

新キノロン系抗菌剤Fleroxacinのヒト及び各種実験動物における代謝

川原富美男・大家 毅・永津芳雄・内田 広

杏林製薬株式会社 中央研究所*

Fleroxacinの代謝物をイヌ及びウサギの尿から単離、同定した。また、第1相臨床試験で得られた血清及び尿を用いてfleroxacinの代謝を検討し、以下の知見を得た。

1. イヌ及びウサギの尿からは未変化体、デメチル体、N-オキシド体が、ウサギの尿からはこれら以外にもデメチルオキシド体、ホルミル体の合計5個が単離、同定された。

2. ヒトの血清中では大部分が未変化体として存在し、代謝物として検出されたデメチル体及びN-オキシド体濃度はピーク時でいずれも未変化体の約1%であった。

3. ヒトの尿中には72hまでに服用量の83%が回収され、未変化体が約90%を占めていた。4つの代謝物、デメチル体、N-オキシド体、デメチルオキシド体及びホルミル体が尿中から検出され、それぞれ服用量の5%、5%、0.3%、0.2%であった。

4. Fleroxacinはウサギを除いて生体内では代謝を受けにくく、大部分が未変化体として挙動するものと思われた。また、fleroxacinは各種実験動物と比較するとヒトにおいて最も代謝的に安定であることが示唆された。

5. Fleroxacin服用後の抗菌活性のほとんどは未変化体によるものと考えられた。

Key words : Fleroxacin, 代謝, イヌ, ウサギ, ヒト

Fleroxacin[6, 8-difluoro-1-(2-fluoroethyl)-1, 4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid]は各種実験動物においてほぼ完全に吸収され、脳以外の組織に良好に分布することが知られている¹⁾。今回、我々はfleroxacinをイヌ及びウサギに投与し、その尿中から未変化体及び代謝物を単離、同定した。一方、KUSAJIMAら²⁾は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により各種実験動物における代謝物を定量し種差があることを報告した。今回、その方法によりfleroxacinの臨床第1相試験³⁾で得られた200mg単回服用後の血清及び尿を用いてヒトにおけるfleroxacinの代謝を合わせて検討した。

1. 実験材料及び実験方法

1. 投与薬剤、合成標品及び試薬

投与薬剤及び代謝物の同定、定量のため以下に示す標品を当研究所で合成して用いた(Fig. 1)。Fleroxacin(未変化体), demethyl fleroxacin(デメチル体), fleroxacin N-oxide(N-オキシド体), demethyl-3-oxo fleroxacin(デメチルオキシド体), 3-oxo fleroxacin(オキシド体), demethyl-4-formyl fleroxacin(ホルミル体)。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 実験動物

体重3.4kgの日本白色種雄性ウサギ及び9~11kgの雄性ビーグル犬を1夜絶食後使用した。なお、水はすべて

の期間において自由に摂取させた。

3. 薬剤の投与

ウサギにfleroxacinの1.5%水溶液を50mg/kgになるようにネラトンカテーテルで強制経口投与し、イヌには20mg/kgとなるようにfleroxacinをゼラチンカプセルに詰め経口投与した。

4. 試料の採取

ウサギではfleroxacinを投与後72hまで、イヌでは48hまでの自然排泄された尿を24h毎に採取した。

定量に用いたヒトの血清及び尿は臨床第1相試験³⁾において200mgのfleroxacinを空腹時単回経口投与後得られた試料であり、測定までの間、-20℃以下で保存した。

5. 代謝物の単離、精製及び分析

Fleroxacinを投与したウサギ及びイヌの尿についてFig. 2のように溶媒抽出、TLC、HPLC分取、TLC、溶媒抽出又は固相抽出の順で分画と単離精製を行った。イヌの尿を用いたN-オキシド体の同定ではシリカゲルカラムクロマトグラフィー、TLC、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの順で素早く単離精製を行った(Fig. 3)。

1) 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; メルク)を用いた。展開溶媒として、A: エタノール・酢酸・水・メチルイソブチルケトン(3:1:1:5, V/V), B: クロロホルム・メタノール・酢酸・水(25:11:3

* 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町御手洗2399-1

：3，V/V)及びC：ジオキサン・28%アンモニア水(3：2，V/V)を用いた。標品及び代謝物のスポット位置は254及び365nmの紫外線照射又はヨウ素ガス暴露により確認した。

2) HPLC

代謝物の分取、精製及び標品との保持時間の確認には、日立635A形ポンプと日立635M形UVモニター(UV: 280nm)を用いた。カラムはAsahipak ES-502N(陰イオン交換)及びAsahipak ES-502C(陽イオン交換、いずれも内径7.6×100mm, 旭化成)を使用した。前者用には30mM 塩化ナトリウム含有の50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.7)・アセトニトリル(100:3, V/V)あるいは30mM 塩化ナトリウム含有の20mM リン酸緩衝液(pH8.7)・アセトニトリル(100:5~10, V/V)を移動相とし、後者用には0.3M 塩化ナトリウム含有の50mM リン酸緩衝液(pH3.6)・アセトニトリル(100:13,

V/V)を移動相とした。

3) カラムクロマトグラフィー

シリカゲルカラムはワコーゲル C-200シリカゲル(和光純薬)をガラスカラムに充填して用いた。ボンドエルト® (アナリティケム インターナショナル)はSCXタイプを酸、アルカリで活性化して使用した。

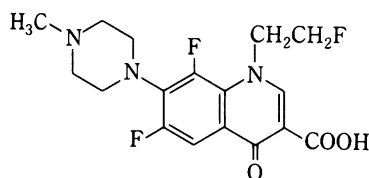
4) 酵素処理

β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ(ペーリンガー)を1M 酢酸緩衝液(pH5.2)で希釈して試料に同容量を加え、37℃、18h酵素処理した。酵素活性は約0.6u/mlの β -グルクロニダーゼ及び約0.3u/mlのアリルスルファターゼ活性となるように希釈した。

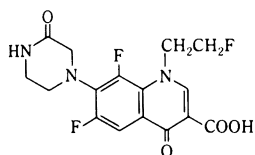
5) 紫外吸収スペクトル(UV)

日立124形分光光度計を用い、各試料をMeOH-28%アンモニア水(10:1, V/V)に溶解して測定した。

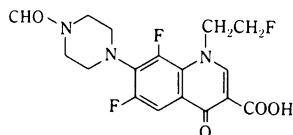
6) 質量分析(MS)



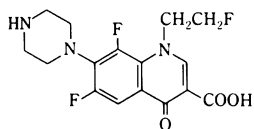
Fleroxacin (M-3)



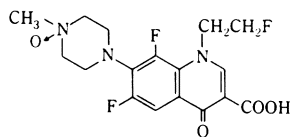
Demethyl-3-oxo fleroxacin (M-1)



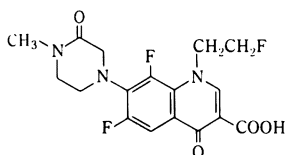
Demethyl-4-formyl fleroxacin (M-2)



Demethyl fleroxacin (M-4)



Fleroxacin N-oxide (M-5)



3-Oxo fleroxacin

Fig. 1. Chemical structures of fleroxacin and its metabolites.

