

NM441 の各種動物における吸収

奥山 義男・桃田 一夫・森野 昭
日本新薬株式会社創薬研究本部*

NM441 および活性本体 NM394 をラット、ウサギ、イヌおよびサルに投与し、NM441 の吸収性について検討を行った。

1) 各種動物に NM441 を 20mg/kg 経口投与したのち、NM441 は血液中に認められなかった。

2) NM394 を静脈内 (5mg/kg) および NM441 を経口 (20mg/kg) 投与したのち、血漿中 NM394 濃度の消失半減期 ($T_{1/2}$, β) はラット、ウサギ、イヌおよびサルでそれぞれ 2.07, 3.16, 4.96 および 12.0 時間であった。

3) NM441 を 20mg/kg 経口投与したのち、血漿中 NM394 濃度はラット、ウサギ、イヌおよびサルでそれぞれ投与後 1.0, 0.25, 1.5 および 4.0 時間に最高値に達し、それぞれの値は 1.47, 0.78, 2.00 および 0.97 $\mu\text{g/ml}$ であった。

4) NM441 を経口投与したのちの NM394 の bioavailability は、NM394 の静脈内投与および NM441 の経口投与時の血漿中 NM394 濃度の AUC を比較することによって算出したところ、ラットで 38.9%、ウサギで 9.06%、イヌで 42.2% およびサルで 24.9% であった。

Key words: NM441, NM394, absorption, animal, plasma concentration

(\pm)-6-fluoro-1-methyl-7-[4-(5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methyl-1-piperazinyl]-4-oxo-4*H*-[1,3]thiazeto[3,2-*a*]quinoline-3-carboxylic acid (NM441) は日本新薬株式会社において創製され、明治製菓株式会社と共同で開発中のプロドラッグ型のニューキノロン系合成抗菌薬である。NM441 は小腸より吸収されたのち、活性本体である (\pm)-6-fluoro-1-methyl-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-4*H*-[1,3]thiazeto[3,2-*a*]quinoline-3-carboxylic acid (NM394) に速やかに代謝される¹⁾。また、NM394 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して強い抗菌作用を示すことが知られている²⁾。

今回、NM441 のラット、ウサギ、イヌおよびサルにおける吸収性について検討したので、その成績を報告する。

I 材料と方法

1. 試験化合物

NM441, NM394 および内部標準物質 6-fluoro-4-oxo-1-phenyl-7-(1-piperazinyl)-4*H*-[1,3]thiazeto[3,2-*a*]quinoline-3-carboxylic acid (NAD-358) は日本新薬株式会社で合成されたものを使用した。

2. 試薬

アセトニトリルおよびジクロロメタンはナカライテスク製の液体クロマトグラフ用を、ヘパリンナトリウム、メタンスルホン酸、水酸化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム二水合物およびリン酸水素二ナトリウム 12 水は和光純薬製の特級品を、リン酸およびメタノールはナカライテスク製の特級品を、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-SL) は日本曹達製を、クロロ炭酸エチルは和光純薬製の 1 級品を用いた。

3. 実験動物

7 週齢の Slc-SD 系雄性ラット (日本エスエルシー)、月齢 3~5 ヶ月の Slc-JW 系雄性ウサギ (日本エスエルシー)、9.5~11.0kg の雄性ビーグル犬 (Labor Research Enterprise) および 5.2~5.6kg の雄性カニクイザル (日本エスエルシー) を、一夜絶食後実験に供した。なお、水は自由に摂取させた。

4. 投与量および投与方法

静脈内投与の場合は、NM394 を 2*N* 水酸化ナトリウム水溶液に溶解したのち、メタンスルホン酸水溶液を加えて pH 5~6 に調製した。ラットでは 5mg/ml/kg、ウサギ、イヌおよびサルでは 5mg/0.2ml/kg の用量で、ラットの頸静脈、ウサギの耳介静脈、イヌの前肢静脈およびサルの伏在静脈に投与した。経口投与の場合は、NM441 または NM394 を 0.5% HPC-SL 水溶液に懸濁後、20 mg/10.56ml/kg の用量で経口ゾンデを用いて胃内に強制投与した。

