

## NY-198の体内動態III

—HPLC法によるサルにおける吸収、代謝、排泄—

永田 治・山田 健久・高橋 和余・桶崎 英一

北陸製薬株式会社 中央研究所

柳田 知司・中西 秀樹

(財)実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所

サルに NY-198 を 20mg/kg 経口投与し、NY-198 の吸収、代謝および排泄について HPLC 法により検討した。

NY-198 の平均血清中濃度は経口投与後 2 h で最高濃度 (Cmax) 4.49 $\mu$ g/ml に達し、以後半減期 2.86h で減衰した。

NY-198 経口投与後 96h までに NY-198 未変化体が尿中に 63.4%、糞中に 5.6% それぞれ排泄された。また、尿中濃度は投与後 24h にわたり概ね 60 $\mu$ g/ml 以上と高濃度であった。

サルの尿糞中には未変化体の他に、ピペラジン環が酸化的に代謝された M-III ~ M-VI の各代謝物がラット、イヌと同様検出された。また、この他に NY-198 のグルクロン酸抱合体 (M-II) も検出された。しかし、これらの代謝物の量は NY-198 未変化体の量に比較して僅かであった。

著者らはラット、イヌに  $^{14}$ C-NY-198 を経口投与し、その体内動態について検討した結果、NY-198 は経口投与後速やかに消化管 (主に小腸上部) からほぼ完全に吸収され、体内に広く分布した後、主として尿中へ排泄されることを明らかにした<sup>1)</sup>。

また、NY-198 は体内で代謝を受けにくく、約 90% が未変化体としてラットおよびイヌ尿中に排泄されることも報告している<sup>2)</sup>。

今回、著者らはサルに NY-198 を 20mg/kg 経口投与後の血清、尿、糞中 NY-198 未変化体濃度および尿、糞中代謝物濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定し、サルにおける NY-198 の吸収、代謝および排泄について検討したので報告する。

## I 実験材料および方法

## 1. 投与検体、合成標品および試薬

( $\pm$ )-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7- (3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride (NY-198) および合成標品である 7- [(2-aminoethyl) amino]-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-III), ( $\pm$ )-7- {[2- [(1-carboxyethyl) amino] ethyl] amino}-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-

IV), ( $\pm$ )-7- {[2- [(carboxymethyl) amino] propyl] amino}-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-V), ( $\pm$ )-7- [(2-aminopropyl) amino]-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-VI) は北陸製薬株式会で合成したものをを用いた。その構造を Fig. 1 に示す。

また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の溶媒は液体クロマトグラフィー用を、他の試薬は全て市販の試薬特級品を用いた。

## 2. 実験動物

体重 4 ~ 6 kg (生後 4 ~ 5 年) の雄性アカゲザル (実験動物中央研究所、自家繁殖させたもの) を 16h 絶食後使用した。尚、実験環境下 (室温 25 ~ 26°C, 湿度 55 ~ 61%) で約 2 週間予備飼育し、健康状態の良好なものを選び実験に供した。食餌は薬物投与後 6 h に摂取させた。予備飼育期間および非絶食実験期間中は固型飼料 (CMK-1, 日本クレア) 100g にビタミン C 30mg を添加したものを 1 日 1 回摂取させた。また、水はすべての期間において自由に摂取させた。