JMS-D300型質量分析計(日本電子)を用いて試料を直接導入し、イオン化電流300 μ A, イオン化電圧は24eV (EI)及び240eV (CI, イソブタンガス)で測定した。

7) ^1H 核磁気共鳴スペクトル(^1H -NMR)

JNM-FX90QFT-NMR(日本電子)を用い試料をDMSO- d_6 に溶解し、TFA- d_1 を1滴及び内部標準としてのテトラメチルシランを添加して測定した。

8) 溶媒抽出における回収率

代謝物の検索に用いた溶媒抽出分画法における回収率を ^{14}C -fleroxacinにより検討した。検体には永津ら⁴⁾により得られた ^{14}C -fleroxacin(比放射能37KBq/mg)の10mg/kgを静脈注射したウサギの0~24h尿を用いた。 ^{14}C の測定は、液体シンチレーションスペクトロメータ(Tri-Carb 3385, Packard)を用いて行った。

6. ヒトの血清中及び尿中代謝物の定量

血清中代謝物の定量には、日立655A-12形ポンプと

日立F1000形ケイ光モニターを用い(Ex: 290nm, Em: 450nm), 尿中代謝物の定量には島津LC-6A形ポンプとSPD-6AV形 UV-VISモニター(UV: 340nm)を用いた。定量はKUSAJIMAらの方法²⁾に従って行った。即ち、血清、尿から未変化体及び代謝物をイオン対抽出法で一斉抽出する前処理方法を用いた。分析カラムとしてTSK gel ODS-120T(5 μ m, 内径4.6 $\times$ 250mm, 東ソー)を用い、TSK gel ODS-120T(5 μ m, 内径4.0 $\times$ 10mm)をミニガードカラムとした。ヒトの血清中濃度はメタノール・5mM 硫酸水素テトラ-n-ブチルアンモニウム(28:72, V/V)の移動相で測定した。尿中濃度は1液としてメタノール・5mM 硫酸水素テトラ-n-ブチルアンモニウム(25:75, V/V)に2液としてのメタノールを30分間で40%混合するリニアグラジエントモードを採用し、1サンプルの測定を40分で行った。

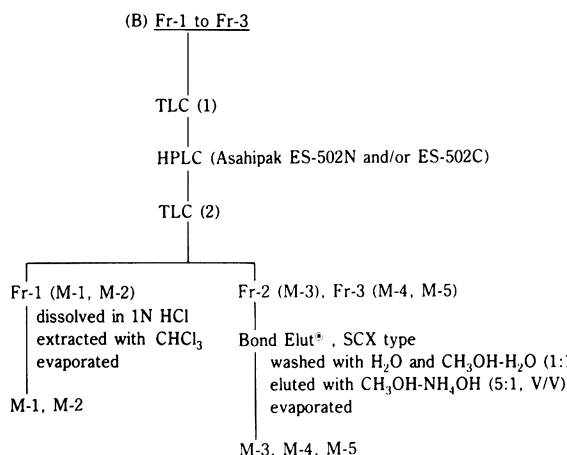
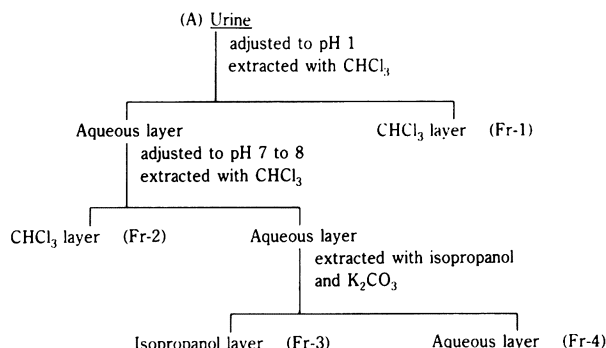


Fig. 2. Fractionation of the metabolites of fleroxacin in dog and rabbit urine.

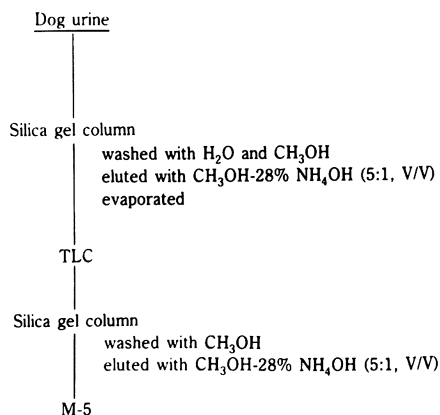


Fig. 3. Isolation procedure for M-5 in dog urine.

II. 実験成績

1. 代謝物の同定

ウサギ及びイヌにfleroxacinを投与して得られた尿をAsahipak ES-502Cカラムに直接注入したときのHPLCクロマトグラムをFig. 4, 5に示した。クロマトグラム上にウサギでは4~5個, イヌでは3個のピークが検出された。また, このウサギの尿を酵素処理後Asahipak ES-502Nカラムに直接注入したときのHPLCクロマトグラムをFig. 6に示した。以上の知見と合成標品について調べた性質から酸性, 中性, アルカリ性(塩析)クロロホルム抽出を試みた(Fig. 2(A))。この時の各分画における ^{14}C 放射活性の回収率はウサギの投与尿を用いた実験より, Fr-1に29.1%, Fr-2に32.9%, Fr-3に30.9%, 残りが7.1%と大部分が有機層に回収されていた(Table 1)。

ウサギの尿を溶媒抽出して分画した各フラクションのHPLCによるクロマトグラムはFig. 7のようになり, 主に5つのピークが検出された。イヌも同様に3つのピークが認められた。また, 酵素処理によってウサギの尿のクロマトグラムに著明な変化はなかった(Fig. 6)。次に各フラクションを各々, TLCで展開分離後主スポットを抽出し, Asahipak ES-502N又は502Cの順に分取精製し

