

NY-198の体内動態V
— ^{14}C -NY-198によるラット、イヌにおける代謝—

永田 治・山田 健久・山口 俊明・長谷川洋通・桶崎 英一

北陸製薬株式会社 中央研究所

寺崎 哲也・辻 彰

金沢大学 薬学部 製剤学教室

^{14}C -NY-198をラットおよびイヌに経口投与した際の代謝について検討した。

ラット尿より未変化体 (M-I) 以外に NY-198 のグルクロン酸抱合体 (M-II), ピペラジン環の開環した代謝物 (M-IV, M-V) および M-IV, M-V からさらに酸化的脱アルキル化された代謝物 (M-III, M-VI) が同定された。

ラットおよびイヌの血清, 尿中には M-I が主に存在し, その存在率は80%以上であった。また, ラット胆汁中主代謝物は M-II であり, 次いで M-I が多く存在していた。以上のことより, NY-198 はラットおよびイヌの体内で代謝されにくく, 大部分が未変化体として挙動するものと考えられた。

著者らは前報において ^{14}C -NY-198 を用いてラットおよびイヌにおける吸収, 分布および排泄について検討し, NY-198 は経口投与後ラットおよびイヌにおいて速やかに, かつ大部分が吸収され, 主として尿中に排泄されることを報告した¹⁾。

本報においては, NY-198 をラットに経口投与した際の尿中代謝物について検索し, 同定を行なった。さらに ^{14}C -NY-198 をラットおよびイヌに経口投与した際の血清, 尿, 糞および胆汁中代謝物を定量したので, その結果を報告する。

I 実験材料および方法

1. 投与検体, 合成標品および試薬

前報¹⁾において使用した ^{14}C -標識 NY-198 および非標識 NY-198 を投与検体とした。また, 代謝物の同定のため以下に示す標品を当研究所で合成し, 用いた。

(±) -1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7- (3-methyl-1-piperazinyl) -4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-I), 7-[(2-aminoethyl) amino]-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-III), (±)-7-[(2-[(1-carboxyethyl) amino] ethyl) amino] -1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-IV), (±)-7-[(2-[(carboxymethyl) amino] propyl) amino] -1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-V), (±)-7-[(2-

aminopropyl) amino] -1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (M-VI)。

β -glucuronidase (Type IX, *Escherichia coli*) は Sigma 社より購入したものをを用い, その他の試薬は全て試薬特級品を用いた。

2. 実験動物

体重200~240g (8週令) のSD系雄性ラット (日本クレア) を約20h 絶食後使用した。尚, 実験環境下 (室温23~25°C, 湿度45~65%) で約1週間予備飼育し, 体重増加の順調な個体を選び実験に供した。食餌は薬物投与後4hより再開した。予備飼育期間および非絶食実験期間中は固型飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) を自由に摂取させた。

体重9~11kg (生後2~3年) の雄性ビーグル犬 (三協ラボ) を24h 絶食後使用した。尚, 実験環境下 (室温23~25°C, 湿度45~65%) 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4h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 (CD-5, 日本クレア) 約250gを1日1回摂取させた。

尚, 水はラット, イヌ共にすべての期間において自由に摂取させた。

3. 投与液の調製, 投与量および投与方法

代謝物の検索では非標識 NY-198 の200mg/10mlの0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 懸濁液を, 代謝物の定量では ^{14}C -NY-198 を非標識 NY-198 で適宜希

釈し、水溶液（ラット156~161 μ Ci/20mg/5ml, イヌ61 μ Ci/20mg/2ml）を調製した。投与量は代謝物の検索では200mg/kg, 代謝物の定量では20mg/kgとし、ラットではゾンデにて、イヌではカテーテルにて胃内へ強制投与した。

4. 試料の採取

前報¹⁾と同様の方法で血清、尿、糞およびラットの胆汁を採取した。

5. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

シリカゲルプレート (Kieselgel 60F₂₅₄, 0.25mm, Merck) を用いた。展開溶媒として A: ジオキサン-28%アンモニア水 (3:2, v/v), B: n-プロパノール-ジエチルアミン-水 (7:2:1, v/v) および C: n-ブタノール-酢酸-水 (4:3:3, v/v) を用いた。展開は暗所で行ない、標品および代謝物の位置を254nmの紫外線照射により検出した。薄層板上の¹⁴Cの検出はラジオクロマトスキャナー (TLC-2D, アロカ) およびオートラジオグラフィーにより行ない、その定量は検出されたスポットをシリカゲルと共にかき取り、水に懸濁した後シンチレーター (Aquasol-2, NEN) を加え¹⁴Cを測定することにより行なった。

6. ¹⁴Cの測定

¹⁴Cの測定は液体シンチレーションカウンター (LSC-653, アロカ) で行なった。尚、放射能のクエンチング補正は外部線源 (¹³⁷Cs) チャンネル比法により行なった。

7. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置として BIP-I 型 (日本分光) を用い、検出は FP-210型蛍光検出器 (Ex: 280nm, Em: 455nm, 日本分光) および UVIDECE-100V 型紫外分光検出器 (280nm, 日本分光) で行なった。

代謝物の分取精製はカラムに Nucleosil 10C₁₈ (内径10mm×25cm, Nagel) を用い、アセトニトリル-0.005Mクエン酸-1M酢酸アンモニウム (22:77:1, v/v) および (10:89:1, v/v) の2種の移動相で行なった。

また、代謝物と標品の保持時間の確認はカラムに TSKgel ODS-80T_M (内径4.6mm×15cm, 東洋曹達), 移動相に0.01M 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有0.01Mリン酸緩衝液 (pH2.5) -アセトニトリル (8:2, v/v) を用い、カラム温度25±1°C, 流量0.5ml/minで行なった。

8. 紫外吸収スペクトル (UV)

320型分光光度計 (日立) を用い各試料をメタノールに溶解して測定した。

9. 質量分析 (MS)

JMS-D300型質量分析計 (日本電子) を用い試料を直接導入し、加速電圧は3KV, イオン化電圧は70eV (EI) および210eV (CI) で測定した。また、FD および FAB は JMS-DX303型質量分析計 (日本電子) を用い、加速

電圧3KV, FDはカーボンエミッター電流0~30mA, FABの場合はマトリックスとしてグリセロールを用いてガン電圧6KVで測定した。

10. ¹H核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR)

FX90Q 型核磁気共鳴装置 (日本電子) を用い試料を DMSO-d₆ 又は CDCl₃ に溶解し、内標準としてテトラメチルシランを用いて70°Cで測定した。尚、必要に応じて CF₃COOD を1滴添加して測定した。

11. 赤外吸収スペクトル (IR)