なお、NM441 の投与量は NM394 当量に換算して表示した。

5. 採血

血液は投与後所定の時間に、ラットは頸静脈または腹大静脈、ウサギは心臓、イヌは前肢静脈、サルは伏在静脈から採取した。得られた血液をヘパリンナトリウムを含む試験管に移したのち遠心分離し、血漿は分析時まで凍結保存した。なお、血液中 NM441 の定量に当たっては NM394 への速やかな分解を防ぐため、採血後直ちにアセトニトリルを加えた。

* 〒601 京都市南区西大路通八条下ル

6. 定量法

1) 血液中 NM441 濃度

血液 1ml にアセトニトリル 0.5ml を加え攪拌後、内部標準物質の 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1ml (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ジクロロメタン 5ml を加え、10 分間の振盪後、遠心分離した。有機層を減圧下で濃縮乾固し、残渣にアセトニトリル 100 μl を加えて溶解後、その 30 μl を HPLC に注入した。HPLC チャート上で、内部標準物質に対する薬物のピーク高比を求め、予め既知濃度の NM441 について作成した検量線より薬物濃度を求めた。

HPLC は LC 100 system (横河電機) を用い、検出は 275nm で行った。ガードカラムは Capcell Pak C₁₈ SG 120 4.6mm \times 35mm (資生堂) またはガードパックプリカラムモジュール (プリカラムインサートとして Nova-Pak C₁₈ を使用, Waters), カラムは Capcell Pak C₁₈ SG 120 4.6mm \times 250mm (資生堂) を 40°C で使用した。移動相は 0.05M リン酸緩衝液 (pH 2.0)/メタノール/アセトニトリル (6 : 2 : 1, v/v) であり、流速 1.0ml/min で用いた。以上の条件で、定量限界は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

2) 血漿中 NM394 濃度³⁾

血漿 0.25~1.0ml に内部標準物質の 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5ml (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および 1% クロロ炭酸エチルを含有するジクロロメタン 3.5ml を加えて 10 分間の振盪後、遠心分離した。有機層を取り減圧下で濃縮乾固し、残渣にメタノール 50 μl を加えて溶解後、20 μl を HPLC に注入した。NM441 の測定の場合と同様に、内部標準法 (ピーク高比) によって濃度を求めた。定量限界は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

HPLC は Model 510, 712WISP (いずれも Waters), UVDEC-100-V 紫外可視分光検出器 (日本分光) を用い、検出は 275nm で行った。ガードカラム、カラムおよびカラム温度は NM441 の測定の場合と同じ条件とした。移動相は 0.05M リン酸緩衝液 (pH 2.0)/アセトニトリル/メタノール (5 : 4 : 4, v/v) であり、流速 1.0~1.7 ml/min で用いた。

7. 薬動学的解析

NM394 を静脈内および NM441 を経口投与したのちの血漿中 NM394 濃度に関しては、ラット、ウサギおよびイヌでは 2-コンパートメントオープンモデル、サルでは 3-コンパートメントオープンモデルに基づく式を濃度値に非線型最小二乗同時当てはめし、各パラメータ値を推定した。重み付け値は濃度の逆数または二乗の逆数とし、プログラム MULTI⁴⁾ を用いて、パーソナルコンピュータ (PC-9801, 日本電気) で実行した。

なお、解析に用いた血漿中 NM394 濃度は、ラットおよびウサギでは平均値を、イヌおよびサルでは個体ごとの値を用いた。

最高血漿中濃度 (C_{max}) および最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は、得られたデータより直接求めた。血漿中濃度-時間曲線下の面積 ($\text{AUC}_{0-\infty}$: 以下 AUC と記す) は無限大までの外挿を含む台形法より計算した。

