

AT-2266 の生体内動態 I

ラット, イヌ, サル, ヒトにおける代謝

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

大日本製薬株式会社総合研究所

AT-2266 をラット, イヌ, サル, ヒトに経口投与した後の尿中代謝物について検討し, 以下の知見を得た。

1. 動物およびヒトの尿中には, 未変化体の他に, ピペラジン環が代謝をうけた amino 体(M-1), oxo 体(M-2), formyl 体(M-3), acetyl 体(M-4), ethylenediamino 体(M-5) が排泄された。ラットでは, この他に AT-2266 のグルクロン酸抱合体が検出された。
2. 代謝物の量は, クロマトグラムより判断して, 未変化体の量に比較して少量であった。
3. 代謝物の *in vitro* 抗菌スペクトルは, AT-2266 と同様であったが, 抗菌活性は未変化体より低かった。

AT-2266 (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid, Fig. 1) は, グラム陰性菌および陽性菌に対して, 強い抗菌活性を示す新しいピリドンカルボン酸系抗菌物質¹⁾で, *in vitro* では Nalidixic acid (NA), Piromidic acid (PA), Pipemidic acid (PPA) より抗菌作用が強く, Norfloxacin (NFLX) とほぼ同じ程度であるが, *in vivo* ではこれら 4 薬剤より優れている²⁾。

今回, AT-2266 の生体内動態試験の一環として, ラット, イヌ, サルおよびヒトにおける代謝について検討したので, その結果を報告する。

I. 実験材料および方法

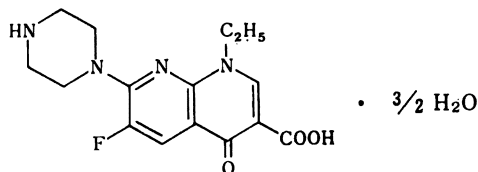
1. 薬剤および試薬

AT-2266 (Lot No. T81008) および代謝物の標品 7-amino-1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-1), 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(3-oxo-1-piperazinyl)-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-2), 1-ethyl-6-fluoro-7-(4-formyl-1-piperazinyl)-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-3), 7-(4-acetyl-1-piperazinyl)-1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-4) および 7-(2-aminoethylamino)-1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-5) は, 大日本製薬総合研究所で合成されたものを使用した¹⁾。

β -glucuronidase (type 1 および H-1) は Sigma 社から, ethyl chloroformate は東京化成工業(株)から購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 試料の採取

Fig. 1 Chemical structure of AT-2266



動物は SD 系雄性ラット (体重 180~215 g), 雄性ビーグル犬 (12~15 kg) および雌性カンクイザル (2.7~3.8 kg) を用いた。投与液は AT-2266 を 0.5% トラガント液に懸濁し, 50 mg/kg で 1 回経口投与した。

AT-2266 投与後, 動物を 1 匹ずつ代謝ケージに入れ, 24 時間尿を採取した。

ヒトの尿は, 川合³⁾から提供された健康人被験者に AT-2266 400 mg を 1 回経口投与した際の 24 時間尿で, 臨床第一相試験実施時のものを用いた*。

3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置は Waters 製 ALC/GPC204 型液体クロマトグラフを用いた。カラムは μ Bondapak C18 (Waters, 内径 4 mm, 長さ 30 cm) を用い, 移動相はメタノール-5% 酢酸-アセトニトリル (6:10:1 v/v) で, 流速 1.5 ml/min, 検出波長 340 nm で分析した。

4. 質量分析計

マススペクトル (MS) の測定は, JEOL D-300 マス

* 尿中抱合代謝物検討用には 排尿直後の新鮮尿を用い, 不安定な抱合代謝物の排泄についても検討した。

ペクトロメーター（日本電子）を用い、EI モードでイオン化電圧 70V で行った。

5. 代謝物の検索

尿 10 ml に M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml を加えた後、クロロホルム (A) または 1% ethyl chloroformate 含有クロロホルム (B) で AT-2266 および代謝物の抽出を行った。有機層 8 ml を減圧下濃縮乾固し、残渣をメタノールに溶解後、その一部を HPLC に注入した。得られたクロマトグラムを同様に処理したコントロール尿のそれと比較検討した。