## 3. 投与量および投与方法

NY-198 の水溶液 (10mg/ml) を調製し、サルに 20mg/kg の用量でネラトンカテーテルにより、胃内へ強制投与した。

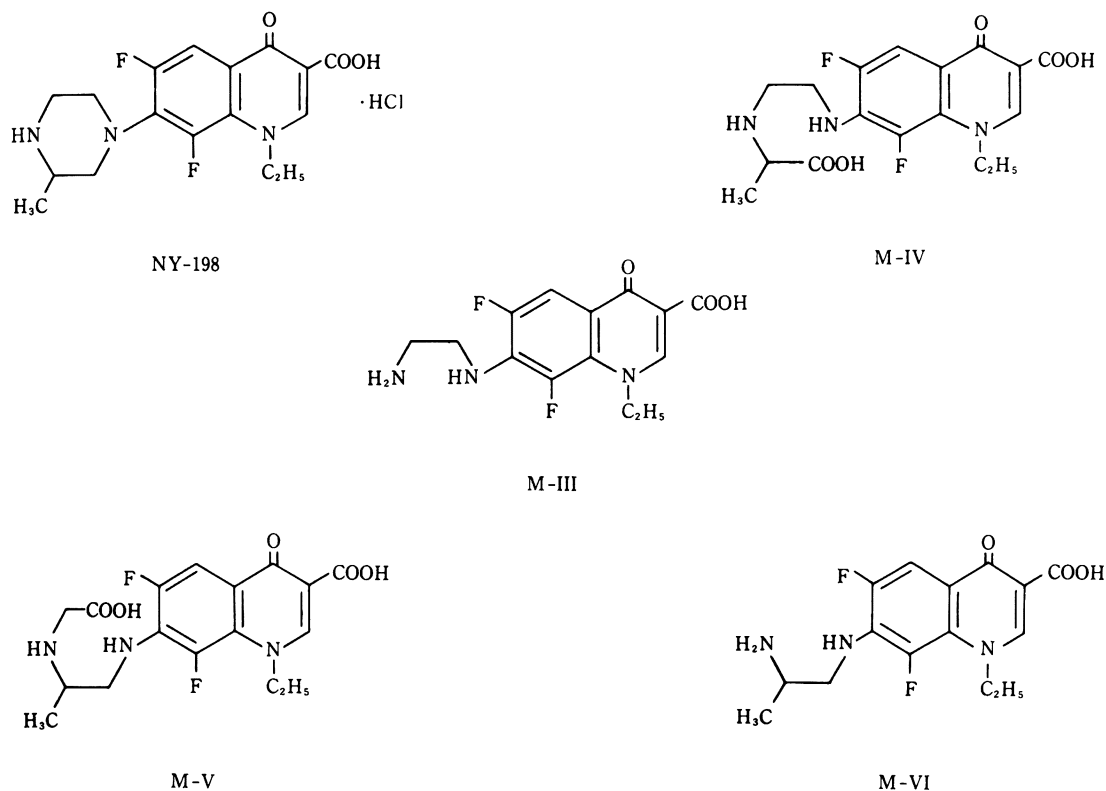


Fig. 1. Chemical structures of NY-198 and its metabolites

#### 4. 生体試料の採取

##### 1) 血液

股静脈又は前肢静脈より経時的に採血し、1 h 室温放置後遠心分離し、血清を採取した。

##### 2) 尿、糞

個別ケージにて自然排泄された尿および糞を経時的に採取した。

尚、採取した血清、尿および糞は定量時まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

#### 5. 糞抽出液の調製

糞中濃度測定に際し、採取した糞を当量の0.1N-HClでホモジナイズした。さらにホモジネートの3倍量の0.1N-HClを加えて振とう抽出する操作を3回行ない、抽出液を合わせた後、その一部を遠心分離(3000rpm, 10分)し、上清を糞抽出液として濃度測定に供した。

#### 6. 生体試料中濃度の測定

##### a) NY-198未変化体

血清および尿中NY-198未変化体濃度の測定はHPLC法<sup>3)</sup>により行なった。糞抽出液については0.1N-NaOHで中和後、尿中NY-198未変化体濃度の測定法に従って定量した。

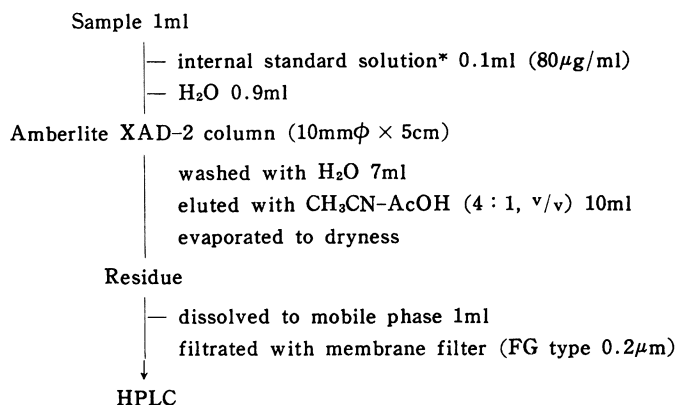
##### b) グルクロン酸抱合体 (M-II)