II. 結 果

1 血液中 NM441 濃度

ラット、ウサギ、イヌおよびサルに NM441 を 20mg/kg 経口投与したのちの血液中 NM441 濃度は投与後 0.25, 0.5, 1, 2 時間においていずれの動物種においても定量限界以下であった。

2. 血漿中 NM394 濃度

ラットに NM394 および NM441 を 20mg/kg 経口投与したのちの血漿中 NM394 濃度推移を Fig. 1 に示した。NM394 を投与すると、NM394 濃度は 0.5 時間に C_{max} 0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示し、AUC は 0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ であった。一方、NM441 を経口投与すると、NM394 濃度は 1 時間に C_{max} 1.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示し、また AUC は 5.25 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ であった。

ラット、ウサギ、イヌおよびサルに NM394 を 5mg/kg 静脈内、NM441 を 20mg/kg 経口投与したのちの血漿中 NM394 濃度推移を Fig. 2 に示した。

静脈内および経口投与後の血漿中 NM394 濃度に 2-または 3-コンパートメントオープンモデルに基づく式を同時当てはめし、得られた薬動学的パラメータ値を Table 1 に示した。NM394 の消失半減期 ($T_{1/2}$, β) はラット (2.07h) < ウサギ (3.16h) < イヌ (4.96h) < サル (12.0h) の順に延長した。

NM441 を経口投与したのちの血漿中 NM394 濃度は、ラット、ウサギ、イヌおよびサルでそれぞれ 1.0,

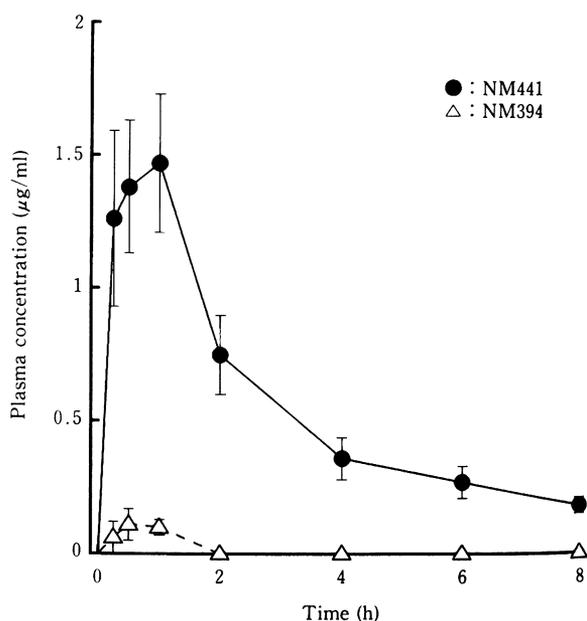


Fig. 1. Plasma concentrations of NM394 after oral administration of 20mg/kg of NM441 and NM394 to rats. Each point represents the mean \pm SD (n=5).

