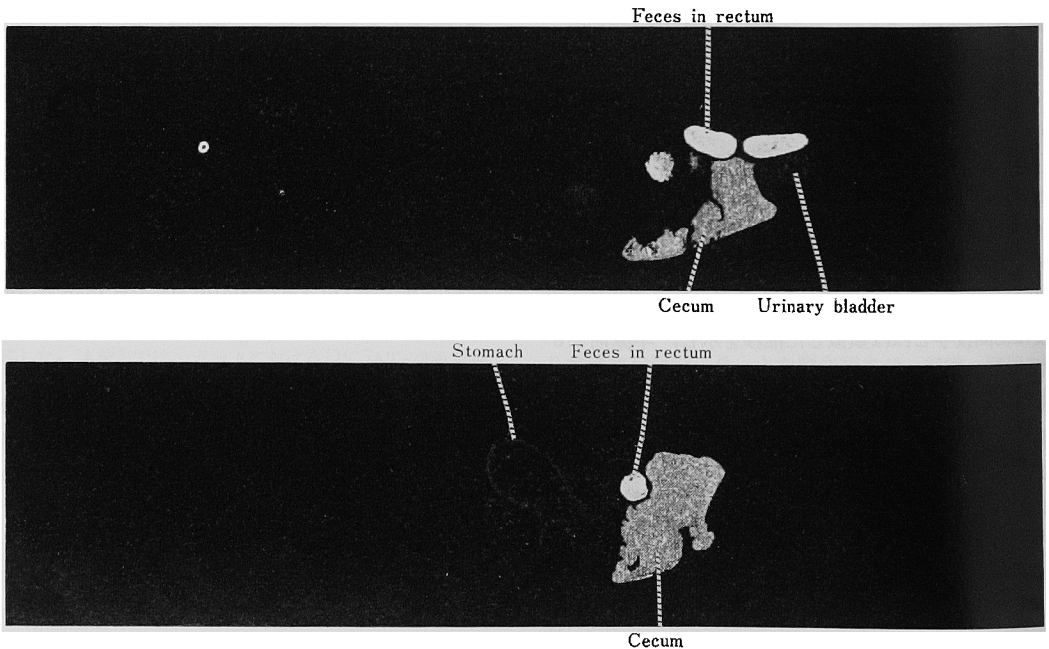


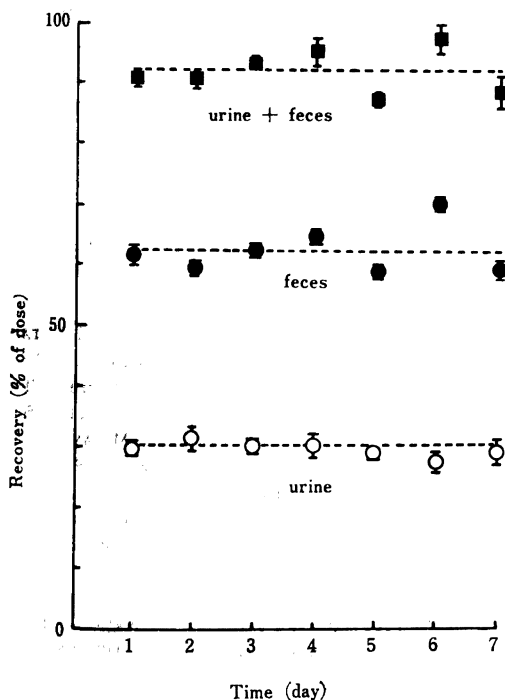
Fig. 3 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the rat 24 hr after 7 consecutive daily dosings of [¹⁴C]AT-2266 (90 μCi/50 mg/kg, p.o.)



オートラジオグラム (Fig. 2) 上、高濃度に放射活性が分布するのはこれらの組織の一部で、上記色素濃染部と一致すること、1回投与時におけるこれらの組織中濃度の変動も著しいことなどから、精囊腺、前立腺が高い放射活性濃度を示したのは放射活性を含む膀胱尿による逆行性汚染、すなわちラット解剖時の膨脹膀胱の退縮による一種の死後変化である可能性が強いと考えられる。オートラジオグラム (Fig. 2) 上、これらの組織へは筋肉と同程度の移行を示した。これらの組織を除けば、反復投与後の分布パターンは1回投与後とほぼ同様であった。

最終投与24時間後では、全身の大部分の組織の放射活性は有意な濃度 ($0.3 \mu\text{g eq./g}$) 以下に減少したが、肝臓、腎臓、大腸、皮膚に極めて低い放射活性が検出された。また [^{14}C]AT-2266 放射活性の回収率 (Table 2) は全身のうち屍体に 0.3%、大腸内容物に約 4% が認められたのみで、放射活性のほとんど全量が体外に排泄されていた。

Fig. 4. Excretion of radioactivity in urine and feces following daily oral dosings of [^{14}C]AT-2266 in rats



Each point is a mean of 3 rats \pm S. E. Rats received 7 consecutive daily dosings of [^{14}C]AT-2266 ($54.5 \mu\text{Ci}/50 \text{ mg/kg}$).