IR-810型赤外分光光度計 (日本分光) を用い各試料を臭化カリウム錠剤として測定した。

12. 呈色反応

一級アミン (赤褐色) および二級アミン (微黄色) の検出試薬としてニンヒドリン試薬を用いた。また、M-II については糖の呈色試薬であるナフトレゾルシン試薬を用いた。

13. 代謝物の検索

代謝物の同定を行なうにあたり、ラットに非標識 NY-198の0.5% CMC 懸濁液 (濃度20mg/ml) を200mg/kgの用量で経口投与した。尚、あらかじめこれらのラットに3-メチルコランスレンのゴマ油懸濁液 (濃度6mg/ml) を30mg/kgの用量で1日1回3日間腹腔内へ投与した。非標識 NY-198投与後24時間までに自然排泄された尿の分画操作を Fig. 1 に示す。

尿を Amberlite XAD-2カラムに付し、樹脂の倍量の水で洗浄後、アセトニトリル-酢酸 (4:1, v/v) で溶出させた。溶出分画を減圧乾固後、少量の水に溶解させ、DEAE Sephadex A-25カラムに通し、常成分の除去を行なった。吸着されずに溶出した分画をリン酸緩衝液で pH7.0 に調整し、クロロホルム抽出を行なった。クロロホルムで抽出されずに水層に残った代謝物は、HPLCにより4つの分画に分け、分取精製を行なった。尚、必要に応じてこの操作を繰り返した。

14. 代謝物の定量

SD 系雄性ラットおよび雄性ビーグル犬に¹⁴C-NY-198を20mg/kgの用量で経口投与後24hまでに排泄された尿、糞、ラットの胆汁および経時的に採取した血清を分析試料とした。

血清、尿および胆汁は直接、糞は0.1N HCl 抽出液 (抽出率98%以上) を Amberlite XAD-2カラムに付し、アセトニトリル-酢酸 (4:1, v/v) 溶出分画を TLC に付した。尚、Amberlite XAD-2カラム操作における洗浄水への¹⁴Cの流出は4%以下とすることができ、定量的に¹⁴Cを回収し得た。TLC条件として展開溶媒Aを用い、代謝物のスポットを薄層板よりかき取り、放射能を測定し代謝物の定量を行なった。尚、代謝物 M-IV と M-V は TLC 展開条件により分離しないことがあるため、

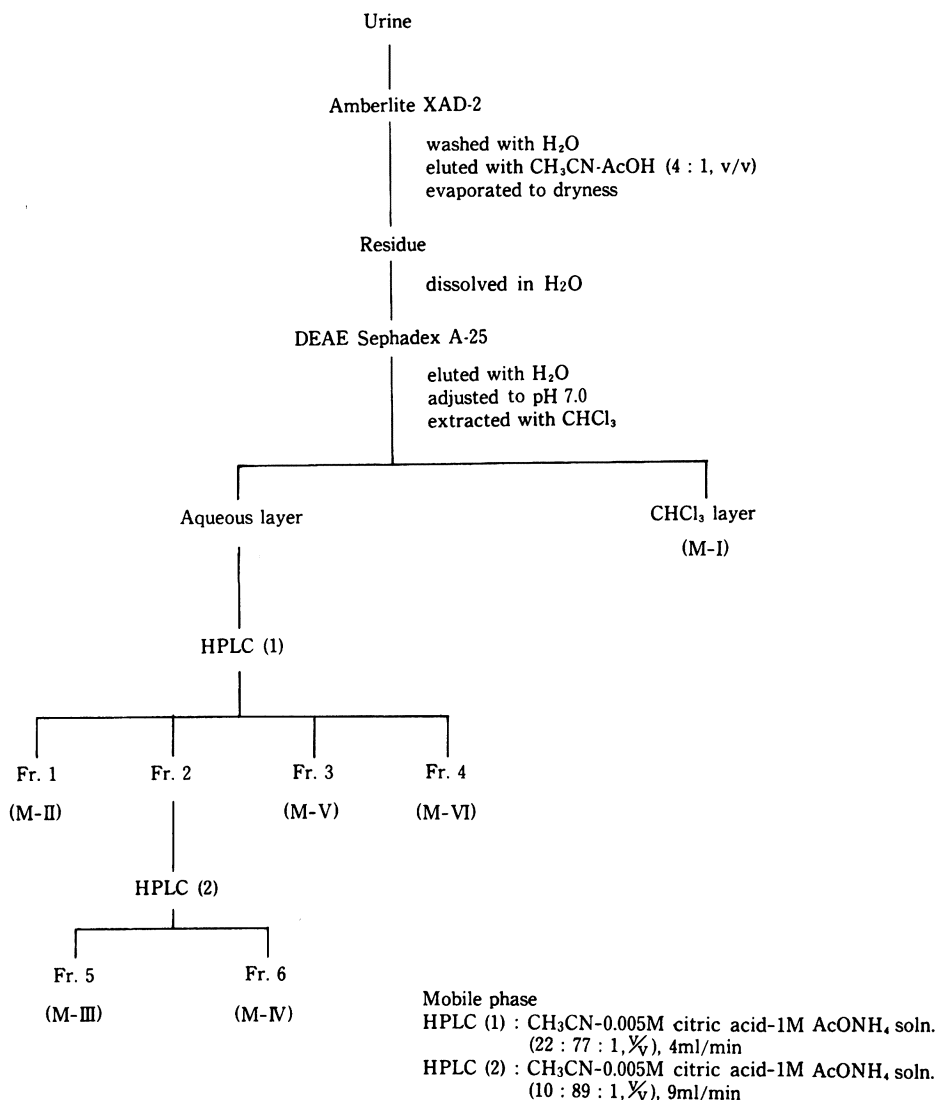


Fig. 1. Fractionation of the metabolites of NY-198 in the rat urine

その定量は M-IV, V を合わせて行なった。

15. 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標準法²⁾に準じて測定した。

II 実験成績

1. 代謝物の同定

Fig. 1 の分画操作における DEAE Sephadex A-25 素通り分画の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 (a) に示す。クロマトグラム上ピークは主として 5 つ認められた。Fr. 1 より M-II, Fr. 3 より M-V および Fr. 4 より M-VI をそれぞれ分取精製した。Fr. 2 については HPLC (2)

でさらに分離させ、Fr. 5 より M-III および Fr. 6 より M-IV をそれぞれ分取精製した (Fig. 2 (b))。

M-I はクロロホルム抽出後 HPLC (1) の条件を用いて分取精製を行なった。分取精製した各代謝物の TLC における R_f 値および HPLC における保持時間を Table 1 に、UV 吸収スペクトルにおける λ_{max} , λ_{min} を Table 2 に示す。