尿中抱合体の検索は、尿を β -glucuronidase, 1N 塩酸または 1N 水酸化ナトリウムで加水分解後、上述の方法で 1% ethyl chloroformate 含有クロロホルム抽出することにより行った。

6. 代謝物の分離

分離法の概要を Chart 1 に示す。各有機層を減圧下濃縮乾固し、残渣をメタノールに溶解し、HPLC に注入、各代謝物を分取した。得られた分画を濃縮後クロロホルムで抽出し、MS 測定の試料に供した。なお、各代謝物の純度は HPLC で検討し、必要あれば HPLC で精製を繰り返した。

7. AT-2266 および代謝物の分配比

AT-2266 または代謝物の水溶液 (0.2M リン酸緩衝液, pH 7.4, 濃度は各々 5 μ g/ml) 3 ml にクロロホルム 3 ml を加え、室温で 30 分間振盪する。遠心分離後、水層の薬物濃度を HPLC で測定し、振盪前後の濃度から水・クロロホルム間の分配比を算出した。

8. 代謝物の抗菌活性

代謝物の抗菌活性は、日本化学療法学会制定の MIC 測定法により測定した。

II. 結 果

1. 尿中代謝物の検索

ラット、イス、サルおよびヒトの尿を、中性 (pH 7.4) でクロロホルム (A) または 1% ethyl chloroformate 含有クロロホルム (B) で抽出した時の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示す。図から明らかなように、各動物ともコントロール尿と比較して、A では 5 個、B では 6 個のピークが認められた。A の保持時間 (t_R) 2.9 分の最大のピークは、B では t_R 42.8 分に移動しており、これらはそれぞれ未変化体およびその ethyl carbamate の t_R に一致することから、尿中に未変化体の排泄が推定された。A のクロマトグラムにみられる残り 4 つのピークは、いずれも B のクロマトグラムでも認められる。これらを t_R の順に M-1~M-4 と、また B の t_R 10.8 分のピーク

