

Grepafloxacinの体内動態(IV) —ラット, サルおよびヒトにおける代謝—

秋山 仁・小池正己・急式和代・鈴木 敬・
楠本直俊・森田清司・小富正昭
大塚製薬株式会社徳島研究所*

Grepafloxacin (GPFX)あるいは $[^{14}\text{C}]$ GPFXを経口投与後のラット, サルおよびヒトにおける代謝について検討し, 以下の成績を得た。

1) ヒト尿およびラット尿, 胆汁を用いて代謝産物を検索し, グルクロン酸抱合体2種(3-Glucuronideおよび4'-Glucuronide), 硫酸抱合体1種(4'-Sulfate), 3-メチルピペラジン環が代謝された代謝産物4種(DM-1704, DM-1705, DM-1706, DM-1725)およびキノリン環5位メチル基の水酸化された代謝産物2種(DM-1722, DM-1723)を単離同定した。

2) ヒト血漿中における主代謝産物はDM-1705であった。尿中では投与後72時間までに代謝産物として, 3-Glucuronide(4.0% of dose, 以下同様), 4'-Glucuronide(3.5%), DM-1705(3.0%), DM-1704(1.3%), 4'-Sulfate(1.0%)およびDM-1706(0.2%)が認められた。糞中では投与後72時間までに代謝産物として, DM-1705(2.6%), DM-1704(2.1%), DM-1725(1.9%), DM-1706(1.8%)および4'-Sulfate(1.3%)が認められた。

3) 雄性および雌性ラット血漿中における主代謝産物はいずれにおいても3-Glucuronideであった。尿中における主代謝産物は, 雄性ラットではDM-1723, 雌性ラットでは3-Glucuronideであった。また糞中における主代謝産物は, いずれにおいても4'-Sulfateであった。さらに雄性ラット胆汁中における主代謝産物は3-Glucuronideであった。一方, 雄性ラット肺内ではGPFXが肺内総放射能濃度の90.5%以上認められ, 代謝産物はほとんど認められなかった。

4) サル血漿中における主代謝産物はDM-1704であった。また尿中における主代謝産物はDM-1704, 糞中における主代謝産物は4'-Sulfateであった。

Key words : grepafloxacin, 代謝, ラット, サル, ヒト

Grepafloxacin (GPFX), (±)-1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-5-methyl-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid monohydrochlorideは, 大塚製薬(株)で開発されたニューキノロン系の新規合成抗菌薬で, グラム陽性菌および陰性菌に対して広範囲の抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有し^{1,2)}, 組織への良好な移行性を示すことから呼吸器感染症を始めとする各種感染症に対する経口抗菌薬として開発中である。我々は既にGPFXおよび $[^{14}\text{C}]$ 標識GPFX($[^{14}\text{C}]$ GPFX)を各種動物に投与した際の吸収, 分布および排泄について報告した³⁻⁵⁾。本報ではGPFXの代謝を明らかにすることを目的として, GPFXをヒトに400mg/bodyの用量で経口投与後の血漿, 尿および糞, $[^{14}\text{C}]$ GPFXをラットに40mg/kgの用量で経口投与後の血漿, 尿, 糞, 胆汁および肺, $[^{14}\text{C}]$ GPFXを雄性サルに20 mg/kgの用量で単回経口投与後の血漿, 尿および糞における代謝産物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. 使用化合物, 合成標品および試薬

GPFXは大塚製薬において合成したものを使用した。 $[^{14}\text{C}]$ GPFXはアマシャム社(UK)において合成され, 比放射能は1.89, 3.11, 3.29あるいは3.40MBq/mgであった。放射化学的純度は, カラムにTSK ODS-80T_M(4.6mm φ×150mm, 東ソー), 移動相にアセトニトリル-水-酢酸(A液 5:95:1, B液 45:55:1, v/v/v)を91%:9%(A液:B液)から0%:100%へ50分間でグラジエント, あるいは20mM硫酸ナトリウム, 0.1%リン酸:アセトニトリル=7:3(あるいは73:27, v/v)を用いるHPLCにより97%以上であった。