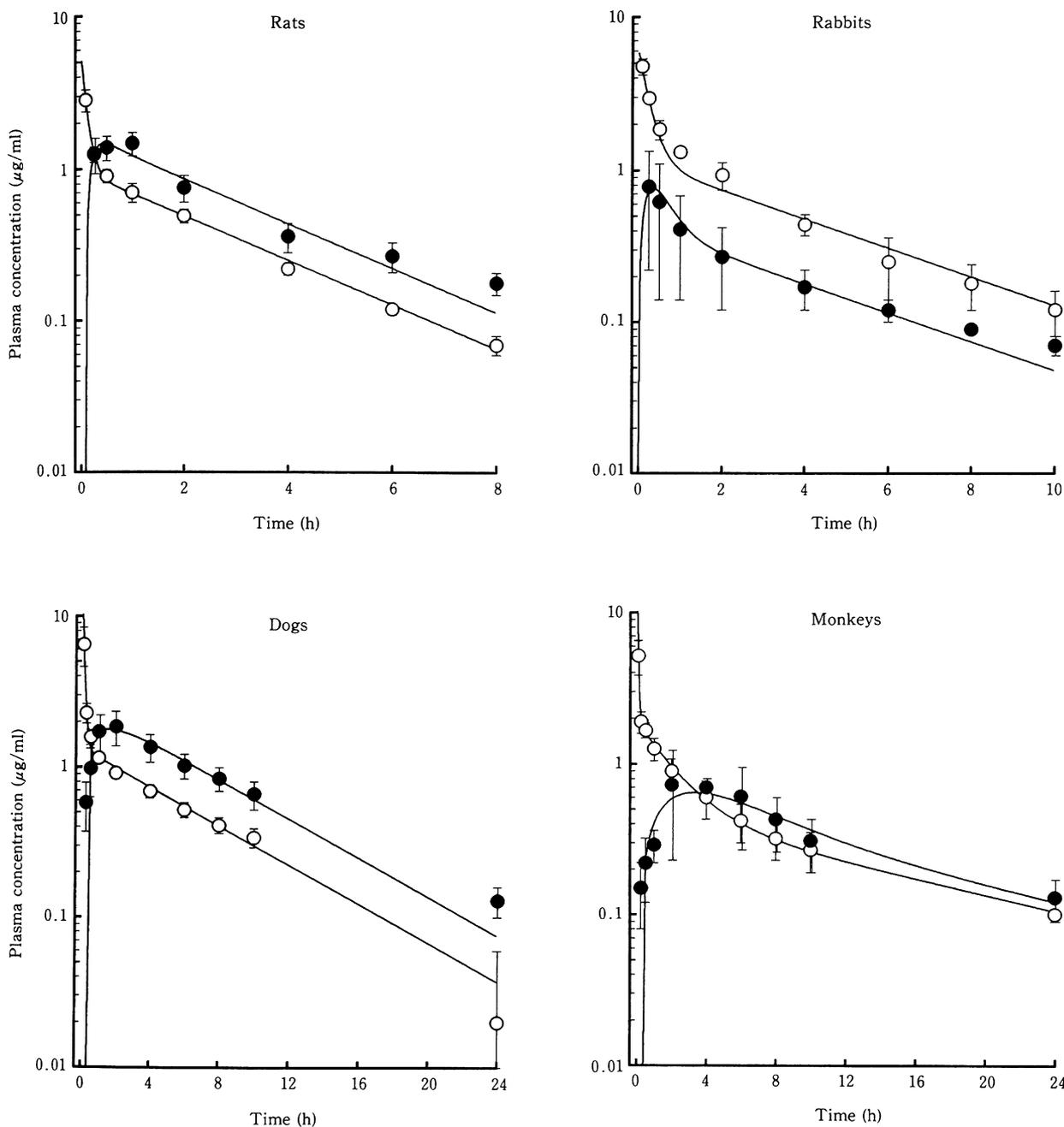


Fig. 2. Plasma concentrations of NM394 after intravenous injection of NM394 (5mg/kg) and oral administration of NM441 (20mg/kg) to rats (n=5), rabbits (n=3), dogs (n=4) and monkeys (n=3)

Each point represents the mean \pm SD.

The curves show the model-predicted values.

○ : NM394 5mg/kg, i.v.

● : NM441 20mg/kg, p.o.