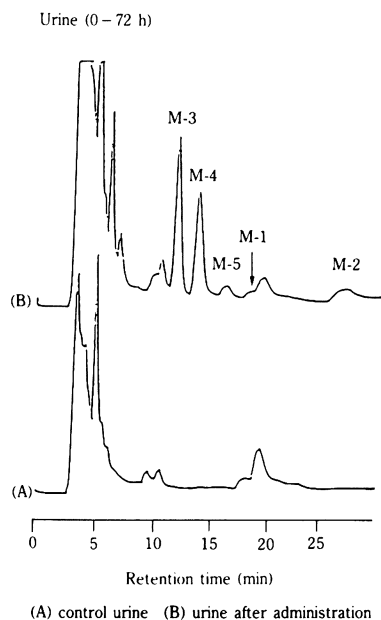


Fig. 4. Representative chromatograms of rabbit urine after oral administration of fleroxacin at a dose of 50 mg/kg.

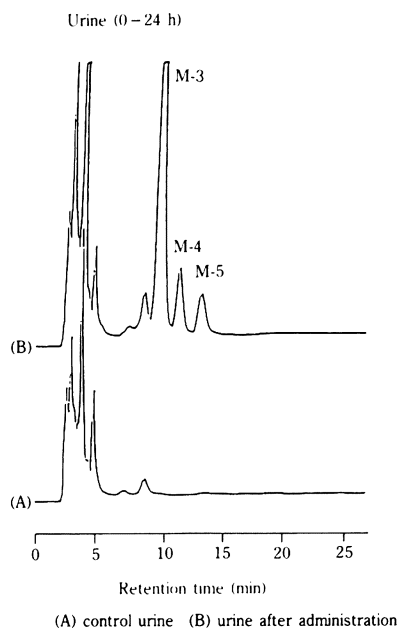


Fig. 5. Representative chromatograms of dog urine after oral administration of fleroxacin at a dose of 20 mg/kg.

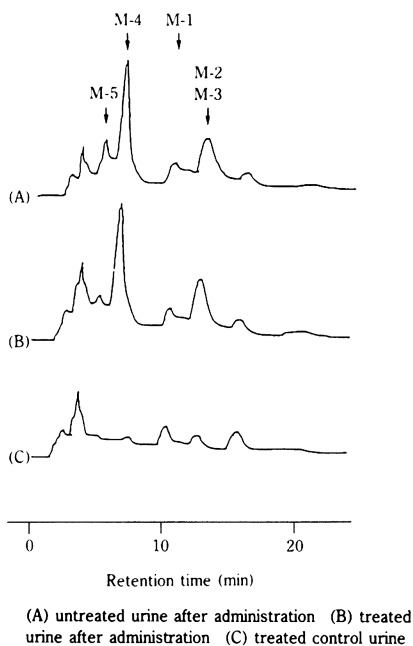


Fig. 6. Representative chromatograms of rabbit urine before and after treatment with β -glucuronidase/arylsulfatase.

Table 1. Recovery of ¹⁴C activity in each fraction of rabbit urine for 24 h after administration

Fraction	¹⁴ C activity (% of total activity)
Fr-1	29.1
Fr-2	32.9
Fr-3	30.9
Fr-4	7.1

た。TLCですべての分画を展開精製後Fr-1のM-1, M-2はそれぞれ塩酸性でクロロホルム抽出し, Fr-2のM-3, Fr-3のM-4, M-5はそれぞれボンドエルト®で脱塩精製した(Fig. 2(B))。分取精製した各代謝物のTLCにおけるR_f値及びHPLCにおける保持時間をTable 2に, UV吸収スペクトルにおけるλ_{max}とλ_{min}をTable 3に示した。また, M-5の¹H-NMRにおけるケミカルシフト値(δ, ppm)をTable 4に示した。

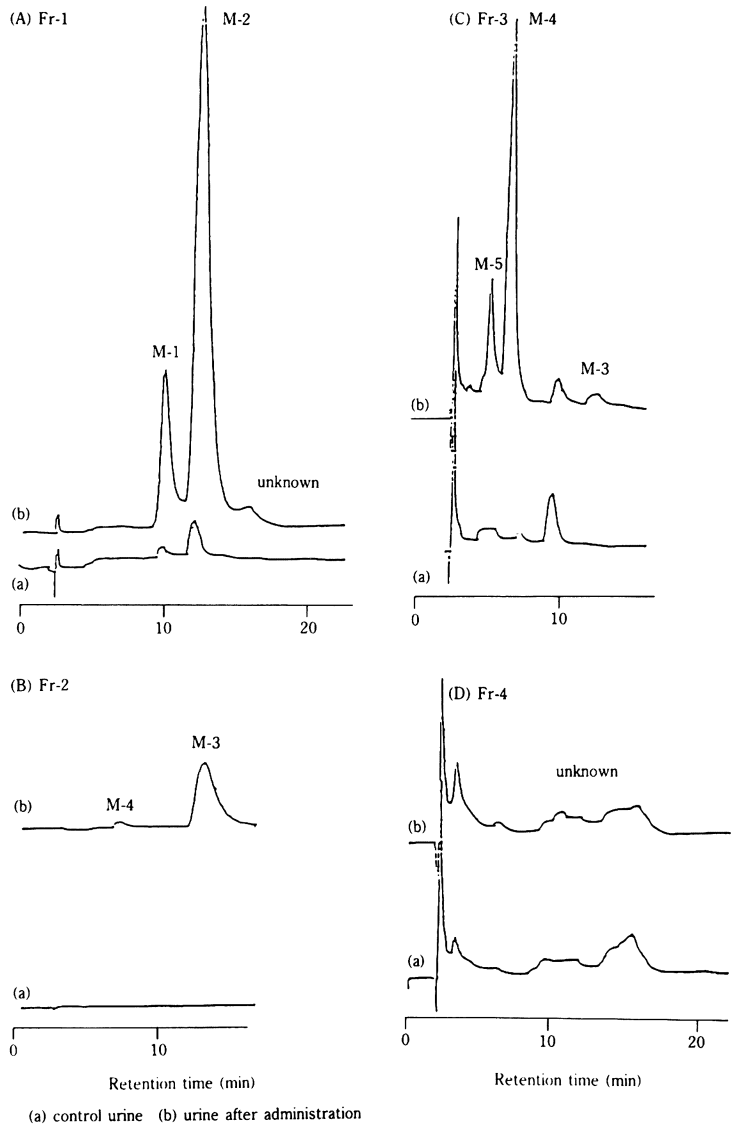


Fig. 7. Representative chromatograms of each fraction after solvent extraction of rabbit urine.