また代謝産物の同定のために以下に示す標品を合成した⁶⁾。

DM-1704; 7-[(2-Aminopropyl) amino]-1-cyclopropyl-6-fluoro-5-methyl-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid, DM-1705; 7-[(2-Aminoethyl) amino]-1-cyclopropyl-6-fluoro-5-methyl-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxy-

lic acid, DM-1706; 7-Amino-1-cyclopropyl-6-fluoro-5-methyl-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid, DM-1714; 1-Cyclopropyl-6-fluoro-5-methyl-7-(3-methyl-4-hydroxyl-1-piperazinyl)-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid, DM-1722; 7-Amino-1-cyclopropyl-6-fluoro-5-hydroxymethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid, DM-1723; 1-Cyclopropyl-6-fluoro-5-hydroxymethyl-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid, DM-1725; 1-Cyclopropyl-6-fluoro-7-hydroxycarbonylmethylamino-5-methyl-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid

HPLCの内部標準物質としては, OPC-17203; 1-cyclopropyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-5-ethyl-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid, を用いた。代謝産物の標品および内部標準物質は, いずれも大塚製薬徳島研究所で合成した。

β -Glucuronidase (Type B-1, from Bovine Liver) はシグマ社から購入し, 他の試薬は全て市販の試薬特級あるいは液体クロマトグラフ用を用いた。

2. 測定試料

(1) 単離同定用試料

ヒト尿は, GPFX経口剤 Phase I試験⁷⁾において, GPFXを300 mg/bodyの用量で1日1回7日間反復投与時の投与期間中および最終回投与後24時間までに得られた尿を使用した。ラット尿および胆汁は, GPFXあるいは¹⁴C GPFXのラットにおける経口投与後の吸収, 分布および排泄試験^{3,4)}において, 40mg/kgの用量で単回経口投与後24時間までに得られた尿および8時間までに得られた胆汁を使用した。

(2) 定量用試料

ヒト血漿, 尿および糞は, GPFX経口剤 Phase I試験⁷⁾において, GPFXを400 mg/bodyの用量で単回経口投与(試験区分S6)後0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24時間に得られた血漿, および投与後72時間までに得られた尿および糞を使用した。

ラット血漿, 胆汁および肺は, 3.に示した試験により得られた試料を使用した。

ラット尿および糞は, ¹⁴C GPFXのラットにおける試験⁹⁾において, 投与後24時間までに自然排泄された尿および糞を使用した。

サル血漿, 尿および糞は, ¹⁴C GPFXのサルにおける試験⁹⁾において, ¹⁴C GPFXを経口投与後1, 2, 4および8時間に得られた血漿, 投与後72時間までに自然排泄された尿および糞を使用した。

なお採取した各試料は, 測定時まで-20℃以下で凍結保存した。

3. 動物試験

(1) 使用動物

雌雄ラットは, Sprague-Dawley系ラット(5あるいは6週齢, チャールスリバー)を約5日間の予備飼育後使用した。使用時の体重は108~261gであった。予備飼育および試験は, 温度23±2℃, 湿度60±10%の環境下で実施した。また飼料としてラット用固形飼料(MF, オリエンタル酵母)を与えたが, 投薬約16時間前から投薬後4時間までは絶食した。水は全ての期間において自由に摂取させた。

(2) 投与液の調製

[¹⁴C] GPFXは非標識GPFXで適宜希釈し, 蒸留水に溶解して投与液とした。投与液の濃度は, 血漿, 肺採取群では8 mg/ml, 胆汁採取群では20 mg/mlとした。腸肝循環試験群の投与液は, 上述の胆汁採取群より得られた投与後6時間までの胆汁(342 kBq/ml)を使用した。

(3) 投与量および投与方法

血漿, 肺および胆汁採取群では, 40 mg/kgの用量でゾンデを用いて単回経口投与した。腸肝循環試験群では胆汁を3 ml/kgの用量で十二指腸内へ投与した。

(4) 試料の採取

投与後0.5, 2, 4および8時間に軽度エーテル麻酔下, 腹部下大静脈よりヘパリン処理したシリンジを用いて採血した。得られた血液を1800×gで10分間遠心分離して血漿を得た。次いで約10 mlの生理食塩水を門脈から注入して組織を灌流し放血致死後, 肺を摘出した。胆汁および胆管カニューレション時の尿は, 総胆管へカニューレを挿入した雄性ラットに¹⁴C GPFXを投与後, 直ちにボールマンケージに固定し, 投与後0~6, 6~24時間(腸肝循環試験では0~24時間)に排泄された胆汁および投与後0~24時間に排泄された尿を採取した。