グルクロン酸抱合体の定量はNY-198未変化体の定量法に準じて行なった。すなわち、各試料に0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.0)および $\beta$ -glucuronidase (*Escherichia coli*, Type IX, 300units, Sigma)の同緩衝液溶液を加えて0.9mlとし、 $37^{\circ}\text{C}$ 、2 h インキュベートした後、内標準物質(I.S.: KK-123)の同緩衝液溶液0.1mlを添加し、以下NY-198未変化体の定量法に従って総NY-198 (NY-198未変化体+グルクロン酸抱合体)濃度を測定した。総NY-198濃度からNY-198未変化体濃度を差し引いてグルクロン酸抱合体濃度を求めた。

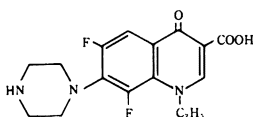
##### c) 代謝物 (M-III~M-VI)

各試料中代謝物濃度の測定はFig. 2に示す定量法で行なった。すなわち、各試料に内標準物質(I.S.: NY-208)溶液および水を加えAmberlite XAD-2 カラム(内径10mm $\times$ 5cm)に付し、7mlの水で洗浄した後、アセトニトリル-酢酸混液(4:1, v/v) 10mlで溶出させた。溶出液を減圧留去し、移動相1mlに溶解した後ろ過し、HPLCに注入した。尚、各代謝物標品を用いて検量線を作成し、NY-198換算量として各代謝物を定量した。

(Clean-up)



\* internal standard (NY-208)



(HPLC operating conditions)

Apparatus : BIP-I Liquid Chromatograph (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)

Column : TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> (Toyo Soda Co., Ltd., 4.6mmφ × 15cm)Mobile phase : 0.01M phosphate buffer soln. (pH 2.5) - CH<sub>3</sub>CN (8 : 2, v/v)  
containing 0.01M sodium 1-hexanesulfonate

Flow rate : 0.5ml/min

Detection : FP-210 Spectrofluorometer (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)

Ex 280nm, Em 455nm

Fig. 2. Determination procedure of the metabolites (M-III~M-VI)

## II 実験成績

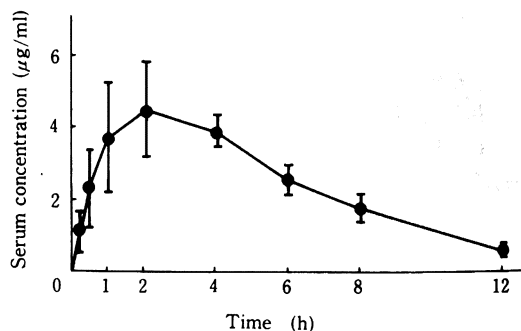
### 1. NY-198未変化体の血清中濃度

NY-198を 20mg/kg経口投与後の NY-198未変化体の平均血清中濃度推移を Fig. 3 に示す。血清中濃度は投与後 2 h で最高濃度 4.49μg/ml に達し、以後半減期 2.86h で減衰した。

### 2. NY-198未変化体の尿・糞中排泄

NY-198を 20mg/kg経口投与後採取した尿および糞における濃度および排泄率を Table 1 に示す。尿中濃度は 0 ~ 6 h で最も高く、1181.7μg/ml、12~24h でも 64.2 μg/ml と高濃度であった。尿中への排泄は速やかであり、24h までに投与量の 60.9% (総尿中排泄率の約 96%)、96 h までに 63.4% が排泄された。

一方、糞中濃度は 12~24h で最も高く、平均 48.0μg/



Each point represents the mean ± S.E. of four monkeys.