0.25, 1.5 および 4.0 時間に C_{max} に達し、その値はウサギ ($0.78\mu\text{g/ml}$) < サル ($0.97\mu\text{g/ml}$) < ラット ($1.47\mu\text{g/ml}$) < イヌ ($2.00\mu\text{g/ml}$) の順に高かった。

また、NM441 を経口投与した場合の NM394 の bioavailability は、静脈内および経口投与時の血漿中 NM394 の AUC を比較することによって算出したところ、ラットで 38.9%、ウサギで 9.06%、イヌで 42.2% およびサルで 24.9% であった。

III. 考 察

NM441 は NM394 の難吸収性を改善する目的で、NM394 に 4-(5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl) methyl (DMDO) 基を導入したプロドラッグ型のニューキノロン薬である。ラットにおける経口投与試験 (Fig. 1) より、NM394 を経口投与した場合に比べ、NM441 を投与すると、NM394 の血漿中濃度は C_{max} で約 10 倍、AUC で約 40 倍それぞれ増加しており、NM441 が消化

Table 1. Pharmacokinetic parameter values of NM394 after intravenous injection of NM394 (5mg/kg) and oral administration of NM441 (20mg/kg) to rats, rabbits, dogs and monkeys

Route	Parameter	Unit	Rats	Rabbits	Dogs	Monkeys
i.v.	n		5	3	4	3
	π ^{a)}	1/h	—	—	—	17.1 ± 2.9
	α ^{a)}	1/h	9.35	4.03	6.56 ± 1.15	0.457 ± 0.156
	β ^{a)}	1/h	0.335	0.219	0.141 ± 0.013	0.0623 ± 0.0232
	k_{21} ^{a)}	1/h	2.03	0.966	1.49 ± 0.60	2.49 ± 0.70
	k_{31} ^{a)}	1/h	—	—	—	0.139 ± 0.041
	V_1 ^{a)}	L/kg	0.980	0.856	0.788 ± 0.187	0.334 ± 0.041
	$T_{1/2, \beta}$ ^{b)}	h	2.07	3.16	4.96 ± 0.47	12.0 ± 3.7
	$AUC_{0-\infty}$ ^{c)}	$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$	3.38	6.84 ± 1.04	10.9 ± 0.8	11.1 ± 2.2
p.o.	n		5	3	4	3
	T_{max}	h	1.0	0.25 ± 0.00	1.5 ± 0.6	4.0 ± 2.0
	C_{max}	$\mu\text{g}/\text{ml}$	1.47	0.78 ± 0.56	2.00 ± 0.43	0.97 ± 0.36
	k_a ^{a)}	1/h	2.22	3.12	0.737 ± 0.109	0.265 ± 0.124
	T_{lag} ^{a)}	h	0.0971	0.0000	0.158 ± 0.028	0.261 ± 0.161
	$F^{\text{a)}}$	bioavailability	0.357	0.0867	0.401 ± 0.067	0.220 ± 0.023
	$F^{\text{d)}$	bioavailability	0.389	0.0906	0.422 ± 0.068	0.249 ± 0.061
	$AUC_{0-\infty}$ ^{c)}	$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$	5.25	2.48 ± 0.65	18.4 ± 3.2	10.8 ± 1.4

Each value is the mean ± SD.

^{a)} estimated by a simultaneous nonlinear least-squares fitting of two or three compartment open model to plasma concentrations of NM394 (the mean values in rats and rabbits and the individual values in dogs and monkeys) after intravenous injection and oral administration

^{b)} derived by $0.693/\beta$

^{c)} calculated by a trapezoidal rule including extrapolation to infinity

^{d)} $([AUC]_{\text{p.o.}}/[AUC]_{\text{i.v.}}) \times ([Dose]_{\text{i.v.}}/[Dose]_{\text{p.o.}})$

管からの吸収性を著明に改善することが示された。

次に、NM441 を経口投与した場合、血液中に NM441 が存在するか否かを検討したところ、いずれの動物種においても体循環血中からは検出されなかった (定量限界 $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$)。NM441 が腸管からの吸収の過程で腸管組織、血液および肝臓で代謝されて、速やかに NM394 に変換するものと考えられる¹⁾。

NM441 を経口投与したのちの血漿中 NM394 濃度の C_{max} はウサギ < サル < ラット < イヌの順で高くなり、種差が認められた。この順番は bioavailability の順と一致しており、本薬の吸収率が異なることおよび初回通過効果の影響などの原因が関係していると思われる。なお、sparfloxacin (SPFX) でも NM441 と同様に、経口投与後サル < ラット < イヌの順に C_{max} が高くなることを報告している⁵⁾。