1) M-I

Fig. 1 の操作においてクロロホルムにより抽出された M-I の MS (EI) を Fig. 3 (a) に示す。m/z 351 に分子イオンピークが認められ、脱炭酸による m/z 307 ($[\text{M}-44]^+$), $\text{CH}_2=\text{N}^+\text{CHCH}_3$ が脱離した m/z 295 ($[\text{M}-$

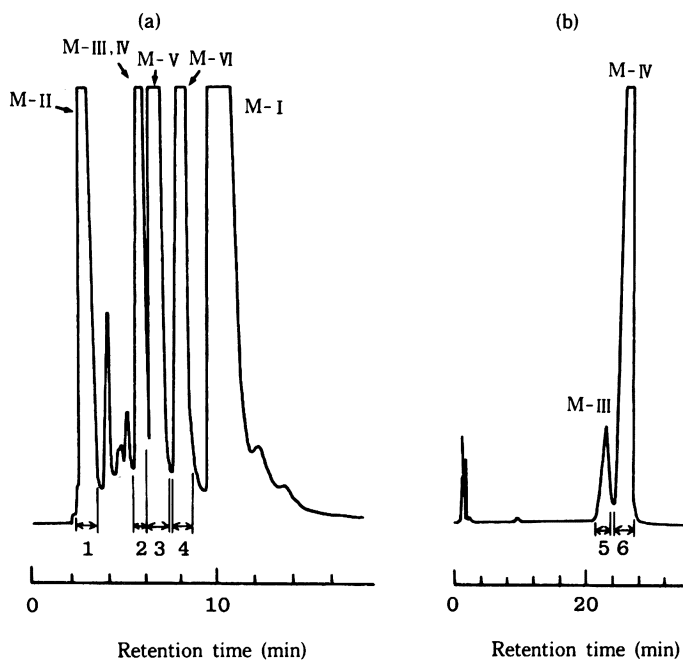


Fig. 2. HPLC chromatograms of the rat urine after oral administration of NY-198

Table 1. Rf-values on silica gel TLC and retention times on HPLC of the metabolites of NY-198

Metabolite	Rf-values			HPLC (min)
	A	B	C	D
M-I	0.55	0.60	0.51	30.8
M-II	0.78	0.51	0.30	5.0
M-III	0.40	0.24	0.51	19.3
M-IV	0.31	0.36	0.44	12.7
M-V	0.29	0.36	0.44	14.4
M-VI	0.48	0.31	0.53	25.8

Solvent systems

- A : Dioxane 28%NH₄OH (3 : 2, v/v)
 B : n-PrOH Diethylamine H₂O (7 : 2 : 1, v/v)
 C : n-BuOH AcOH - H₂O (4 : 3 : 3, v/v)
 D : 0.01M phosphate buffer soln. (pH 2.5) - CH₃CN (8 : 2, v/v) containing 0.01M sodium 1-hexanesulfonate

Table 2. UV absorption of the metabolites of NY-198

Metabolite	λ max (nm)		λ min (nm)	
M-I	290.0	320.5	256.5	314.0
M-II	283.5	—	251.0	—
M-III	281.5	314.0	251.0	306.0
M-IV	280.0	315.5	251.5	303.0
M-V	280.5	314.5	251.5	303.0
M-VI	279.5	316.5	252.0	302.5

Measured in MeOH

56]⁺) およびこれからさらに脱炭酸したm/z 251 ((M-56-44)⁺), などのフラグメントイオンピークが観察された。M-I の MS 開裂様式は NY-198 標品と一致し, さらに TLC での Rf 値, HPLC での保持時間および