Fig. 3. Serum concentration of NY-198 after oral administration of NY-198 to monkeys at a dose of 20mg/kg

Table 1. Urinary and fecal concentration and cumulative excretion of NY-198 after oral administration of NY-198 to monkeys at a dose of 20mg/kg

| Sample | Time<br>(h) | Concentration<br>( $\mu$ g/ml or g) | Time<br>(h) | Cumulative excretion<br>(% of dose) |
|--------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Urine  | 0 - 6       | 1181.7 $\pm$ 482.7                  | 0 - 6       | 31.6 $\pm$ 11.6                     |
|        | 6 - 12      | 385.0 $\pm$ 325.4                   | 0 - 12      | 48.5 $\pm$ 3.2                      |
|        | 12 - 24     | 64.2 $\pm$ 28.2                     | 0 - 24      | 60.9 $\pm$ 6.3                      |
|        | 24 - 48     | 4.6 $\pm$ 2.3                       | 0 - 48      | 62.8 $\pm$ 6.4                      |
|        | 48 - 72     | 0.9 $\pm$ 0.4                       | 0 - 72      | 63.1 $\pm$ 6.4                      |
|        | 72 - 96     | 0.5 $\pm$ 0.3                       | 0 - 96      | 63.4 $\pm$ 6.4                      |
| Feces  | 0 - 6       | 18.9 $\pm$ 12.9                     | 0 - 6       | 0.3 $\pm$ 0.2                       |
|        | 6 - 12      | 16.4 $\pm$ 0.9                      | 0 - 12      | 0.5 $\pm$ 0.2                       |
|        | 12 - 24     | 48.0 $\pm$ 8.9                      | 0 - 24      | 2.3 $\pm$ 0.4                       |
|        | 24 - 48     | 46.2 $\pm$ 14.2                     | 0 - 48      | 5.1 $\pm$ 1.2                       |
|        | 48 - 72     | 7.4 $\pm$ 4.3                       | 0 - 72      | 5.5 $\pm$ 1.4                       |
|        | 72 - 96     | 0.8 $\pm$ 0.8                       | 0 - 96      | 5.6 $\pm$ 1.5                       |

Each value represents the mean  $\pm$  S. E. of four monkeys.

gであり、尿中最高濃度と比較すると約25分の1であった。糞中排泄率は24hまでに投与量の2.3%, 96hまでに5.6%であった。

### 3. 尿糞中代謝

#### 1) 代謝物定量法の検討

尿および糞抽出液における検量線の一例を Fig. 4 に示す。尿および糞抽出液ともに50~1000 ng/mlの濃度範囲で良好な直線性を示した。

次に、添加回収実験の結果を Table 2 に示す。検量線からの回収率は良好な値を示し、本定量法は精度の点においても優れていることが明らかとなった。

#### 2) 尿・糞中代謝物の定量

代謝物 (M-III~M-VI) 定量時の典型的クロマトグラムを Fig. 5 に示す。クロマトグラムから明らかな様にサルの尿および糞中には代謝物 M-III~M-VIすべてが存在した。次に各代謝物の投与量に対する排泄率および代謝物の存在率を Table 3 に示す。尿中排泄物の中でNY-198未変化体はいずれの時間においても約96%以上と多く存在していた。また、投与後24hまでに投与量の60.9%が未変化体として排泄され、次いでM-II, M-Vが1%前後、M-VIが0.4%であり、M-III, M-IVは0.1%以下であった。

一方、糞中にもNY-198未変化体が最も多く存在し、その存在率は約80%であった。また、投与後24hまでに投与量の2.3%が未変化体として排泄され、次いでM-IIが0.3%, M-III~M-VIは0.1%以下であった。

## III 考 察

サルにNY-198経口投与後の平均血清中未変化体濃度は2hで最高に達し、吸収はサルにおいても速やかであるものと考えられた。最高血清中濃度 (Cmax) は ofloxacin<sup>4)</sup>の約 $\frac{1}{2}$ , enoxacin<sup>5)</sup>と同程度であった。消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) は ofloxacin と同程度であり, enoxacin と比較して若干短かった。血清中濃度推移を他動物<sup>1)</sup>と比較するとCmaxはイヌ, ラットよりも低く,  $T_{1/2}$ はイヌ, ラットよりも短い傾向が認められた。