4. 代謝産物の単離, 同定

(1) ヒト尿からの単離

ヒト尿中からの代謝産物の単離はFig. 1に示す分画操作により実施した。すなわち採取した尿を, アンバーライトXAD-2^{B)}(オルガノ)カラムにチャージし, 蒸留水で洗浄後, 50%メタノールおよびメタノールで順次溶出させた。メタノール溶出画分は減圧濃縮後, 残渣を蒸留水に再溶解し酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を濃縮し, 少量の水に再溶解後, HPLC 1, 2および3(条件は6.に示す)により分取精製を行いM-2, M-3, M-4, M-5, M-9を得た。50%メタノール溶出画分は減圧下濃縮後, 残渣を蒸留水に再溶解し, 酢酸エチルで抽出した。さらに水層を0.1 N塩酸でpH 3に調製後, 酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を濃縮し, 残渣を少量のメタノールに再溶解後, HPLC 4および5により分取精製を行いM-6, M-7を得た。水層は減圧下濃縮後, 残渣を少量のメタノールに再溶解させ, HPLC 5により分取精製を行いM-8を得た。

(2) ラット尿からの単離

ラット尿はヒト尿と同様にアンバーライトXAD-2^{B)}で

処理し、得られた50%メタノール溶出面分を濃縮後酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を濃縮後、残渣を少量のメタノールに溶解しHPLC 6により分取精製を行いM-10を得た(Fig. 1)。

(3) ラット胆汁からの単離

ラット胆汁はヒト尿と同様にアンバーライトXAD-2[®]で処理し、得られた50%メタノール溶出面分を濃縮後、Fig. 1に示した操作により分取精製を行いHPLC 7によりM-1を得た。

(4) 代謝産物の同定

単離した代謝産物は7.および8.に示す機器分析, 6.に示すHPLCにおける保持時間の比較, 4. (5)に示す酵素分解等の結果により同定した。

(5) 3-Glucuronideの酵素分解による検討

胆汁から精製したM-1を0.2 M酢酸緩衝液(pH 5.0) 0.1 mlに溶解し、0.2 M酢酸緩衝液に溶解したβ-グルクロニダーゼ溶液(1460 F unit/100μl)を加えて37℃で18時間インキュベート後、その20μlを6. に示したHPLC条件下で分析した。

5. 代謝産物の定量

各試料はあらかじめ後述の前処理法に従って処理後、HPLCにより分析した。ヒト試料におけるDM-1705, 1704および1706は内部標準法により、DM-1725, 4'-Sulfate, 4'-GlucuronideはGPFXのfree体(未変化体)に換算して定量した。ラットおよびサルの試料については、HPLC分析後その溶出液を30秒ごとに分取し、各フラクションにACS II[®](8 ml, アマシャム)を加えて液体シンチレーションカウンターにて各フラクションに含有される放射エネルギーを測定することにより定量した。各試料中の代謝産物の同定は、合成標品あるいは精製標品を同一条件のHPLCにより分析し、保持時間を比較して行った。

また、ラット血漿中に認められたDM-1711は未変化体のメチルエステルであり、血漿試料調製時に使用したメタノールによって3-Glucuronideから変換したものと考えられたので、定量されたDM-1711量は3-Glucuronideに加算した。後述のラット胆汁中に認められた*印を記した代謝産物は3-Glucuronideから試料調製時に生成することが認められたので、定量された*印の代謝産物量は3-Glucuronideに加算した。

(1) 血漿の前処理

採取した血漿に4倍量のメタノールを加え攪拌・振盪後、1800×gで10分間遠心分離し、上清を採取した。この操作を再度繰り返し、得られた上清を合わせて減圧下濃縮乾固した。得られた残渣に少量のメタノールを加え溶解後、HPLC用の試料とした。ただしヒト血漿の場合は、血漿(1ml)に内部標準物質(OPC-17203, 100ng/10μlメタノール)を添加して用い、抽出操作は一回とした。

(2) 肺の前処理

採取した肺の一部に2倍量の蒸留水を加えホモジナイズ後、3倍量のメタノールを加え攪拌・振盪、1800×gで10分間遠心分離してその上清を採取した。この操作を再度繰り返し、得られた上清を合わせて減圧下濃縮乾固した。得られた残渣に少量のメタノールを加え溶解後、HPLC用試料とした。