UV スペクトルにおいて NY-198 標品と一致した。よって M-I を NY-198 未変化体と同定した。

2) M-II

ナフトレゾルシン試薬による呈色反応において青紫色

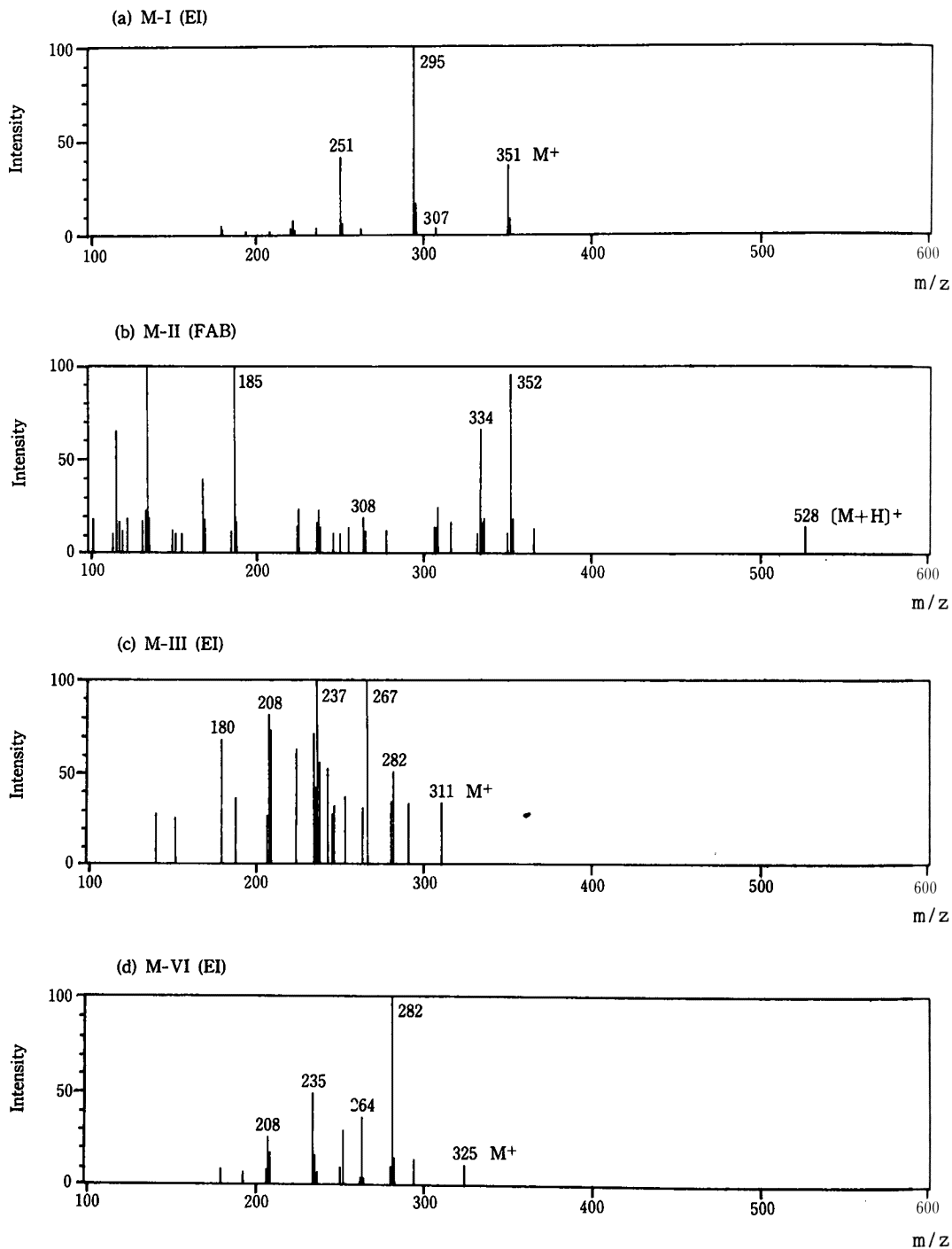


Fig. 3. Mass spectra of the metabolites of NY-198

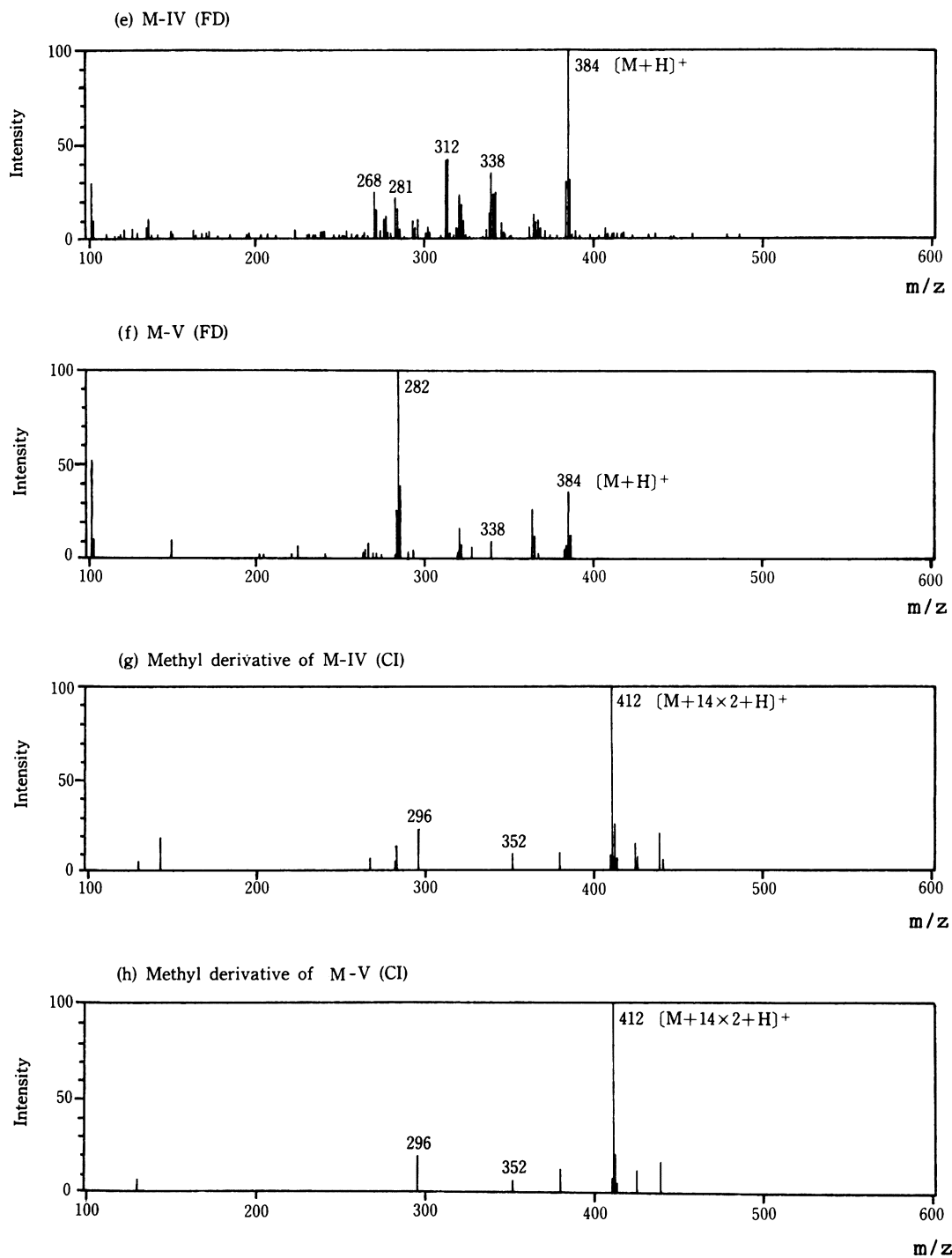


Fig. 3. Mass spectra of the metabolites of NY-198 (continued)

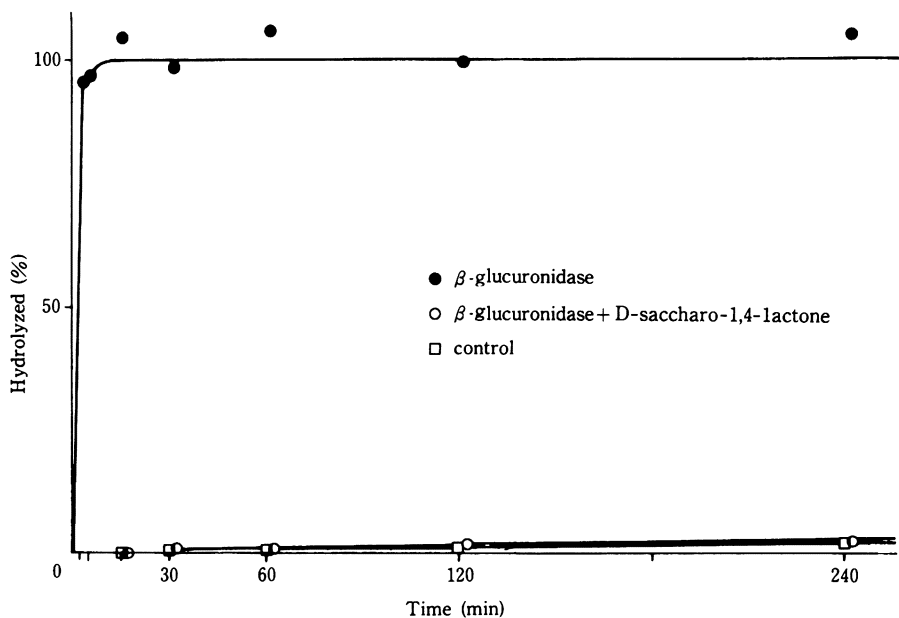


Fig. 4. Enzymatic hydrolysis of M-II fractionated by HPLC (1)

Enzymatic hydrolysis of M-II was examined by incubation of M-II (46 nmol) with β -glucuronidase (500 units) in 1/15M phosphate buffer (pH 7.0) at 37°. Inhibition of β -glucuronidase was examined in parallel reactions run in the presence of D-saccharo-1, 4-lactone (150 μ mol).