Table 2 Recoveries of radioactivity after 7 oral consecutive daily dosings of [^{14}C]AT-2266 ($54.5 \mu\text{Ci}/50 \text{ mg/kg}$) in rats

Tissue	Time after the last dosing (hr)	
	1	24
	% of dose	
Blood	0.3 ± 0.0	—
Liver	1.0 ± 0.2	—
Kidney	0.3 ± 0.0	—
Stomach	0.2 ± 0.0	—
Small intestine	2.6 ± 0.2	—
Large intestine	—	—
Contents of Stomach	38.2 ± 3.6	—
Small intestine	30.0 ± 4.2	—
Large intestine	1.2 ± 0.6	4.3 ± 2.0
Other tissues*	0.2 ± 0.0	—
Carcass		0.3 ± 0.1
Urine		29.4 ± 2.1
Feces		59.1 ± 1.5
Total		93.3 ± 1.0

Values are means of 3 rats \pm S. E. — < 0.1

*; brain, eye ball, tongue, heart, lung, spleen, thymus, Harderian gland, submaxillary gland, hypophysis, adrenal, testicle, epididymis, seminal vesicle and prostate

Empty column indicates no determination.

2) オートラジオグラフィ

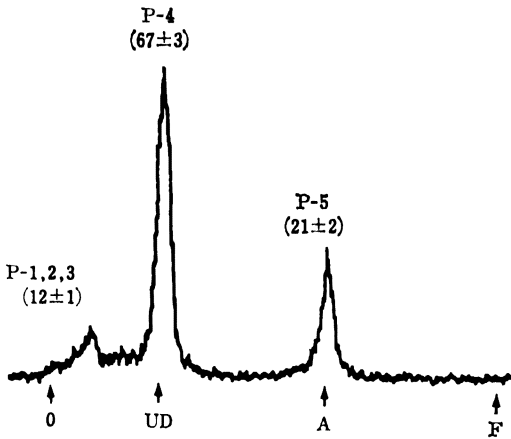
Fig. 2 および 3 に 7 日間反復経口投与後、それぞれ 1 時間および 24 時間後のラット全身オートラジオグラムを示す。最終投与後 1 時間における放射活性の分布は、1 回投与後のオートラジオグラムとほとんど同様で、かつ上記ラジオメトリーの結果ともよく対応した。24 時間後では消化管内容物を除いて、一般の体組織には放射活性は検出されなかった。この結果もラジオメトリーの結果とよく対応し、オートラジオグラム上、特記すべき所見は認められなかった。

以上のように、ラジオメトリーおよびオートラジオグラフィによる反復投与後の [^{14}C]AT-2266 放射活性の分布に関する知見は、1 回投与後の知見³⁾とほとんど変わらず、反復投与による蓄積性などを示唆するものではなかった。

3. 排泄

[^{14}C]AT-2266, 50 mg/kg を反復投与期間中および最終投与 24 時間で、尿および糞中にそれぞれ約 30%、

Fig. 5 Radiochromatogram of rat urine after 7 oral consecutive daily dosings of [14 C]AT-2266



O ; origin, F ; solvent front, UD ; unchanged AT-2266, A ; amide (represents glucuronide of AT-2266 due to ammonolysis). Values in parenthesis represent % of urinary radioactivity. Solvent ; ethyl acetate/benzene/methanol/ammonia water (5/1/3/2)

約60%と、ほぼ一定の割合で放射活性が回収され (Fig. 4), 1回投与後²⁾とよく対応し、排泄の遅延等の変化は認められなかった。

4. 代謝

Fig. 5 より明らかなように、最終投与後24時間尿中には、主放射活性ピークが2種と1~2種の少量成分が認められた。主放射活性ピークの一方は、その Rf 値から未変化体であり、もう一方は前報²⁾で明らかにしたように Ammonolysis 等の TLC 上の挙動から未変化体のグルクロン酸抱合体と同定した。これらは尿中放射活性のそれぞれ67%, 21%を占めた。このように尿中代謝物の組成は1回投与後のそれ (未変化体約55%, 抱合体約30%) とよく類似していた。