一方、尿中に投与量の60%以上がNY-198未変化体として回収され、ラット、イヌと同様<sup>1)</sup>、サルにおいても尿中排泄の多いことが示された。本試験では自然排泄尿であり、尿採取時のロス (代謝ケージへの尿の付着、採血時における失禁など) を考慮すると実際には尿中への排泄量は今回の値よりも多いものと考えられる。また、尿中および糞中濃度は血清中濃度と比較してかなり高い値を示していた。尿中へ高濃度で排泄される現象は ofloxacin<sup>4)</sup>, enoxacin<sup>6)</sup>等でも報告されており、NY-198はこれらピリドンカルボン酸系抗菌剤と同様、尿路感染症、消化器感染症に適用しうる薬剤であると推察される。

サルの尿・糞中代謝物を定量する目的で高速液体クロマトグラフィーを用いた代謝物の定量法を確立した。NY-198の代謝物はクロロホルム、酢酸エチル等の有機溶媒にほとんど抽出されず液-液分配による試料の clean-up 操作を用いることが出来なかったが、前処理に Amberlite XAD-2カラムを使用することにより生体試

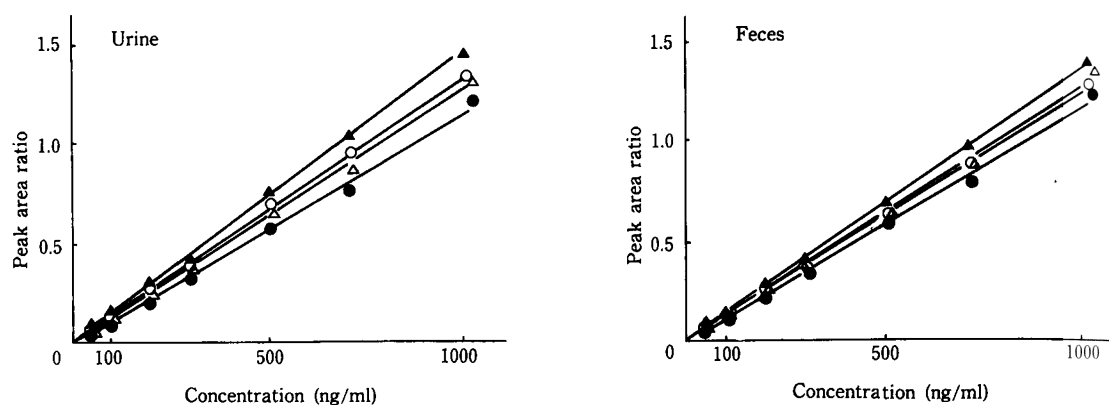


Fig. 4. Calibration curves for the metabolites: M-III (●), M-IV (○), M-V (▲) and M-VI (△)

Table 2. Precision of the determination procedure for the metabolites (M-III~M-VI)

| Sample | Number of runs | Concn. (ng/ml) | Recovery (%) $\pm$ S. D. |                 |                 |                 |
|--------|----------------|----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|        |                |                | M-III                    | M-IV            | M-V             | M-VI            |
| Urine  | 5              | 100            | 107.8 $\pm$ 0.6          | 99.2 $\pm$ 1.1  | 98.4 $\pm$ 0.6  | 105.4 $\pm$ 1.1 |
|        | 5              | 500            | 100.1 $\pm$ 0.4          | 100.3 $\pm$ 1.0 | 100.6 $\pm$ 1.0 | 100.3 $\pm$ 0.6 |
| Feces  | 5              | 100            | 104.8 $\pm$ 1.1          | 99.9 $\pm$ 0.8  | 99.2 $\pm$ 0.7  | 102.4 $\pm$ 0.8 |
|        | 5              | 500            | 101.0 $\pm$ 0.4          | 99.8 $\pm$ 0.8  | 100.4 $\pm$ 0.6 | 102.4 $\pm$ 1.1 |