に呈色したこと、 β -glucuronidase による加水分解生成物の TLC での Rf 値および HPLC での保持時間が M-I と一致したこと、さらにこの酵素反応が β -glucuronidase の阻害剤である D-saccharo-1,4-lactone により阻害されたこと (Fig. 4) から M-II は M-I のグルクロン酸抱合体と考えた。さらに構造を確認する上で MS (FAB) 測定を行なったところ、 m/z 528 ($[M+H]^+$) に擬分子イオンピークおよびグルクロン酸が脱離したアグリコンの擬分子イオンピーク m/z 352 が認められた (Fig. 3 (b))。

また、enoxacin⁹⁾の報告と同様、アンモニア系の展開溶媒を用いた TLC において、アミド体 ($CONH_2$) の位置にスポットを検出した。

以上の結果より、M-II は NY-198 のエステル型グルクロン酸抱合体であると結論した。

3) M-III, VI

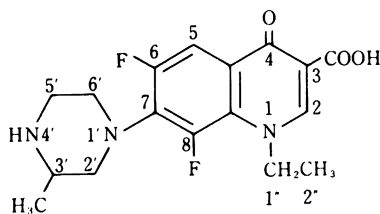
M-III の MS (EI) を Fig. 3 (C) に示す。M-III は MS (EI) で NY-198 より 40 質量数の少ない m/z 311 (M^+) を示し、脱炭酸フラグメントイオンピーク m/z 267 ($[M-44]^+$) およびキノロン骨格を示すフラグメントイオンピーク m/z 208 が見られた。また M-I で特徴的なフラグメントイオンピークである m/z 295 が認められず、 m/z

282 および m/z 237 にフラグメントイオンピークが認められた。一方、ニンヒドリン試薬を用いた呈色反応において赤褐色を示し、一級アミンを有しているものと推定された。以上のことから、M-III はピペラジン環が酸化開裂を受け、エチレンジアミノ基に代謝されているものと考えた。合成標品と TLC の Rf 値、HPLC の保持時間、MS (EI), 1H -NMR, IR スペクトルおよび UV スペクトルで一致し、その構造が支持された。

M-VI は M-III と同様にニンヒドリン試薬を用いた呈色反応において赤褐色を示し、MS (EI) では M-III より 14 質量数が多い m/z 325 (M^+) を示したが、その他のフラグメントイオンピークは M-III と類似の開裂パターンを示したことより、M-III のエチレンジアミノ基にメチル基が導入されていると考えた (Fig. 3 (d))。合成標品と TLC の Rf 値、HPLC の保持時間、MS (EI), 1H -NMR, IR スペクトルおよび UV スペクトルで一致し、その構造が支持された。

4) M-IV, V

M-IV, V とともに MS (FD) で NY-198 より 32 質量数が多い m/z 384 ($[M+H]^+$) を示し、 m/z 282 が存在することよりピペラジン環が代謝を受けていると考えられた (Fig. 3 (e), (f))。

Table 3. ^1H -NMR chemical shifts of the metabolites of NY-198

Metabolite	Chemical shifts (δ ppm)								
	2	5	2'	3'	5'	6'	3'-CH ₃	1''	2''
M-I ^{a)}	8.61 (s)	7.97 (d-d)	2.92 — 3.46 (m)				1.14 (d)	4.47 (q-d)	1.57 (t-d)
M-III ^{b)}	8.75 (s)	7.76 (d-d)			2.80 (t)	3.42 (t)		4.54 (q-d)	1.43 (t-d)
M-IV ^{b)}	8.76 (s)	7.76 (d-d)		3.26 (q)	2.90 (t)	3.44 — 3.73 (m)	1.23 (d)	4.54 (q-d)	1.44 (t-d)
M-V ^{c)}	8.80 (s)	7.82 (d-d)	3.37 — 3.82 (m)			3.96 (s)	1.30 (d)		1.45 (t-d)
M-VI ^{b)}	8.76 (s)	7.76 (d-d)	2.87 — 3.83 (m)				1.05 (d)	4.54 (q-d)	1.43 (t-d)

a) in CDCl_3 b) in DMSO-d_6 c) in DMSO-d_6 with a drop of CF_3COOD

s: singlet, d: doublet, t: triplet, m: multiplet, d-d: doublet of doublets, t-d: triplet of doublets, q-d: quartet of doublets

次にジアゾメタンによるメチル化を行なったところ、メチル基が2つ入った m/z 412 ($(\text{M} + 14 \times 2 + \text{H})^+$) が現れたためカルボキシ基を2個有していると推定された (Fig. 3 (g), (h))。

また、 ^1H -NMR において M-IV では $\delta 3.26\text{ppm}$ 付近に1プロトンのシグナルがカルテットで現れており、これは3'位のプロトンがメチル基とのみカップリングしているためと考えられた。一方、M-V では5'位のプロトン2個によるものと思われるシグナルが、 $\delta 3.96\text{ppm}$ 付近にシングレットとして認められた (Table 3)。

以上の結果より、M-IV は3'位に、M-V は5'位にカルボキシ基を有する代謝物と推定した。合成標品と TLC の R_f 値、HPLC の保持時間、MS、 ^1H -NMR、IR スペクトル (Table 4) および UV スペクトルで一致し、その構造が支持された。

2. NY-198 および代謝物の抗菌活性

NY-198 および代謝物標品の抗菌スペクトルを Table 5 に示す。代謝物の抗菌活性は NY-198 に比べかなり弱く、最も抗菌活性の強い M-III においても概ね $1/8$ 以下であった。

3. 代謝物の定量

1) 血清中代謝物

^{14}C -NY-198 単回経口投与後のラットおよびイヌにおける血清中代謝物の TLC クロマトグラムの一例を Fig. 5 に、投与後所定時間における未変化体および代謝物の存在率を Table 6 に示す。