Enoxacin⁶⁾, fleroxacin⁷⁾ および SPFX⁵⁾ では、ラット、イヌおよびサルの中でイヌで最も消失半減期が長かったが、NM441 ではラット (2.07h) < イヌ (4.96h) < サル (12.0h) と高等動物になるにつれ長くなる傾向が認められた。

なお、NM394 静脈内投与では経口投与の場合と異なり、一過性の血圧降下がイヌで認められており⁸⁾、経口投与と同じ量を投与することは困難であった。そこで、投与量設定のために予備検討を行った結果、イヌにおいて投与時以外には外見上ほとんど変化が認められず、NM441 経口投与量の 1/4 と大きく異なる 5mg/kg を静脈内投与における投与量とした。また、薬動学的解

析では、静脈内投与時のパラメータ値に加えて、経口投与時のモデル依存的パラメータ値 (k_a , T_{lag} , F) も算出するために、静脈内および経口投与時の血漿中 NM394 濃度に、2 または 3-コンパートメントオープンモデルに基づく式を同時当てはめした。

以上、活性本体 NM394 をプロドラッグ化した NM441 は、NM394 の吸収性を著明に改善していることがラットで示され、また各種動物においても吸収性の良好なことが判明した。

文 献

- Morino A, Okuyama Y, Momota K, Ohyabu M, Ushimaru K: Pharmacokinetics of NM441, a new quinolone, in laboratory animals. 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, October, 1992
- Ozaki M, et al: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. Antimicrob Agents Chemother 35: 2490~2495, 1991
- 松田真人, 奥山義男, 森野 昭, 尾崎正邦: NM441 の体液内濃度測定法. 日化療会誌 44(S-1): 147~154, 1996
- Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. J Pharm Dyn 4: 879~885, 1981
- 山口俊和, 横川真喜子, 橋爪孝典, 馬場政子, 樋口裕紀, 松岡信男, 関根 豊: Sparfloxacin のラット, イヌ, サルにおける体内動態. 薬物動態 6: 33~41, 1991
- 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

- 7) Kusajima H, Ishikawa N, Machida M, Uchida H, Irikura T: Pharmacokinetics of a new quinolone, AM-833, in mice, rats, rabbits, dogs, and monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 304~309, 1986
- 8) 倉 紘平, 他: NM441 の一般薬理作用(2) 呼吸・循環器系, 泌尿器系およびその他の組織に及ぼす影響。日化療会誌 44(S-1), 129~146, 1996

Absorption of NM441 in various animal species

Yoshio Okuyama, Kazuo Momota and Akira Morino

Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.

Nishiohji-Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan

The absorption of NM441 was studied in rats, rabbits, dogs and monkeys after intravenous injection and oral administration. The following results were obtained.

- 1) After oral administration of 20mg/kg of NM441, NM441 was not detected in blood.
- 2) After intravenous injection of 5mg/kg of NM394 and oral administration of 20mg/kg of NM441, the half-lives of the elimination phase ($T_{1/2}$, β) of NM394 were 2.07, 3.16, 4.96 and 12.0h in rats, rabbits, dogs and monkeys, respectively.
- 3) After oral administration of 20mg/kg of NM441, the plasma concentration of NM394 reached maxima at 1.0, 0.25, 1.5 and 4.0h in rats, rabbits, dogs and monkeys, respectively. Maximal concentrations in rats, rabbits, dogs and monkeys were 1.47, 0.78, 2.00 and 0.97 μ g/ml, respectively.
- 4) The bioavailability of NM441, calculated from the ratio of AUC values for plasma NM394 concentration after intravenous injection of NM394 and oral administration of NM441, was 38.9, 9.06, 42.2 and 24.9% in rats, rabbits, dogs and monkeys, respectively.