(3) 尿および胆汁の前処理

ラット尿、胆汁およびサル尿は、試料を直接あるいは1800×gで10分間遠心分離した上清をHPLC用試料とした。ヒト尿は0~24, 24~48, 48~72時間ごとに混合後、蒸留水を加えて希釈し、その1mlに内部標準物質(1μg/10μlメタノール)を添加した。これを攪拌・振盪後1800×gで10分間遠心分離し、その上清をHPLC用の試料とした。

(4) 糞の前処理

採取した糞は蒸留水を加えホモジナイズ後、1800×gで10分間遠心分離し抽出した。上清を採取後、残渣に50%, 60%, 80%メタノールおよび0.1 N塩酸等を加え同様に抽出した。塩酸抽出液は中和し、全ての抽出液

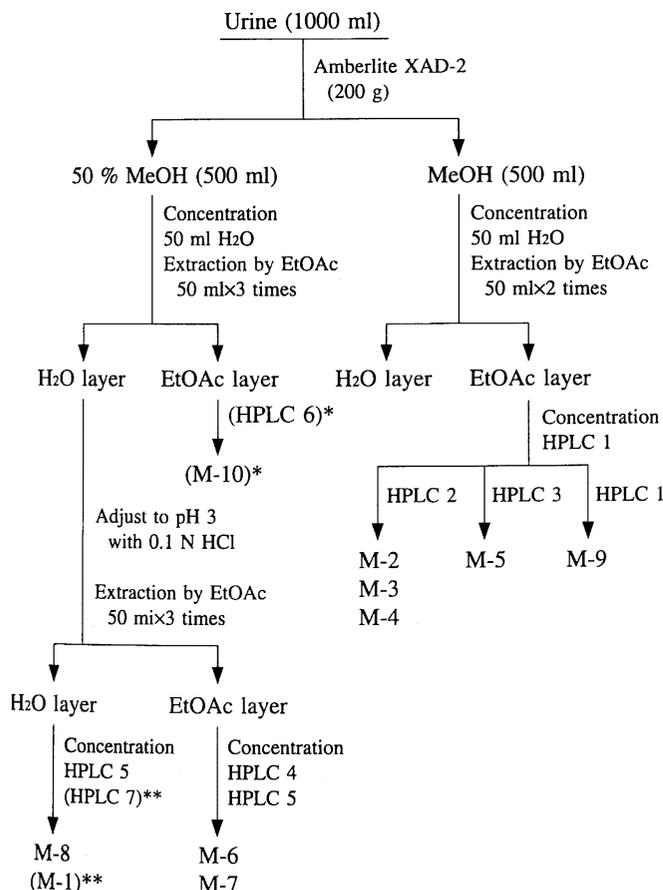


Fig. 1. Fractionation of metabolites of grepafloxacin.

* : Isolated from rat urine, ** : Isolated from rat bile

を合わせて減圧下濃縮乾固後、残渣を少量のメタノールに溶解しHPLC用の試料とした。ヒト糞では蒸留水を加えホモジナイズし、その0.1gに内部標準物質(1 μ g/10 μ lメタノール)を添加後、抽出した。

(5) ヒト尿中3-Glucuronideの定量

尿 200 μ lを蒸留水で11倍希釈後、その 200 μ lに0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 1.9 mlを加えた。この溶液に0.2 M 酢酸緩衝液に溶解した β -グルクロニダーゼ溶液(1460 F unit/100 μ l)を加え、37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートした。この溶液中の未変化体濃度をHPLC⁷⁾で定量した。酵素分解後の未変化体濃度から酵素分解前の未変化体濃度を差し引き、3-Glucuronide量として定量した。

6. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

装置として510あるいは512型HPLCポンプ(Waters), 680型 solvent programmer (Waters), U6K型インジェクター (Waters) あるいは712型サンプルプロセッサ (Waters)を用い、検出はSPD-6AあるいはSPD-10A UV検出器(検出波長280nm, 島津)およびRF-535型蛍光検出器(Ex; 285 nm, Em; 448 nm, 島津)で行った。

代謝産物の分取精製には、カラムはTSK gel ODS-80T_M(7.8mm ϕ ×300mm, 東ソー)を、移動相としてアセトニトリル-水-酢酸を下記の割合(v/v/v)で混合したものを用い、流量は3.0 ml/min, 分析温度は室温で行った。