ラット血清中には M-I ~ M-VI、イヌ血清中には M-III を除く5つの代謝物が検出された。Table 6 に示すように、血清中にはラットおよびイヌにおいて未変化体が最も多く存在することが判明した。投与後1h (Tmax) における M-I の存在率はラットで81.9%、イヌで95.7%であった。また、M-I の存在率は投与後時間が進むにつれてやや減少する傾向はあったが概略一定であった。M-II はラットにおいて5.9%~12.9%と M-I に次いで多く存在したが、イヌでは0.9%~1.8%と少なかった。また、その他の代謝物はラットおよびイヌ共に3%以下であった。

2) 尿中代謝物

ラットおよびイヌの尿中代謝物の TLC クロマトグラムの一例を Fig. 6 に、未変化体および代謝物の存在率を

Table 4. IR absorption of the metabolites of NY-198

Metabolite	Frequency (cm ⁻¹)				
	ν_{NH} (1')	$\nu_{C=O}$ (3-COOH)	$\nu_{C=O}$ (2' or 6'-COOH)	$\nu_{C=C}, \nu_{C=O}$ (Aromatic ring)	δ_{CH} (Aromatic ring)
M-I	—	1723	—	1614	806
M-III	3350	—	—	1619	815
M-IV	3350	—	1730	1611	805
M-V	3328	—	1737	1613	804
M-VI	3338	—	—	1619	815

Table 5. Antibacterial activity of NY-198 and its metabolites

Organism	MIC (μ g/ml)				
	NY-198	M-III	M-IV	M-V	M-VI
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.78	12.5	>100	>100	12.5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.20	3.13	>100	>100	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.20	3.13	>100	>100	6.25
<i>E. coli</i> K-12 C600	0.20	3.13	>100	>100	6.25
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.05	1.56	>100	>100	1.56
<i>S. typhi</i> 901	0.05	3.13	>100	>100	6.25
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.78	3.13	>100	>100	12.5
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	1.56	6.25	>100	>100	12.5
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.78	6.25	>100	>100	12.5
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.05	1.56	>100	>100	1.56

Inoculum size : 10⁶CFU/ml

Table 7 に示す。

ラット、イヌ共に M-I ~ M-VI が検出された。未変化体は血清同様に最も多く、その存在率はラットで 91.8 %、イヌで 92.4 % であった。M-II はラットで 5.7 %、イヌで 2.1 % であり、血清中代謝物同様ラットの方がイヌより多く存在していた。一方、代謝物 M-IV, V はイヌにおいて 2.7 % と未変化体に次いで多く存在していたのに対して、ラットでは 0.7 % とわずかであった。また、その他の代謝物はラット、イヌ共に 2 % 以下であった。

3) 糞中代謝物

ラットおよびイヌの糞中代謝物の TLC クロマトグラムの一例を Fig. 7 に、未変化体および代謝物の存在率を Table 7 に示す。

ラット、イヌ共に M-I ~ M-VI が検出された。未変化体が最も多く存在し、ラットで 95.1 %、イヌで 74.0 % であった。M-II はラット、イヌ共に 1 ~ 3 % とわずかであった。また、イヌにおいて M-IV, V が 15.5 % と M-I に次いで多く存在していた。その他の代謝物はラット、イヌ共に 4 % 以下であった。

4) 胆汁中代謝物

ラットにおける胆汁中代謝物の TLC クロマトグラムの一例を Fig. 8 に、未変化体および各代謝物の存在率を Table 7 に示す。

ラットの胆汁中には M-II が最も多く存在し、その存在率は 63.1 % であった。M-II に次いで多く存在したのは M-I で 21.9 % であり、他の代謝物は 5 % 以下であった。

III 考 察

NY-198 をラットおよびイヌに経口投与後の血清、尿、糞およびラットの胆汁中には、未変化体 (M-I) のほか NY-198 のエステル型グルクロン酸抱合体 (M-II)、エチレンジアミノ基を有する M-III, VI およびカルボキシ基を 2 個有する M-IV, V が検出された。従って、ラットおよびイヌにおける NY-198 の代謝経路は Fig. 9 に示す通りであると推定される。すなわち、キノロン骨格のカルボキシ基がグルクロン酸により抱合化され、M-II を生ずる経路およびピペラジン環の 2 位又は 6 位が酸

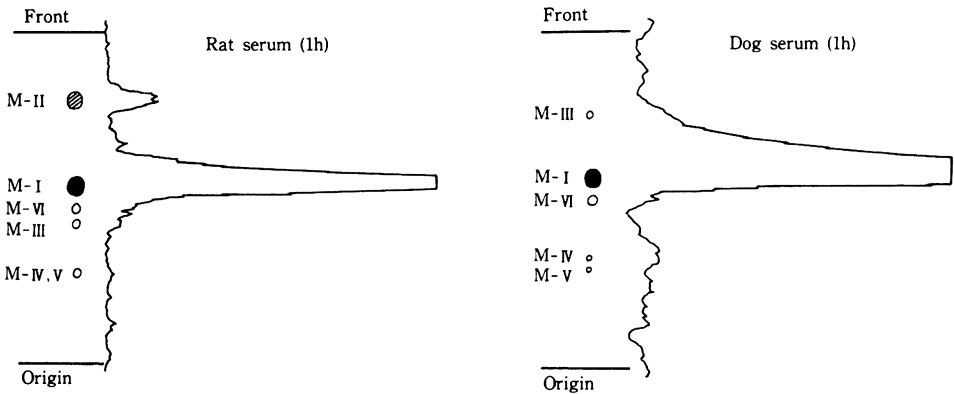


Fig. 5. Thin-layer radio chromatograms of the serum after oral administration of ^{14}C -NY-198 to rats and dogs at a dose of 20mg/kg

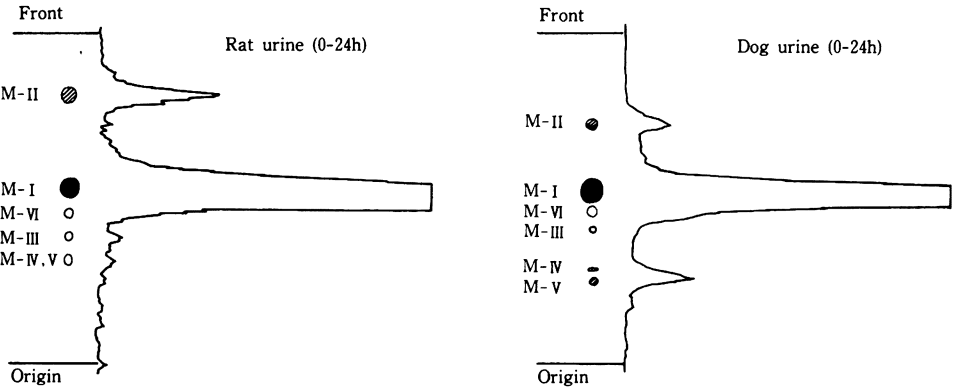


Fig. 6. Thin-layer radio chromatograms of the urine after oral administration of ^{14}C -NY-198 to rats and dogs at a dose of 20mg/kg