Table 2. *R_f* values in TLC and retention times (R_t) in HPLC of urine metabolites of fleroxacin and authentic materials

Compound	<i>R_f</i> value						<i>R_t</i> (min)	
	A*		B		C		D	
	rabbit	dog	rabbit	dog	rabbit	dog	rabbit ⁽¹⁾	dog ⁽²⁾
M-1, demethyl-3-oxo fleroxacin	0.50 ~ 0.51	—	0.73	—	0.45 ~ 0.46	—	9.7	—
M2, demethyl-4-formyl fleroxacin	0.55	—	0.77	—	0.49	—	12.0	—
M-3, fleroxacin	0.09 ~ 0.10	0.09	0.35	0.24	0.51	0.49	11.8	8.1
M-4, demethyl fleroxacin	0.17 ~ 0.18	0.19	0.32	0.25	0.45	0.43	6.5	4.7
M-5, fleroxacin N-oxide	0.12 ~ 0.13	0.12	0.36	0.22	0.28	0.26	4.8	3.5
3-Oxo fleroxacin	0.51	—	0.77	—	0.47	—	9.2	—

* Solvent systems
A: EtOH·AcOH·H₂O·Methyl isobutyl ketone (3 : 1 : 1 : 5, V/V)
B: CHCl₃·MeOH·AcOH·H₂O (25 : 11 : 3 : 3, V/V)
C: Dioxane·28% NH₄OH (3 : 2, V/V)
D: (1) 30 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl (pH 8.7)·CH₃CN (100 : 3, V/V)
(2) 30 mM NaCl in 20 mM Na₂HPO₄ (pH 8.7)·CH₃CN (100 : 5, V/V)

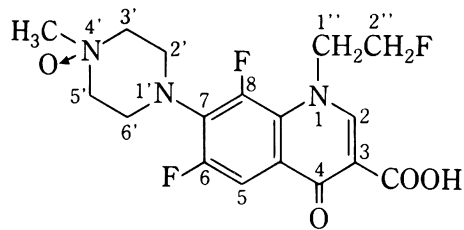
Table 3. UV absorption of metabolites of fleroxacin and authentic materials

Compound	Rabbit		Dog	
	λ _{max} (nm)	λ _{min} (nm)	λ _{max} (nm)	λ _{min} (nm)
M-1, demethyl-3-oxo fleroxacin	281 , 325	252 ~ 253, 304 ~ 305	—	—
M-2, demethyl-4-formyl fleroxacin	281 ~ 282, 325	253 , 303	—	—
M-3, fleroxacin	283 ~ 284, 326	254 , 303 ~ 304	283 , 325 ~ 326	253 ~ 254, 303
M-4, demethyl fleroxacin	282 ~ 283, 325	254 , 304	282 ~ 283, 325	253 ~ 254, 304
M-5, fleroxacin N-oxide	280 , 325	250 , 303	280 , 325	250 , 302 ~ 303

Measured in MeOH·28% NH₄OH (10 : 1, V/V)

Table 4. ¹H-NMR chemical shifts of M-5 and fleroxacin N-oxide

Compound	Chemical shift (δ, ppm)								
	2	5	2'	3'	5'	6'	4'-CH ₃	1''	2''
M-5,fleroxacin N-oxide	8.89	8.01 ~ 7.86	3.69 ~ 3.86				3.62	4.7 ~ 5.2	



1) M-1

Fig. 2によって単離精製されたM-1のMS(EI)スペクトルをFig. 8(a)に示した。酸性でクロロホルムに抽出された分画であることからピペラジン環の塩基性を失ったアシル化物かオキソ体と考えられた。 m/z 369に分子イオンを示し、脱炭酸による m/z 325($[M-44]^+$)とenoxacin⁵⁾で示されたと同様にオキソ体に特徴的な m/z 255($[M-44-70]^+$)が認められたこと、デメチル体+14の分子イオンであること等からデメチル体のオキソ化物と予想された。M-1のマスフラグメントはデメチルオキソ体標品と一致し、TLCでの R_f 値、UVスペクトル、HPLCの保持時間においても標品と一致した。一方、TLC、HPLCで類似性を示したオキソ体の標品ではFig. 8(b)のMS(EI)スペクトルが得られM-1とは明らかに異なっていた。従って、M-1をデメチルオキソ体と同定した。

2) M-2

M-1と同じ分画(Fr-1)に抽出されたことからピペラジン環の塩基性は消失していると考えられた。MS(EI)スペクトルはFig. 8(c)のように m/z 383に分子イオンを示し、脱炭酸による m/z 339($[M-44]^+$)、 m/z 255($[M-44-84]^+$)が認められたことからデメチル体のホルミル化を受けたものか、オキソ体が予想されたがホルミル体の標品とスペクトルが一致した。HPLCの保持時間、TLC、UVスペクトルにおいてもホルミル体の標品と一致した。従って、M-2をホルミル体と同定した。

3) M-3

ウサギの尿から中性クロロホルム分画(Fr-2)に抽出されたM-3のMS(EI)スペクトルをFig. 8(d)に示した。 m/z 369に分子イオンが見られ、 m/z 325($[M-44]^+$ 、脱炭酸)、 m/z 254($[M-44-71]^+$)、 $m/z=71$ ($[CH_2=N(CH_3)CH_2-CH_2]^+$)が検出されたことから未変化体と推定され、標品とも一致した。また、TLC、HPLC、UVスペクトルも一致し、M-3を未変化体と同定した。イヌでも同様であった。

4) M-4

アルカリ性イソプロパノール分画(Fr-3)から精製されたM-4のMS(EI)スペクトルをFig. 8(e)に示した。 m/z 355に分子イオンが見られ、これは未変化体の分子量より14質量数が少なく、脱メチル体が予想された。フラグメントイオンについても m/z 313($[M-CH_2=N-CH_2]^+$)、 m/z 269($[M-42-CO_2]^+$)が標品と一致した。TLC、HPLC、UVスペクトルも標品と一致し、デメチル体と同定した。イヌの尿からも同様の結果が得られた。