Chart 1 Separation procedure for metabolites of AT-2266 in urine

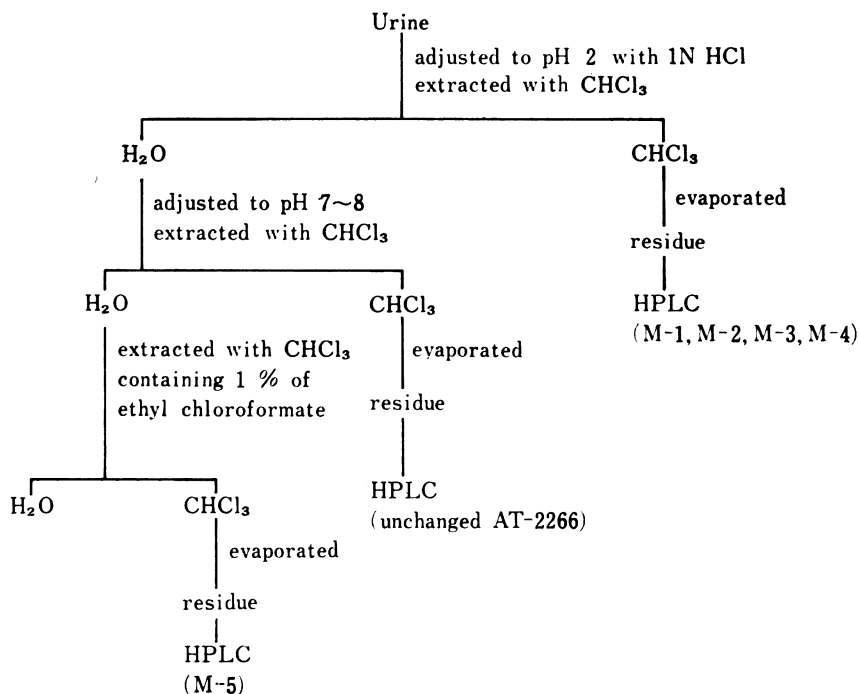
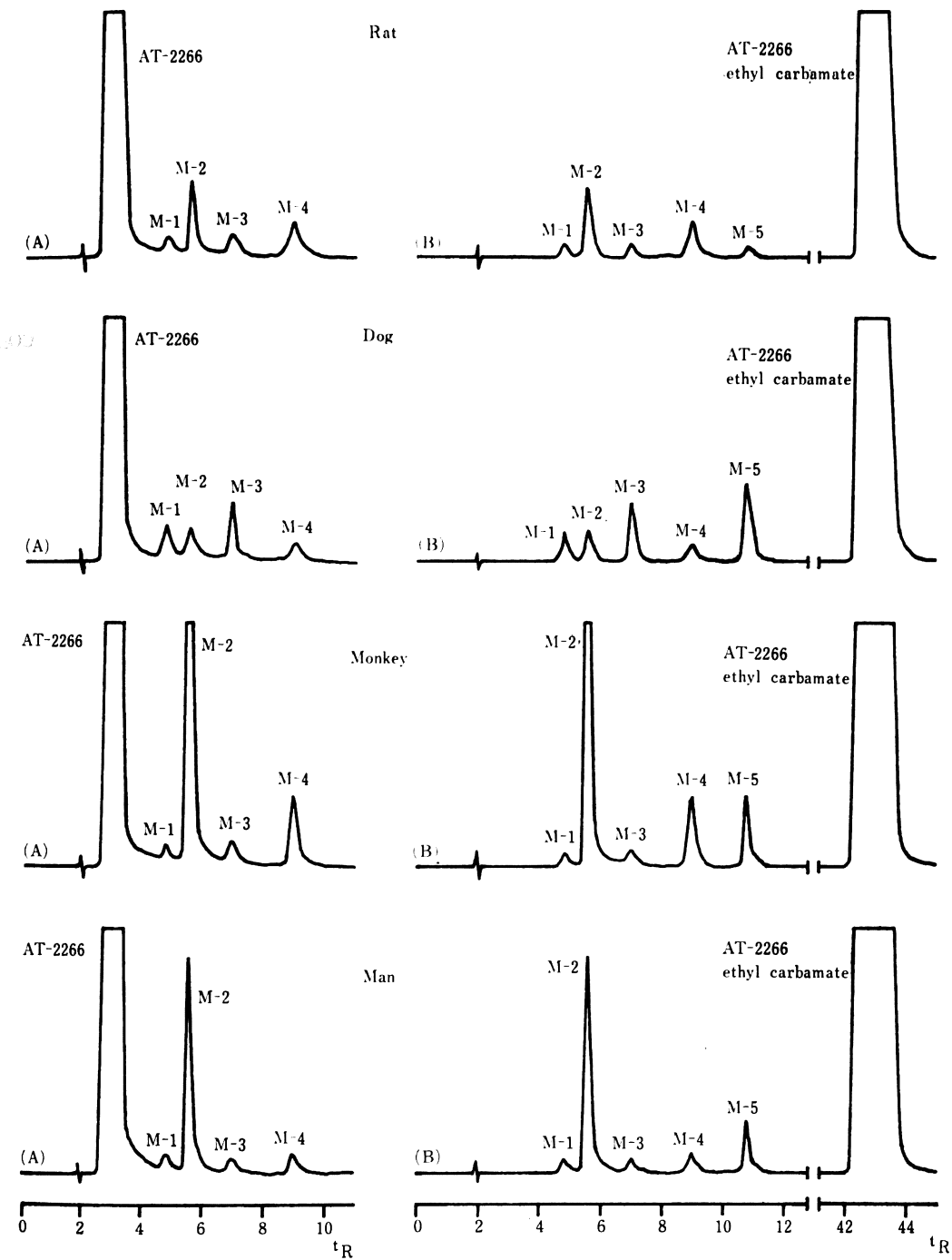