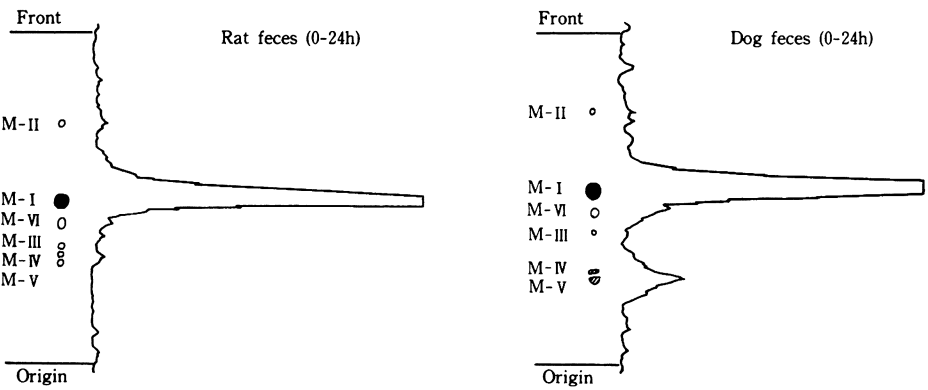


Fig. 7. Thin-layer radio chromatograms of the feces after oral administration of ^{14}C -NY-198 to rats and dogs at a dose of 20mg/kg

Table 6. Metabolic patterns in the serum after oral administration of ^{14}C -NY-198 to rats and dogs at a dose of 20mg/kg

Species	Time (h)	Metabolite					
		M-I	M-II	M-III	M-IV, V	M-VI	others
Rat	0.5	90.7 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
	1.0	81.9 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.3
	2.0	84.7 $\pm$ 1.5	10.7 $\pm$ 1.5	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.0
	4.0	82.6 $\pm$ 1.1	10.5 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.1
	8.0	81.9 $\pm$ 0.5	10.6 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.3
Dog	0.5	96.6 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	N. D.	0.7 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
	1.0	95.7 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.2	N. D.	1.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
	2.0	95.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	N. D.	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
	4.0	94.9 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.2	N. D.	1.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1
	8.0	95.2 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.3	N. D.	1.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1
	12.0	94.6 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.3	N. D.	1.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1
	24.0	93.5 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.2	N. D.	1.6 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2

Each value represents % of total serum concentration (mean $\pm$ S.E.) of four animals.

N. D. : Not detected

Table 7. Urinary, fecal and biliary metabolites within 24 h after oral administration of ^{14}C -NY-198 to rats and dogs at a dose of 20mg/kg

Species	Sample	n	Metabolite					
			M-I	M-II	M-III	M-IV, V	M-VI	others
Rat	Urine	4	69.8 $\pm$ 1.9 (91.8 $\pm$ 1.5)	4.3 $\pm$ 1.1 (5.7 $\pm$ 1.4)	0.5 $\pm$ 0.0 (0.7 $\pm$ 0.1)	0.5 $\pm$ 0.1 (0.7 $\pm$ 0.1)	0.8 $\pm$ 0.0 (1.1 $\pm$ 0.0)	N. D.
	Feces	4	16.9 $\pm$ 0.8 (95.1 $\pm$ 0.9)	0.2 $\pm$ 0.1 (1.0 $\pm$ 0.4)	0.1 $\pm$ 0.0 (0.8 $\pm$ 0.1)	0.2 $\pm$ 0.1 (1.4 $\pm$ 0.3)	0.3 $\pm$ 0.0 (1.7 $\pm$ 0.2)	N. D.
	Total	4	86.7 $\pm$ 1.6	4.5 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	N. D.
	Bile	5	6.0 $\pm$ 0.7 (21.9 $\pm$ 2.1)	17.3 $\pm$ 1.1 (63.1 $\pm$ 2.2)	0.9 $\pm$ 0.1 (3.1 $\pm$ 0.4)	1.0 $\pm$ 0.1 (3.7 $\pm$ 0.4)	1.3 $\pm$ 0.1 (4.9 $\pm$ 0.2)	0.9 $\pm$ 0.2 (3.3 $\pm$ 0.4)
Dog	Urine	4	50.9 $\pm$ 2.8 (92.4 $\pm$ 2.0)	1.2 $\pm$ 0.3 (2.1 $\pm$ 0.6)	0.3 $\pm$ 0.0 (0.6 $\pm$ 0.1)	1.4 $\pm$ 0.4 (2.7 $\pm$ 0.9)	0.8 $\pm$ 0.1 (1.5 $\pm$ 0.3)	0.4 $\pm$ 0.1 (0.7 $\pm$ 0.3)
	Feces	4	14.7 $\pm$ 2.8 (74.0 $\pm$ 10.5)	0.5 $\pm$ 0.1 (2.6 $\pm$ 0.5)	0.3 $\pm$ 0.1 (1.8 $\pm$ 0.4)	2.8 $\pm$ 1.6 (15.5 $\pm$ 8.9)	0.7 $\pm$ 0.3 (3.9 $\pm$ 1.5)	0.4 $\pm$ 0.0 (2.2 $\pm$ 0.3)
	Total	4	65.6 $\pm$ 4.9	1.6 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 2.0	1.5 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.1

Each value represents % of dose (mean $\pm$ S.E.).

Each value in parentheses represents % of excreted amount (mean $\pm$ S.E.).