一方、組織中代謝物の分析結果 (Table 3) から、最終投与後1時間の血漿中の未変化体は約60%, 肝臓、および腎臓中では約70%であった。しかし、排泄、代謝と直接関係しない組織である心臓、肺では90%以上が未変化体で、1回投与後の結果とよく一致した。

以上のように反復投与後の AT-2266 の代謝パターンに、1回投与に比較して特に変化は認められず、したがって本実験条件下では、AT-2266 による代謝の変動等

Table 3 Contents of unchanged AT-2266 determined by radiochromatography in rat tissues 1 hr after 7 oral consecutive daily dosings of [14 C]AT-2266 (54.5 μ Ci/50 mg/kg)

Tissue	Unchanged drug content	Total radioactivity level	Unchanged Total
	μ g/g or ml	μ g eq./g or ml	
Plasma	1.9 \pm 0.3	3.2 \pm 0.4	0.59
Lung	3.6 \pm 0.2	3.6 \pm 0.2	1.00
Heart	3.4 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	0.94
Liver	8.5 \pm 1.5	12 \pm 3	0.71
Kidney	13 \pm 2	18 \pm 2	0.72

Values are means of 3 rats \pm S. E.

の顕著な変化は生じないものと考えられる。

5. 総括

以上のように、[14 C]AT-2266 をラットに反復経口投与後の血中濃度、体内分布、排泄、代謝は、1回投与後のそれと基本的に変るものではなかった。すなわち、反復投与時においても本剤は吸収、組織移行性が良好で、尿中に主に未変化体として排泄されることが示された。このことは本剤の化学療法剤としての有用性を支持するものであると共に、反復投与によって、本剤が体内組織に蓄積傾向を示したり、排泄の遅延やその代謝に変化をきたしたりするものではないことを示し、反復服用時の安全性を示唆するものであろう。

(実験実施期間：1981年4月~6月)

文 献

- 1) SIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, S. INOUE, K. NAKATA & Y. SAKAGUCHI : AT-2266, A new oral antipseudomonal agent. *Current Chemotherapy and Infectious Disease*: 451~454, 1980
- 2) MATSUMOTO, J.; T. MIYAMOTO, A. MINAMIDA, Y. NISHIMURA, H. EGAWA & H. NISHIMURA : Structure activity relationships of 4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acids including AT-2266, a new oral antipseudomonal agent. *Current Chemotherapy and Infectious Disease* : 454~456, 1980
- 3) 藤井敏彦, 古川日出男, 吉田耕治, 宮崎 亀, 橋本昌久 : 14 C 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
- 4) 景本 昭, 根来利行, 中尾全志, 関根 豊, 橋本昌久 : [Ethy1- 14 C] AT-2266 およびその関連化合物の合成. *Chemotherapy* 32(S-3) : 147~153, 1984

DISPOSITION AND METABOLISM OF [^{14}C]AT-2266
II. REPEATED ADMINISTRATION

TOSHIHIKO FUJII, HIDEO FURUKAWA, HISASHI MIYAZAKI
and MASAHISA HASHIMOTO
Research Laboratory, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Disposition and metabolism of [^{14}C]AT-2266 were studied after 7 oral consecutive daily dosings in rats.

1. Blood levels of [^{14}C]AT-2266 radioactivity after the initial and final administration were essentially similar to each other. Levels 1 hr after each dosing were around $2.5\mu\text{g eq./ml}$. Unchanged [^{14}C]AT-2266 accounted for about 60% of total radioactivity in plasma 1 hr after the last administration.

2. Tissue levels of [^{14}C]AT-2266 radioactivity 1 hr after the last administration were the highest in the digestive tract, liver, kidney, seminal vesicle and prostate among organs examined (the latter two, however, being mostly attributed to artifact caused by urine contamination after sacrifice of animals for autopsy). Most of tissue levels were higher than blood level but were lower in such tissues as testicle and fat. The brain level was under reliable limit of detection. Unchanged [^{14}C]AT-2266 accounted for $>70\%$ of total radioactivity in the liver and kidney, and $>90\%$, in lung and heart. Levels in most tissues were not detected or $<1\mu\text{g eq./g}$ 24hr after the last administration. Autoradiographic findings agreed with above radiometric findings.

3. About 30 and 60% of dosed radioactivity were excreted in urine and feces, respectively, during and after repeated administration.

4. About 67% of urinary radioactivity were derived from the unchanged [^{14}C]AT-2266 and about 21%, its glucuronide.

5. Disposition and metabolism of [^{14}C]AT-2266 after repeated administration were thus essentially similar to those after single administration reported previously. The results suggest that none of any significant accumulation of [^{14}C]AT-2266 radioactivity in tissues, any delay in excretion and metabolic alteration occurs even after repeated administration, implying its safety in long term administration.