Fig. 2 Typical chromatograms of urine extracted with (A) chloroform and (B) chloroform containing 1% of ethyl chloroformate



を M-5 と命名した。なお、M-1~M-4 は、A、B とともに同一の t_R をあたえることより、ethyl chloroformate で誘導化されない代謝物で、ピペラジン環の窒素の塩基性が消失している。

ラット、イヌ、サルおよびヒトの尿を、 β -glucuronidase、酸、アルカリで加水分解後、1% ethyl chloroformate 含有クロロホルムで抽出し、HPLC で検討したところ、イヌ、サルおよびヒトの尿では、未処理の場合とピーク強度に変化が認められなかったが、ラットの尿では、いずれの処理でも未変化体のピーク強度が約 1.5 倍増加し、ラット尿中には未変化体のグルクロン酸抱合体が存在した。なお、抽出後の水層を HPLC に注入しても、コントロール尿に対して有意なピークは認められなかった。

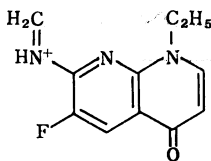
2. 代謝物の同定

代謝物の同定は、尿の採取しやすいイヌを用いてまず行った。M-1~M-4 はピペラジン環の塩基性が消失していることより、酸性下クロロホルム抽出し、未変化体は酸性下抽出されないため、尿の pH を中性にもどし、クロロホルム抽出した。さらに、M-5 は酸性および中性で抽出されないため、1% ethyl chloroformate 含有クロロホルム抽出することにし、Chart 1 の分離法を確立した。分離した未変化体および代謝物 (M-1~5) の MS を Fig. 3 に示す。

AT-2266 MS は Fig. 3a に示したように、 m/z 320 (M^+) および 276 (M^+-44)、234 ($M^+-44-42$) がみられ、これらは標品の MS と一致したことより、未変化の AT-2266 と同定した。なお、 M^+-44 は AT-2266 より CO_2 の脱離したフラグメントイオンであり、 $M^+-44-42$ は脱炭酸後ピペラジン環からさらに $CH_2=N-CH_2$ が脱離したイオンである。

M-1 MS は m/z 251 (M^+) および 207 (M^+-CO_2) を示し (Fig. 3b)、 $-COOH$ は存在する。AT-2266 の M^+ より 69 質量数少なく、すでに述べたようにピペラジン環の塩基性が消失していることより、ピペラジン環が脱 diethylamino 化したアミノ基となった構造が推定される。標品の MS と一致したことより、amino 体と同定した。また、HPLC の t_R も一致した。

M-2 M^+ は AT-2266 より 14 質量数多い m/z 334 をあたえ、 m/z 290 (M^+-CO_2) も示す (Fig. 3c) ことから、 $-COOH$ は保持されている。 m/z 220 (M^+-CO_2-70) は、PPA⁹⁾ と同様のフラグメントイオンで、右図の構造を有し、



oxo 体や acyl 体で特徴的にみられる¹⁾。M-2 も酸性代謝物で、ethyl chloroformate で誘導化されないこと等も考慮して、3-oxo 体が推測された。標品と比較したところ、MS および HPLC の t_R が一致したことより、3-oxo 体と同定した。

M-3 MS は m/z 348 (M^+) および 304 (M^+-CO_2) を示した (Fig. 3d)。 M^+ は AT-2266 より 28 質量数多く、さらに m/z 220 もみられることから、ピペラジン環が変化した代謝物と考えられた。前述のようにピペラジン環の塩基性が消失していることから、ピペラジン環の窒素が formyl 化されたものと推定された。標品と MS および HPLC の t_R が一致したことより、formyl 体と同定した。

M-4 MS (Fig. 3e) は m/z 362 (M^+)、318 (M^+-CO_2) と、M-3 よりも 14 質量数多く、さらに m/z 220 もみられることから、acetyl 化されたものと推定された。標品との比較で、MS および HPLC の t_R が一致したことより、acetyl 体と同定した。