化開裂し、M-IV, Vを生じ、さらに酸化的脱アルキル化された M-III, VIを生ずる経路である。後者の経路における M-IV, Vのようなカルボキシル基を有する代謝物は piromidic acid⁴⁾, phencyclidine⁵⁾でも知られている。一方、NY-198と同様にピペラジン環を有する化合物である pipemidic acid⁶⁾, norfloxacin⁷⁾, enoxacin⁸⁾では M-IV, Vのような代謝物は認められておらず、ピペラジ

ン環の3位もしくは5位のオキソ体が主代謝物の一つであると報告されている。NY-198でこのような代謝物が認められなかった理由はピペラジン環の3位にメチル基を有するため3位および5位の酸化が進行し難いためであると推察される。

ラットおよびイヌの血清、尿、糞およびラットの胆汁中代謝物を定量した結果、ラットの胆汁を除くほとんど

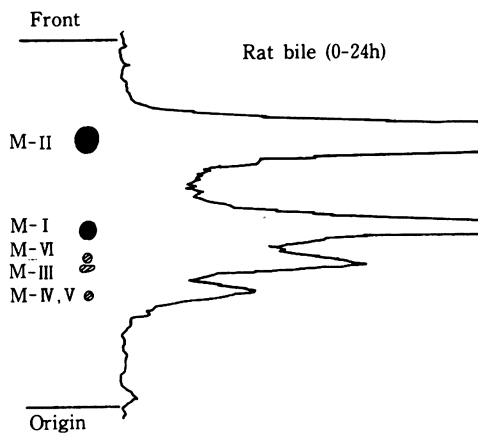


Fig. 8. Thin-layer radio chromatogram of the bile after oral administration of ^{14}C -NY-198 to rat at a dose of 20mg/kg

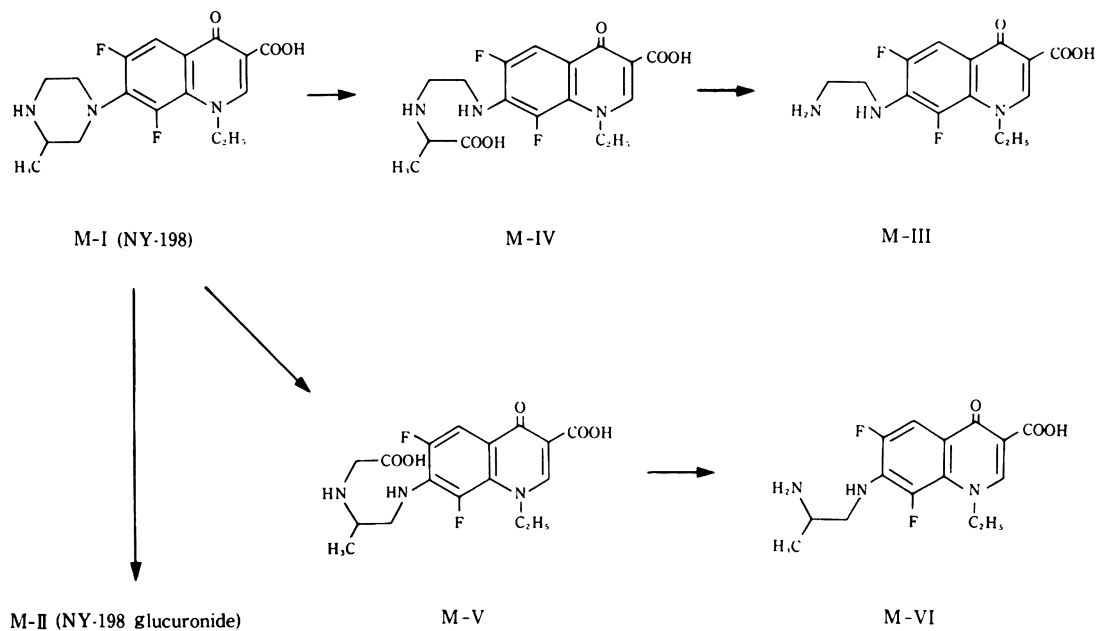


Fig. 9. Postulated metabolic pathway of NY-198 in rats and dogs

すべての試料において未変化体が約80%以上存在し、その総排泄率は投与後24hまでにラットで投与量の86.7%、イヌで65.6%であった。従って、NY-198は大部分未変化体として挙動することが明らかとなった。また、ラットとイヌでは尿中、糞中への排泄率が異なることを前報¹⁾で報告したが、代謝においてはラットではやや抱合化を受けやすく、イヌではピペラジン環の代謝を受けやすいという傾向はあるが、いずれの代謝物も量的に少なく、代謝上における種差は少ないものと考えられる。

一方、ラット胆汁中主代謝物である M-II はラットの糞中に少量しか存在せず、ラットの腸肝循環が0~24hで約52%¹⁾であることを考え合わせると M-II は胆汁中へ排泄されやすい代謝物であるが、消化管内の細菌叢によって一部加水分解され、アグリコンである NY-198 未変化体となって再吸収されるものと考えられる。

また、M-II は展開溶媒 A を用いた TLC において NY-198 のアミド体 (CONH₂) と R_f 値が一致した。これは enoxacin³⁾ で述べられているようにアンモニアを含む展開溶媒で、TLC 展開中に加アンモニア分解 (Ammonolysis) が起こり、エステル体の一種であるグルクロン酸抱合体がアミド体になるためであると推察される。

代謝物の抗菌スペクトルは NY-198 と同様であったが、抗菌活性は強いものでも NY-198 の概ね 1/8 以下であり、またその存在率も低いことより、代謝物の *in vivo* 抗菌活性への関与はわずかであると推察される。

(試験実施期間：昭和59年12月~昭和61年3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—¹⁴C-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) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 3) 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
- 4) SEKINE, Y.; M. MIYAMOTO, M. HASHIMOTO & K. NAKAMURA: Metabolism of piromidic acid, a new antibacterial agent. II. *In vitro* metabolic pathway of piromidic acid in rats. Chem. Pharm. Bull. 24 (3): 437~442, 1976
- 5) KAMMERER, R. C.; D. A. SCHMITZ & A. K. CHO: Species differences in the *in vitro* metabolism of phencyclidine. Xenobiotica 14(6): 475~482, 1984
- 6) KUROBE, N.; S. NAKAMURA & M. SHIMIZU: Metabolites of pipemidic acid in human urine. Xenobiotica 10 (1): 37~46, 1980
- 7) 永津芳雄, 遠藤泰平, 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
- 8) 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

DISPOSITION AND METABOLISM OF NY-198
V. METABOLISM OF ^{14}C -NY-198 IN RATS AND DOGS

OSAMU NAGATA, TAKEHISA YAMADA, TOSHIAKI YAMAGUCHI,
HIROMICHI HASEGAWA and EIICHI OKEZAKI

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

TETSUYA TERASAKI and AKIRA TSUJI

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa

We studied metabolism of ^{14}C -NY-198 in rats and dogs following oral administration of the drug.

The metabolites of NY-198 in rat urine were identified as follows : M-I, unchanged NY-198 ; M-II, glucuronic acid conjugate of NY-198 ; M-IV and M-V, compounds cleaved at the piperazine ring ; M-III and M-VI, compounds further metabolized through oxidative dealkylation of M-IV and M-V.

In serum and urine of rats and dogs, mainly M- I was found, and amounted to more than 80% of the metabolites in these samples. The major metabolite in rat bile was M- II, followed by M- I.

These results indicate that metabolism of NY-198 hardly occurs and that most of the drug remains unchanged in rats and dogs.