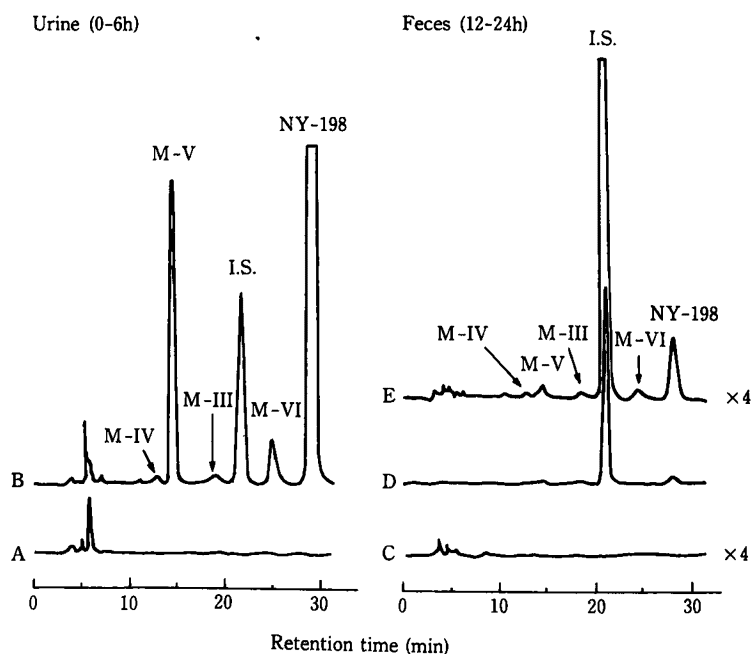


Fig. 5. HPLC chromatograms of control urine (A) and feces (C) and of urine (B) and feces (D, E) from monkeys after oral administration of NY-198 at a dose of 20mg/kg

Table 3. Urinary and fecal excretion of NY-198 and its metabolites after oral administration of NY-198 to monkeys at a dose of 20mg/kg

| Sample | Time<br>(h) | Metabolite              |                      |                      |                      |                      |                      |
|--------|-------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|        |             | NY-198                  | M-II                 | M-III                | M-IV                 | M-V                  | M-VI                 |
| Urine  | 0-6         | 31.6±11.6<br>(96.9±1.5) | 0.4±0.4<br>(1.2±1.2) | 0.0±0.0<br>(0.1±0.0) | 0.0±0.0<br>(0.0±0.0) | 0.4±0.2<br>(1.3±0.3) | 0.2±0.1<br>(0.5±0.1) |
|        | 6-12        | 16.9±9.8<br>(95.8±1.6)  | 0.6±0.6<br>(1.9±1.6) | 0.0±0.0<br>(0.2±0.0) | 0.0±0.0<br>(0.0±0.0) | 0.3±0.2<br>(1.4±0.3) | 0.1±0.1<br>(0.7±0.1) |
|        | 12-24       | 12.4±5.3<br>(96.8±0.6)  | 0.1±0.1<br>(1.1±0.7) | 0.0±0.0<br>(0.1±0.1) | 0.0±0.0<br>(0.0±0.0) | 0.1±0.1<br>(1.2±0.2) | 0.1±0.0<br>(0.8±0.2) |
|        | 0-24        | 60.9±6.3<br>(96.1±1.2)  | 1.2±0.6<br>(1.8±0.9) | 0.1±0.0<br>(0.1±0.0) | 0.0±0.0<br>(0.0±0.0) | 0.8±0.1<br>(1.3±0.2) | 0.4±0.1<br>(0.6±0.1) |
| Feces  | 0-6         | 0.3±0.2<br>(89.0±9.6)   | 0.1±0.1<br>(9.5±9.5) | 0.0±0.0<br>(0.8±0.8) | N.D.                 | 0.0±0.0<br>(0.3±0.3) | 0.0±0.0<br>(0.5±0.5) |
|        | 6-12        | 0.3±0.0<br>(90.4±5.7)   | 0.0±0.0<br>(0.8±0.8) | 0.0±0.0<br>(4.1±2.4) | 0.0±0.0<br>(0.6±0.6) | 0.0±0.0<br>(1.7±1.7) | 0.0±0.0<br>(2.3±2.3) |
|        | 12-24       | 1.8±0.2<br>(81.1±5.0)   | 0.2±0.1<br>(7.8±4.6) | 0.1±0.0<br>(3.5±0.3) | 0.0±0.0<br>(0.9±0.1) | 0.1±0.0<br>(2.3±0.2) | 0.1±0.0<br>(4.3±0.2) |
|        | 0-24        | 2.3±0.4<br>(80.9±3.4)   | 0.3±0.1<br>(9.0±3.3) | 0.1±0.0<br>(3.5±0.2) | 0.0±0.0<br>(0.8±0.1) | 0.1±0.0<br>(2.1±0.2) | 0.1±0.0<br>(3.8±0.2) |

Each value represents % of dose (mean ± S.E.).