M-5 M-5 は酸性および中性ではクロロホルム抽出されず、ethyl chloroformate を添加することにより抽出された (Fig. 2) ため、分取した化合物は、1 級または 2 級アミンの ethyl carbamate と推測される。 M^+ は m/z 366 をあたえ、 m/z 322 (M^+-CO_2) も示す (Fig. 3f) ことから、 $-COOH$ は存在する。さらに m/z 220 がみられたため、naphthyridine 骨格は代謝をうけていない。 m/z 276 は m/z 322 から C_2H_5OH が脱離したフラグメントイオンで、 m/z 220 はさらに $CONCH_2$ が脱離したイオンであるため、M-5 はピペラジン環が開環した ethylenediamino 体と推測される。ethyl chloroformate 処理した標品との比較で、MS および HPLC の t_R が一致したことより、ethylenediamino 体と同定した。

以上、イヌの尿から分取した AT-2266 とその代謝物の構造について記述したが、ラット、サルおよびヒトの尿中からも、同じく M-1~M-5 の代謝物を同定した。これらの結果より AT-2266 の推定代謝経路を Fig. 4 にまとめた。

3. AT-2266 および代謝物の分配比

代謝物の分配比は、ethylenediamino 体 (M-5) とグルクロン酸抱合体を除き、未変化体より 2~100 倍高く (Table 1)、見かけ上脂溶性が増加した。