5) M-5

ウサギの尿からM-4と同じ分画(Fr-3)に抽出されたM-5はTLC、HPLC、UVスペクトルでN-オキシド体と一

致したが、MS(EI)では分子イオン近辺の情報は得られなかった。また、¹H-NMR(Table 4)で標品のケミカルシフトとほとんど一致したが精製度及び精製量ともに不足していた。そこで、N-オキシド体がより多く尿中に排泄され、他の代謝物が少ないイヌの尿を採取し、Fig. 3に従ってM-5分画を迅速に単離精製した。Fig. 8(f)にM-5のMS(CI、イソブタン)を示したが、 m/z 384に $[M-H]^+$ の凝分子イオンが見られ、付加イオン及び凝分子イオンから脱酸素した m/z 426($[M+57-0]^+$)、 m/z 412($[M+43-0]^+$)及び m/z 370($[MH-0]^+$)も標品のMSスペクトルと一致した。イヌの場合も3種のTLC条件、HPLC、UVスペクトルが標品と一致したことからM-5をN-オキシド体と同定した。

2. ヒトの血清中及び尿中代謝物の定量

1) 血清中代謝物

ヒトの血清中代謝物の定量における典型的なHPLCクロマトグラムをFig. 9に示した。Fleroxacinの200mgを空腹時に経口投与したとき、未変化体の血清中濃度は投与後2hでピーク値2.40 μ g/mlに達し、その後次第に減少して48hでは0.08 μ g/mlとなった。代謝物としてはN-オキシド体とデメチル体が検出された。N-オキシド体は投与後約1hから、デメチル体はそれよりやや遅れて検出されたがいずれの代謝物もピーク時で未変化体の約1%であり投与後48hには検出限界以下となった(Table 5)。

2) 尿中代謝物

尿中代謝物の定量における典型的なHPLCクロマトグラムをFig. 10に示した。

Fleroxacinの200mgを空腹時に投与したときの未変化体及び代謝物の尿中濃度と尿中回収をTable 6に示した。投与後72hで未変化体以外にデメチル体、N-オキシド体、デメチルオキソ体、ホルミル体が検出され、オキソ体はいずれの検体でも検出限界以下であった。投与72hまでの総回収率は83%と良好な吸収を反映していた。また、未変化体の全尿中排泄に占める割合も87%であった。

Ⅲ. 考 察

ウサギの尿中には未変化体(M-3)以外にピペラジン環の4位が酸化を受けたN-オキシド体(M-5)とデメチル体(M-4)、そしてデメチル体の3位オキソ体(M-1)が同定されたが、グルクロン酸抱合体は検出されず、pefloxacacin⁶⁾(PFLX)と同様な代謝様式が見られた。しかし、fleroxacinで同定されたホルミル体(M-2)はPFLXで報告されておらず、逆にPFLXで多いとされるオキソ体がfleroxacinでは同定できなかった。イヌでは、未変化体とデメチル体、N-オキシド体が同定され、尿中代謝物の種類に種差が見られたが、これはKUSAJIMAら²⁾の結果と

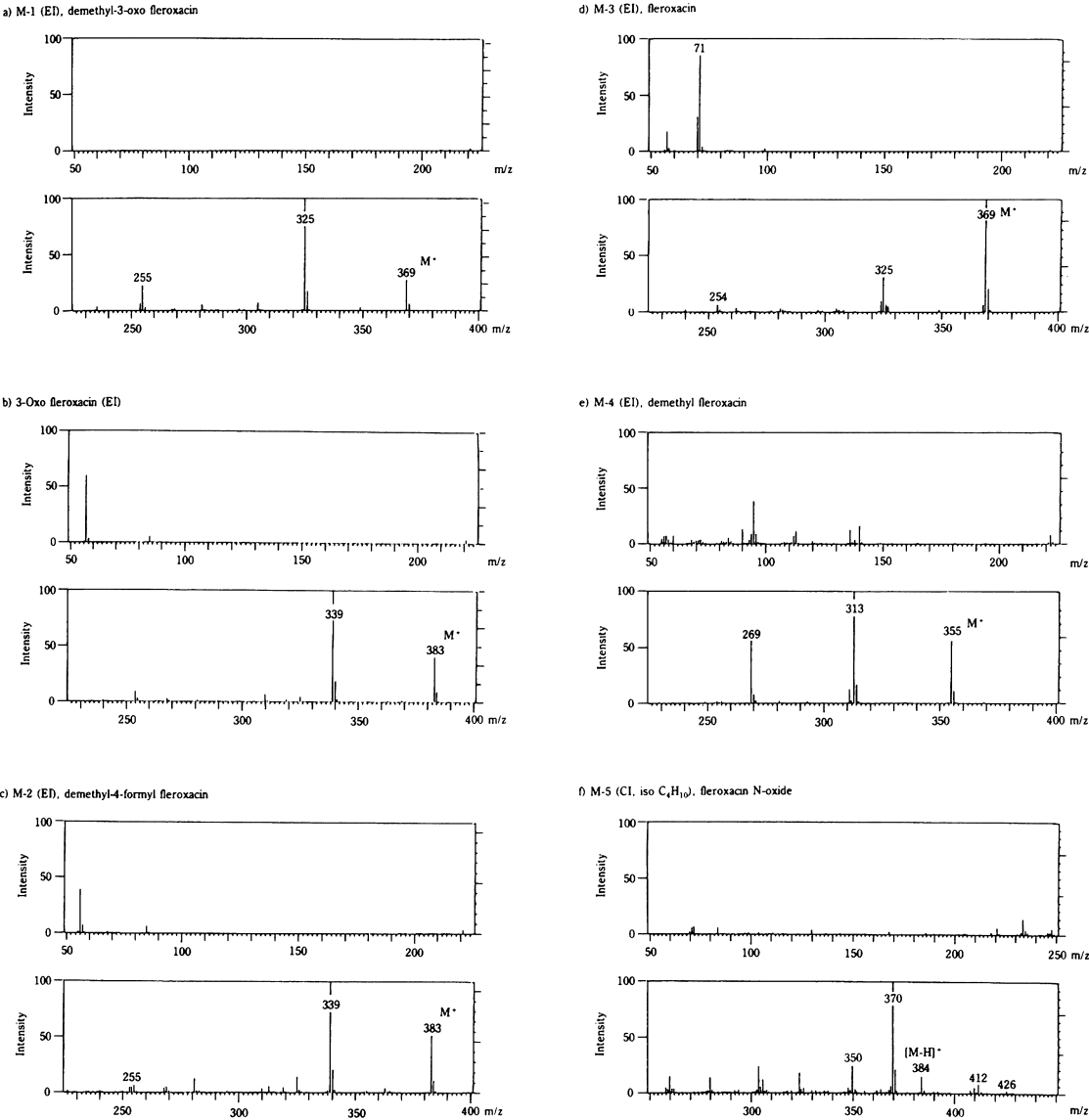
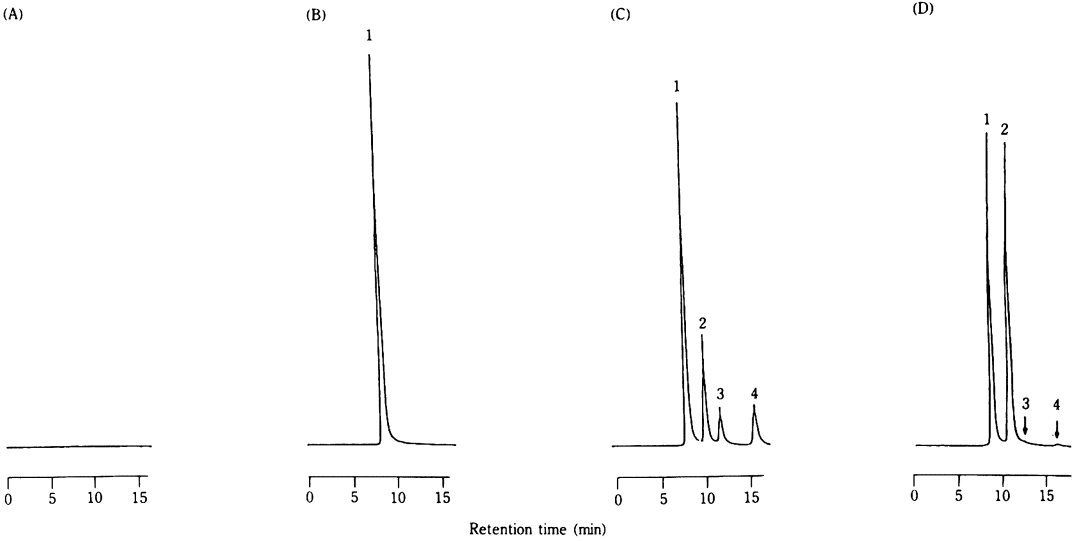