Each value in parentheses represents % of urinary or fecal excreted amounts (mean ± S.E.).

料からの夾雑物による妨害を回避できた。また、NY-198の代謝物は全て NY-198未変化体より約10倍強い蛍光強度を有しており、蛍光検出器の使用により代謝物の微量定量が可能となった。これまでピリドンカルボン酸系抗菌剤の代謝物定量には逆相クロマトグラフ法が用いられてきた<sup>7,8)</sup>。このような通常の逆相クロマトグラフ法では NY-198の代謝物間の分離が不充分であったが、イオンペアー逆相クロマトグラフ法を用いることにより全ての代謝物の同時定量が可能となった。

HPLC 法によりサル尿の尿糞中代謝について検討した結果、ラット、イヌと同様ピペラジン環が酸化的に代謝された M-III～M-VIの代謝物が微量ながら存在することが確認された。また、M-III～M-VIの合計とグルクロン酸抱合体 (M-II) の存在比はほぼ等しく、ピペラジン環代謝物の多いイヌとグルクロン酸抱合体の多いラットとの中間的な値を示した。

以上のように代謝物の存在比に若干の種差は存在するが、いずれの代謝物も投与量の1%以下と僅かであり、抗菌活性も NY-198に比較して弱いことから、サルにおいても他動物と同様 *in vivo* 抗菌活性の作用本体は NY-198未変化体であると推察される。

(試験実施期間：昭和60年5月～昭和61年1月)

## 文 献

- 1) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態IV—<sup>14</sup>C-NY-198に

よるラット、イヌにおける吸収、分布、排泄—。Chemotherapy 36 (S-2): 151~173, 1988

- 2) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 長谷川洋通, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態V—<sup>14</sup>C-NY-198によるラット、イヌにおける代謝—。Chemotherapy 36 (S-2): 174~187, 1988
- 3) 桶崎英一, 牧野栄一, 大道光一, 永田 治, 山田健久, 高橋和余, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態II—HPLC法と Bioassay法によるイヌにおける吸収、排泄—。Chemotherapy 36 (S-2): 138~143, 1988
- 4) 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 <sup>14</sup>C-DL-8280の各種動物における吸収、分布、排泄。Chemotherapy 32 (S-1): 1185~1202, 1984
- 5) 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
- 6) 中村信一, 黒部暢之, 柏本茂樹, 大植富夫, 高瀬善行, 清水富尚: AT-2266の実験動物における吸収、分布、排泄および代謝。Chemotherapy 32 (S-3): 86~94, 1984
- 7) 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
- 8) 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

### DISPOSITION AND METABOLISM OF NY-198 III. ABSORPTION, METABOLISM AND EXCRETION OF NY-198 IN MONKEYS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

OSAMU NAGATA, TAKEHISA YAMADA, KAZUYO TAKAHASHI and EIICHI OKEZAKI

Central Research Laboratory, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

TOMOJI YANAGIDA and HIDEKI NAKANISHI

Preclinical Research Laboratories of the Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki

We studied absorption, metabolism and excretion of NY-198 by high-performance liquid chromatography after oral administration of the drug to monkeys at a dose of 20 mg/kg.

Average serum levels of NY-198 reached a maximum concentration (C<sub>max</sub>) of 4.49  $\mu\text{g/ml}$  at 2 h after oral dosing, and then declined with a half-life of 2.86 h.

When NY-198 was administered orally to monkeys, 63.4 and 5.6% of the dose was excreted as unchanged NY-198 within 96 h in urine and feces, respectively. Urinary concentration was more than 60  $\mu\text{g/ml}$  up to 24 h after oral dosing of NY-198.

In addition to unchanged NY-198, metabolites M-III to M-VI (which are oxidized at the piperazine ring, and which were also detected in rats and dogs), were found in urine and feces of monkeys. Glucuronic acid conjugate of NY-198 (M-II) was also found. The amounts of these metabolites were very small, however, in comparison with that of unchanged NY-198.