4. 代謝物の抗菌活性

代謝物 (M-1~M-5) は、AT-2266 と同様広い抗菌スペクトラムを示したが、抗菌活性は未変化体の 1/3~1/10 に低下した (Table 2)。

III. 考 察

Fig. 3 Mass spectra of AT-2266 and its metabolites

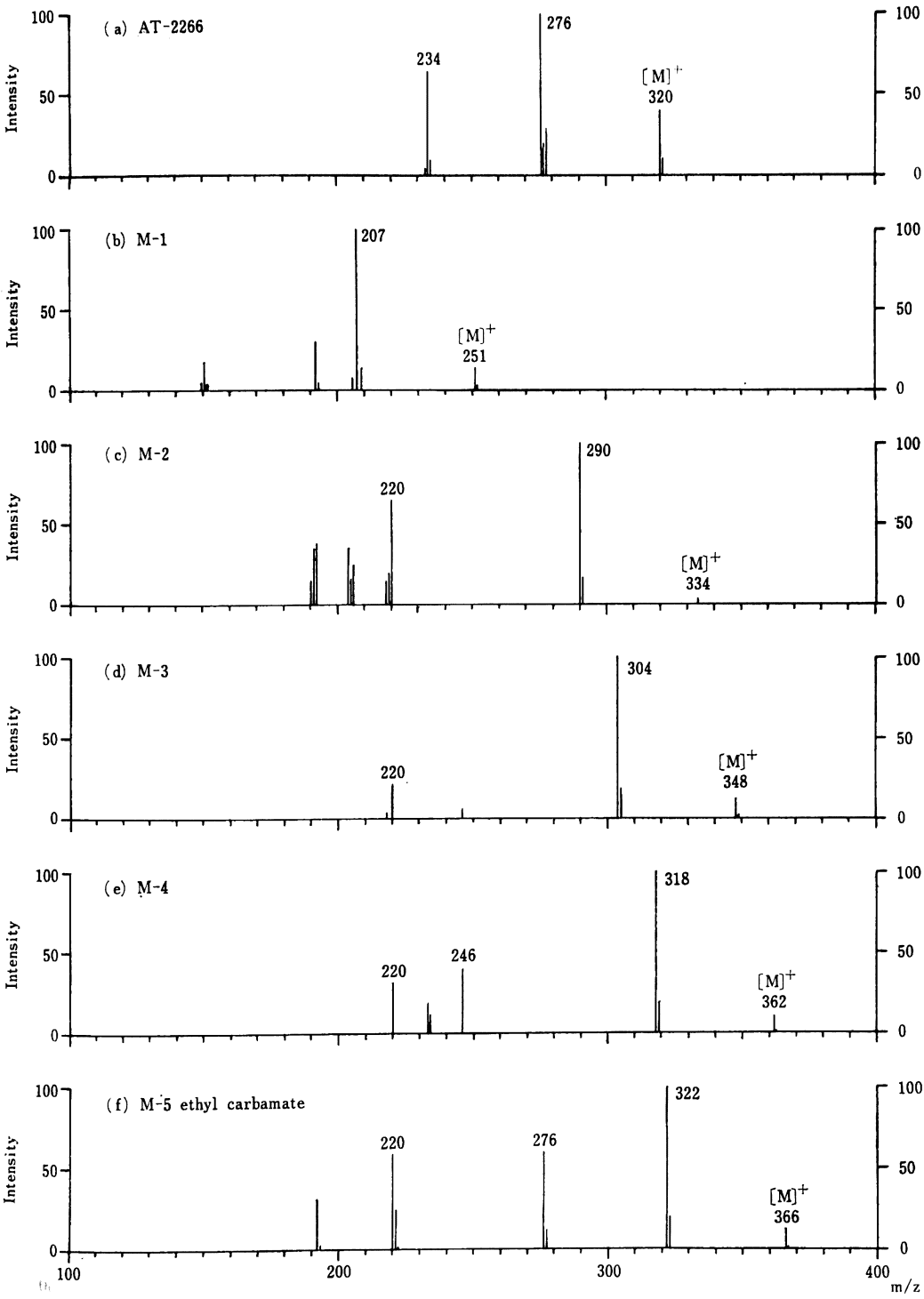
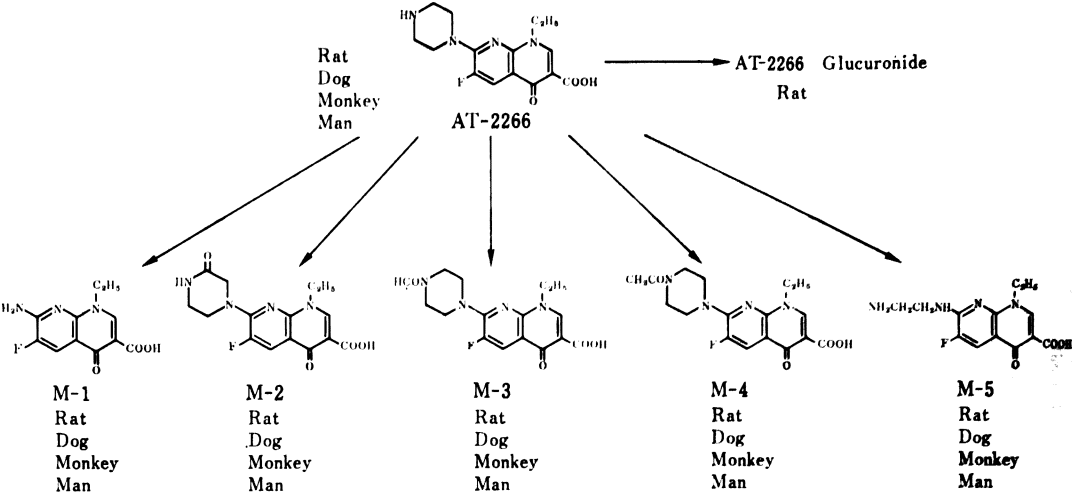


Fig. 4 Metabolic pathway of AT-2266 in rat, dog, monkey and man



AT-2266 を投与後のラット、イス、サル、ヒトの尿中には、未変化体のほか amino 体(M-1), oxo 体(M-2), formyl 体(M-3), acetyl 体(M-4), ethylenediamino 体(M-5)の5種の代謝物が、またラット尿中には、この他未変化体のグルクロン酸抱合体が同定された(Fig. 4)。いずれの動物でも未変化体の排泄量が最も多く、代謝物の量はFig. 2のクロマトグラムから推測して、総計でも10~20%と少なかったが、代謝物の組成には種差が認められた。