Fig. 8. Mass spectra of metabolites of fleroxacin and authentic materials.



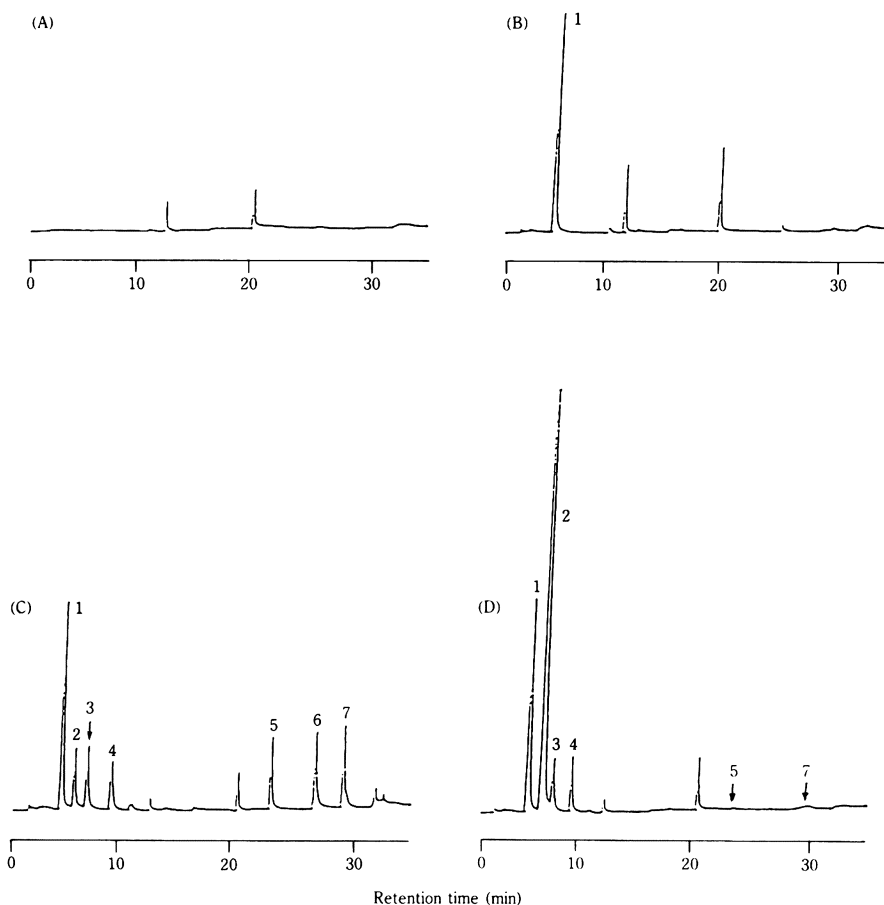
(A) control serum (B) serum spiked with internal standard (1) (C) serum spiked with internal standard (1) and 0.5 µg/ml of fleroxacin (2), demethyl fleroxacin (3) and fleroxacin N-oxide (4) (D) serum from 5 h after a single oral administration.

Fig. 9. Representative chromatograms of human serum.