M-1 から M-5 は、いずれもピペラジン環が変換された代謝物である。M-2, M-3, M-4はそれぞれ環に oxo

Table 1 Partition ratio of AT-2266 and its metabolites

Metabolites	Partition ratio (CHCl ₃ /H ₂ O*)
AT-2266	0.9
M-1	2.9
M-2	2.0
M-3	40
M-4	>100
M-5	0
AT-2266 glucuronide	0

*0.2M phosphate buffer, pH 7.4

Table 2 Antibacterial activity of AT-2266 and its metabolites

Organism	MIC (μg/ml)					
	AT-2266	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5
<i>S. aureus</i> 209P, JC-1	0.39	>100	6.25	3.13	3.13	25
<i>E. coli</i> NIHJ, JC-2	0.2	1.56	0.78	1.56	3.13	6.25
<i>E. coli</i> Kp	0.1	1.56	0.1	0.2	0.39	3.13
<i>S. typhimurium</i> S-9	0.2	1.56	1.56	1.56	6.25	6.25
<i>S. flexneri</i> 2a EW10	0.2	3.13	1.56	3.13	6.25	6.25
<i>V. parahaemolyticus</i> S-1	0.2	6.25	3.13	1.56	3.13	6.25
<i>P. morganii</i> Kono	0.2	1.56	3.13	3.13	12.5	12.5
<i>K. pneumoniae</i> No. 13	0.2	6.25	6.25	3.13	6.25	25
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.2	3.13	3.13	3.13	6.25	12.5
<i>E. cloacae</i> 963	0.2	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25
<i>C. freundii</i> P-6802	0.2	6.25	3.13	3.13	12.5	25
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	0.39	6.25	12.5	6.25	25	6.25
<i>P. aeruginosa</i> Tsuchijima	0.78	50	12.5	12.5	50	50
<i>P. aeruginosa</i> No. 12	0.78	100	12.5	12.5	25	50

化, formyl 化, acetyl 化が起こっており, これは同様にピペラジン環を有する PPA⁵⁾, NFLX⁶⁾, 4-morpholino-2-piperazino thieno[3, 2-d] pyrimidine⁷⁾ でも報告されている。amino 体(M-1), ethylenediamino 体(M-5)はピペラジン環が開環し, 脱エチル化, 脱エチルアミノエチル化した代謝物で, NFLX⁶⁾ では両者とも, perphenazine⁸⁾ では後者の生成が報告されている。したがって, これら AT-2266 の代謝物は, ピペラジン環を有する化合物で一般にみられるもので, ピペラジン環に特有の代謝物であると考えられる。

ラットにおいて, AT-2266 のグルクロン酸抱合体が検出された。PPA^{5), 9)} や NFLX^{6), 10)} でも, ヒトでは検出されないが, ラットでは検出されており, 他の動物と異なり, ラットではピリドンカルボン酸系化合物でグルクロン酸抱合が生成しやすいものと推測される。

AT-2266 の代謝物は, ethylenediamino 体, グルクロン酸抱合体を除き, 未変化体より分配比(クロロホルム/0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.4))が大きく, 脂溶性が増加した(Table 1)。同様の傾向は PPA でも報告されており, これはピペラジン環の代謝により, その塩基性が消失したことがひとつの原因であろう。

代謝物は AT-2266 と同様の抗菌スペクトラムを示したが, 抗菌活性は 3~10 倍弱く (Table 2), PPA⁵⁾ や NFLX¹¹⁾ の場合と同様の傾向を示した。本剤投与後の尿中には, 動物¹²⁾, ヒト¹³⁾ともに未変化体が大部分で, 代謝物は少ないため, 代謝物の *in vivo* での抗菌活性への関与は小さいものと推測される。