Table 5. Serum concentrations of fleroxacin and its metabolites in fasting volunteers after a single oral administration (200 mg)

	Volunteer no.	Serum concentration (µg/ml)										
		0.33 h*	0.67	1	2	3	5	7	9	12	24	48
Fleroxacin	6	—	0.08	1.04	2.89	2.43	2.12	1.74	1.46	1.44	0.65	0.12
	7	0.16	1.51	2.51	1.94	1.76	1.41	1.11	0.96	0.71	0.26	0.04
	8	1.28	2.39	2.58	2.16	2.06	1.30	1.40	1.14	1.06	0.54	0.09
	9	0.03	0.09	0.30	3.38	2.42	1.88	1.63	1.49	1.21	0.46	0.07
	10	0.06	0.29	0.73	1.63	2.90	2.02	1.61	1.38	1.10	0.52	0.10
	mean	0.31	0.87	1.43	2.40	2.31	1.85	1.50	1.29	1.10	0.49	0.08
	± SD	± 0.55	± 1.04	± 1.05	± 0.72	± 0.43	± 0.27	± 0.25	± 0.23	± 0.27	± 0.14	± 0.03
Demethyl fleroxacin	6	—	—	—	—	—	0.01	0.01	—	0.01	—	—
	7	—	—	—	0.02	—	0.01	0.02	0.02	0.01	—	—
	8	—	—	0.09	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	—
	9	—	—	—	—	—	—	0.02	0.02	0.02	—	—
	10	—	—	—	—	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	—
	mean	—	—	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	—	—
	± SD	—	—	± 0.04	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	—	—
Fleroxacin N-oxide	6	—	—	—	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.01	—
	7	—	—	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	—	—
	8	—	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	—
	9	—	—	—	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	—	—
	10	—	—	0.01	0.01	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	—
	mean	—	—	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	—
	± SD	—	—	± 0.02	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.01	—

* time after administration
— . less than detectable limit (0.01 µg/ml)



(A) control urine (B) urine spiked with internal standard (1) (C) urine spiked with internal standard (1) and 10 µg/ml of fleroxacin (2), demethyl fleroxacin (3), fleroxacin N-oxide (4), demethyl-3-oxo fleroxacin (5), 3-oxo fleroxacin (6) and demethyl-4-formyl fleroxacin (7) (D) urine after a single oral administration.

Fig. 10. Representative chromatograms of human urine.

合致するものであった。ピペラジン環の4位窒素にメチル基が導入されたPFLX⁶⁾, amifloxacin⁷⁾, ofloxacin⁸⁾ (OFLX)でもfleroxacinと同様に各種実験動物ではデメチル体あるいはN-オキシド体が主な代謝物として報告されており、代謝的な安定性における差異はあるがこれらの主代謝経路はいずれもOFLXで述べられたような^{8,9)}カルビノールアミンを経由するN-脱アミノ化とN-オキシドを経由するピペラジン環の代謝であると考えられる。

Fleroxacinの臨床第1相試験で³⁾得られた血清及び尿について代謝物を定量したところ、ヒトの血清中には未変化体が大部分を占め、尿中でも総排泄量の87%が未変化体であり、実験動物²⁾と比較して最も代謝的に安定であった。OFLX¹⁰⁾の服用量に対する尿中代謝物の割合はデメチル体とN-オキシド体で約4%、未変化体として

74%が説明されているが、fleroxacinではデメチル体5%、N-オキシド体5%、デメチルオキシ体及びホルミル体で0.5%、未変化体が73%となった。即ち、fleroxacinはヒトにおいては代謝を受け難く、また、投与量の80%以上が尿中に回収され、OFLXと同様な結果であった。

主代謝物の中でN-オキシド体は*in vitro*ではほとんど抗菌活性がなく、デメチル体は*in vitro*及び*in vivo*において未変化体に匹敵する抗菌スペクトルと抗菌活性を示すと報告されている¹¹⁾。ヒトの血中及び尿中における代謝物の存在率が低いことを加味すると代謝物の*in vivo*活性への関与はわずかであると考えられた。

謝 辞

本研究に際し、NMR分析に御協力いただいた当研究

Table 6. Urine concentrations and cumulative urinary excretion recoveries of fleroxacin and its metabolites in fasting volunteers after a single oral administration (200 mg)

	Volunteer no.	Urine concentration ($\mu\text{g/ml}$)								Cumulative urinary excretion recovery (% of dose)							
		0~2h*	2~4	4~6	6~8	8~12	12~24	24~48	48~72	2h	4	6	8	12	24	48	72
Fleroxacin	6	68.6	48.4	78.7	97.1	84.0	68.2	29.3	6.9	6.5	14.1	18.5	25.3	32.8	51.0	67.0	70.5
	7	90.4	70.7	197	102	76.5	45.2	11.2	2.8	12.5	22.2	30.5	36.6	44.1	60.0	70.0	71.5
	8	106	54.9	80.6	77.5	97.2	86.1	26.0	4.7	10.4	19.0	25.9	32.7	41.9	58.0	70.0	72.5
	9	51.5	101	180	165	121	92.9	26.0	4.5	6.1	16.2	23.8	30.4	39.2	57.0	69.0	71.0
	10	59.2	177	144	105	86.2	83.0	26.3	5.6	3.0	11.8	19.7	29.2	41.2	61.5	75.5	78.0
	mean	75.1	90.4	136	109	93.0	75.1	23.8	4.9	7.7	16.7	23.7	30.8	39.8	57.5	70.3	72.7
	$\pm$ SD	± 22.6	± 52.5	± 55	± 33	± 17.3	± 19.0	± 7.2	± 1.5	± 3.8	± 4.1	± 4.9	± 4.2	± 4.3	± 4.0	± 3.2	± 3.1
Demethyl fleroxacin	6	2.0	2.4	3.5	6.7	5.0	5.9	1.7	0.5	0.2	0.6	0.8	1.3	1.8	3.4	4.4	4.6
	7	4.8	4.3	12.8	6.0	5.1	3.6	0.7	0.3	0.7	1.3	1.9	2.2	2.8	4.1	4.7	4.9
	8	5.1	2.9	6.0	5.7	8.3	7.8	2.5	0.4	0.5	1.0	1.5	2.0	2.8	4.3	5.6	5.8
	9	1.3	5.7	11.5	13.0	10.6	8.2	2.3	0.6	0.2	0.8	1.3	1.8	2.6	4.2	5.4	5.6
	10	0.8	8.4	8.4	4.5	6.4	6.3	1.7	0.3	0.0	0.5	1.0	1.4	2.3	3.9	4.8	5.0
	mean	2.8	4.7	8.4	7.2	7.1	6.4	1.8	0.4	0.3	0.8	1.3	1.7	2.5	4.0	5.0	5.2
	$\pm$ SD	± 2.0	± 2.4	± 3.8	± 3.3	± 2.4	± 1.8	± 0.7	± 0.1	± 0.3	± 0.3	± 0.4	± 0.4	± 0.4	± 0.4	± 0.5	± 0.5
Fleroxacin N-oxide	6	1.5	2.8	6.5	7.5	9.2	6.1	2.1	0.3	0.1	0.6	0.9	1.4	2.2	3.7	4.8	5.0
	7	1.9	3.5	12.8	6.0	5.3	3.3	0.7	—	0.2	0.7	1.2	1.6	2.1	3.2	3.8	3.8
	8	3.4	3.7	6.8	6.3	9.9	8.1	2.0	0.5	0.3	0.9	1.4	2.0	2.9	4.3	5.2	5.5
	9	1.1	6.1	12.6	12.0	10.8	6.5	1.7	0.4	0.1	0.7	1.2	1.7	2.4	3.6	4.4	4.5
	10	1.5	8.6	10.6	6.5	6.2	5.8	1.7	0.2	0.1	0.5	1.0	1.6	2.4	3.8	4.6	4.7
	mean	1.9	4.9	9.9	7.7	8.3	6.0	1.6	0.3	0.2	0.7	1.1	1.7	2.4	3.7	4.6	4.7
	$\pm$ SD	± 0.9	± 2.4	± 3.1	± 2.5	± 2.4	± 1.7	± 0.6	± 0.2	± 0.1	± 0.1	± 0.2	± 0.2	± 0.3	± 0.4	± 0.5	± 0.6
Demethyl 3-oxo fleroxacin	6	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	0.4	0.5	1.4	0.6	0.6	0.4	—	—	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4
	8	—	—	—	—	0.3	0.4	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
	9	—	—	0.3	1.1	0.8	0.8	0.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.3	0.4	0.6
	10	—	0.6	0.6	0.4	0.5	0.4	—	—	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3
	mean	—	0.2	0.5	0.4	0.4	0.4	—	—	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3
	$\pm$ SD		± 0.3	± 0.6	± 0.5	± 0.3	± 0.3			± 0.0	± 0.0	± 0.1	± 0.1	± 0.1	± 0.2	± 0.2	± 0.2
3-Oxo fleroxacin	6	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	mean	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	$\pm$ SD									± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0
Demethyl 4-formyl fleroxacin	6	—	—	—	—	0.4	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	0.4	0.2	—	0.3	0.3	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	8	—	—	0.5	—	0.3	0.5	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	0.2
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	10	—	0.9	0.3	—	0.2	0.6	—	0.5	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5
	mean	—	0.2	0.2	—	0.2	0.2	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2
	$\pm$ SD		± 0.4	± 0.2		± 0.2	± 0.3			± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.1	± 0.1	± 0.1	± 0.2

* time after administration

— : less than detectable limit (0.2 $\mu\text{g/ml}$)

所の斉藤英司氏に感謝致します。

文 献

- 1) 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
- 2) KUSAJIMA H, OOE T, KAWAHARA F, UCHIDA H : High-performance liquid chromatographic determination of 6, 8-difluoro-1-(2-fluoroethyl)-1,4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid and its metabolites in laboratory animals. *J Chromatogr* 381 : 137~148, 1986
- 3) 中島光好, 植松俊彦, 滝口祥令, 水野淳宏, 板谷武彦, 金丸光隆, 川原富美男, 大家 毅, 斉藤静樹, 保坂雅喜, 内田 広, 増澤国泰 : Fleroxacin の第1相臨床試験 I。 *Chemotherapy* 38 (S-2) : 280~311, 1990
- 4) 永津芳雄, 向井正明, 高木皓一, 内田 広 : ^{14}C -Fleroxacin のラット及びウサギにおける吸収, 分布, 排泄。 *Chemotherapy* 38 (S-2) : 100~114, 1990
- 5) 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 ~ 101, 1984
- 6) ROQUET F, MONTAY G, GOUFFON Y : Pefloxacin main metabolites in mouse, rat, dog, rabbit and man. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy*, Vienna, Aug.28-Sep.2, 1983, Part 110, P.10
- 7) JOHNSON J A, BENZIGER D P : Metabolism and disposition of amifloxacin in laboratory animals. *Antimicrob Agents Chemother* 27 : 774 ~ 781, 1985
- 8) 須藤賢一, 橋本浩一, 倉田忠司, 岡崎 治, 津村光義, 立澤晴男 : DL-8280 の体内動態 第3報 ^{14}C -DL-8280 の各種動物における代謝。 *Chemotherapy* 32 (S-1) : 1203~1210, 1984
- 9) SUDO K, OKAZAKI O, TSUMURA M, TACHIZAWA H : Isolation and identification of metabolites of ofloxacin in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* 16 : 725~732, 1986
- 10) LODE H, HÖFFKEN G, OLSCHESKI P, SIEVERS B, KIRCH A, BORNER K, KOEPPE P : Pharmacokinetics of ofloxacin after parenteral and oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 31 : 1338~1342, 1987
- 11) 庭田 寧, 青山 博, 平井敬二, 鈴江清吾 : 新キノロン系抗菌剤Fleroxacin の尿中代謝物の *in vitro* 及び *in vivo* 抗菌力。 *Chemotherapy* 38 (S-2) 672~675, 1990

METABOLISM OF FLEROXACIN IN HUMANS AND VARIOUS EXPERIMENTAL ANIMALS

FUMIO KAWAHARA, TSUYOSHI OOIE, YOSHIO NAGATSU and HIROSHI UCHIDA

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-01, Japan

Metabolites of fleroxacin in urine of dogs and rabbits were isolated and identified using TLC, UV, HPLC, NMR and mass spectrometry. Fleroxacin and its major metabolites in serum and urine of humans were determined by HPLC:

1. Two metabolites together with the unchanged fleroxacin were identified in urine of dogs and rabbits: demethyl fleroxacin and fleroxacin N-oxide. In rabbit urine, two other metabolites were also identified: demethyl-3-oxo fleroxacin and demethyl-4-formyl fleroxacin

2. In humans, plasma concentrations of the major metabolites, demethyl fleroxacin and fleroxacin N-oxide were only about 1% of the unchanged fleroxacin at the peak level.

3. The total urinary recovery over 72 h after dosing in humans was 83% of the dose. About 90% of the urinary excretion was unchanged fleroxacin. Urinary excretion of four metabolites, demethyl fleroxacin, fleroxacin N-oxide, demethyl-3-oxo fleroxacin and demethyl-4-formyl fleroxacin, were found to be 5, 5, 0.3 and 0.2% of the dose, respectively.

4. It was clarified that fleroxacin was scarcely metabolised *in vivo* in humans and animals except rabbits, and was metabolically most stable in humans.

5. It is suggested that the antibacterial activity after oral administration of fleroxacin in humans was mainly due to the unchanged drug.