代謝物の急性毒性は, マウスで検討されているが, AT-2266 と同様 5,000 mg/kg 以上と弱く¹⁴⁾, 代謝物の毒性面への関与も小さいものと考えられる。

(実験期間: 昭和54年4月~55年4月および昭和56年10月~56年11月)

文 献

- 1) MATSUMOTO, J.; T. MIYAMOTO, A. MINAMIDA, Y. NISHIMURA, H. EGAWA & H. NISHIMURA: Pyridone-carboxylic acid as antibacterial agents, 3. J. Med. Chem. 27: 292~301, 1984
- 2) 河野 薫, 井上松久, 三橋 進: ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤 AT-2266 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. Chemotherapy 32(S-3): 1~17, 1984
- 3) 川合 満, 他: AT-2266 の臨床第一相試験. Chemotherapy 32(S-3): 334~358, 1984
- 4) PORTER, Q. N. & J. BALDAS: Mass spectrometry of heterocyclic compounds. John Wiley & Sons, New York. 495~497, 1971
- 5) KUROBE, N.; S. NAKAMURA & M. SHIMIDZU: Metabolism of pipemidic acid in human urine. Xenobiotica 10: 37~46, 1980
- 6) 永津芳雄, 遠藤恭平, 入倉 勉: ¹⁴C 標識 AM-715 による代謝に関する研究. Chemotherapy 29(S-4): 119~127, 1981
- 7) PROX, A.; A. ZIMMER & H. MACHLEIDT: Rapid structure elucidation of drug metabolites by use of stable isotopes. Xenobiotica 3: 103~112, 1973
- 8) JAHNS, I. & U. BREYER: The rat brain as a "Deep compartment" in the kinetics of a common metabolite of prochlorperazine and perphenazine. Drug Metab. Dispos. 4: 522~529, 1976
- 9) 橋本昌久, 森野直宜, 宮崎 亀, 景本 昭: ¹⁴C 標識 pipemidic acid のラット, マウスにおける吸収, 分布, 排泄および代謝. Chemotherapy 23: 2693~2706, 1975
- 10) 尾崎敏夫, 内田 広, 入倉 敏: 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
- 11) 大森康男, 村山 哲, 阿部泰夫, 入倉 勉: Bioassay による AM-715 の体内濃度測定法に関する研究. Chemotherapy 29(S-4): 91~97, 1981
- 12) 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
- 13) 山口俊和, 鈴木玲子, 関根 豊: 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. Chemotherapy 32(S-3): 109~116, 1984
- 14) 仙田博美, 他: 未発表。

PHARMACOKINETICS OF A NEW ANTIBACTERIAL AGENT AT-2266 I METABOLISM OF AT-2266 IN RATS, DOGS, MONKEYS AND MAN

YUTAKA SEKINE, TOSHIKAZU YAMAGUCHI, MIE MIYAMOTO, REIKO SUZUKI,
KOJI YOSHIDA, AKIRA MINAMI, SHINICHI NAKAMURA and MASAHISA HASHIMOTO
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Metabolism of a new synthetic antibacterial agent AT-2266 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid] was investigated in rats, dogs, monkeys and man following single oral administration of AT-2266. Metabolites in 24-hour urine were identified by comparison with authentic materials using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. The results were as follows.

1. Five metabolites together with the unchanged AT-2266 were identified in urine of rats, dogs, monkeys and man: 7-amino-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-1); 1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(3-oxo-1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-2); 1-ethyl-6-fluoro-7-(4-formyl-1-piperazinyl)-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-3); 7-(4-acetyl-1-piperazinyl)-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-4) and 7-(2-aminoethylamino)-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (M-5). In rat urine, the glucuronic acid conjugate of the unchanged drug was also detected.

2. The amounts of the metabolites excreted in urine was less than that of the unchanged drug as judged by the chromatograms.

3. All metabolites except for the glucuronide showed a similar antibacterial spectrum to AT-2266, but their potency was about 3-10 times lower than that of AT-2266.