HPLC 1 ; 37:63:1	HPLC 5 ; 35:65:1
HPLC 2 ; 25:75:1	HPLC 6 ; 20:80:0.2
HPLC 3 ; 35:65:0.2	HPLC 7 ; 10:90:0.5
HPLC 4 ; 40:60:0.2	

代謝産物の検索, 合成標品との比較および定量では、カラムはTSK ODS-80T_M(4.6mm ϕ ×150mm, 東ソー)を用い、流速は1.0/min, 分析温度は室温で分析した。移動相としてアセトニトリル-水-酢酸(A液 5:95:1, B液 45:55:1, v/v/v)を用い、これらを以下に示すプログラムにより変化させ分析した。

	A液	B液	curve
initial	91%	9%	—
10 min.	80%	20%	6
42 min.	25%	75%	5
48 min.*	91%	9%	11

* ; あるいは50min.

なお合成標品との比較では、必要に応じてアセトニトリルの割合を適宜変更した。

7. 質量分析スペクトル(MS)

EI-MSは、9020-DF型質量分析計(島津)に試料を直接導入し、加速電圧は3000V, イオン化電圧は70eVで測定した。FAB-MSは、JMS-SY102型質量分析計(日本電子)を用い、イオン化法はFABで行い、マトリクスとしてイ

オン極性がpositiveの場合はm-ニトロベンジルアルコールおよびグリセリンを、イオン極性がnegativeの場合はm-ニトロベンジルアルコールを用いて測定した。

8. 核磁気共鳴スペクトル(¹H-NMR)

AC-200あるいはAC-250型核磁気共鳴装置(BRUKER)を用い、試料をDMSO-d₆, Pyridine-d₅あるいはCDCl₃に溶解して測定した。なお必要に応じてD₂Oの添加あるいは温度を変化させて測定した。

9. 放射能の測定

各試料中の放射能は液体シンチレーションカウンター(LSC-1050またはLSC-3500, アロカ)で測定した。なお、計数効率の補正は外部標準線源によるチャンネル比法により行った。

10. ヒト血漿, 尿および糞中未変化体濃度

ヒト血漿, 尿および糞中における未変化体濃度は、Phase I試験での測定結果⁷⁾を引用した。

11. 薬動学的パラメータの算出

血漿中濃度の半減期は最小二乗法により、AUCは台形法により算出した。

12. 平均値の算出

各測定値において6例中3例以下あるいは3例中1例がND(Not detected)の場合は、NDを0として平均値を算出した。6例中4例以上あるいは3例中2例以上がNDの場合は平均値もNDとした。

II. 結 果

1. 代謝産物の検索

GPFXを経口投与後のヒト尿のHPLCクロマトグラムをFig. 2に示した。コントロール尿では認められないピークを、それぞれ保持時間の順にM-1~M-9とした。ラット尿および胆汁のHPLCラジオクロマトグラムをFig. 3(b)および(d)に示した。ラット尿中にはヒト尿中に認められた代謝産物以外にピークが認められM-10とした。ラット胆汁では7つのピークが認められたが、ヒトあるいはラット尿中に認められた代謝産物と同じピークであった。またラット胆汁中にはM-1(3-Glucuronide)より保持時間の短い2つの微量のピークが認められた(Fig. 3(d)中において*印で示した)。M-1はラット胆汁, M-2~M-9はヒト尿, M-10はラット尿をそれぞれ分析試料として、Fig. 1に示した分画操作に従って各々単離精製した。

2. 代謝産物の同定

(1) M-1

M-1はFAB-MSのnegative ionモードにおいて分子イオンピーク(M-H)⁻としてm/z 534を示し、分子量は535と考えられた(Fig. 4(a))。これは未変化体より質量数が176多く、グルクロン酸抱合体であることが示唆された。またM-1の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。NMRでは未変化体とグルクロン酸のシグナルが認

められ、グルクロン酸1位のプロトンが5.49 ppmであることから、結合形式はエステル型で、結合位置は未変化体の3位カルボン酸であると推定された。一方、M-1を β -グルクロナダーゼで酵素分解したところ未変化体が生成した。これらのことから、M-1は未変化体のグルクロン酸抱合体(3-Glucuronide)と推定した。

(2) M-2

M-2のEI-MSをFig. 4 (b)に示した。分子イオンピーク(M⁺)はm/z 319に認められ、さらに脱炭酸(M-44)⁺によるピークm/z 275, およびm/z 245, m/z 216にフラグメントイオンピークが認められた。これらの結果、M-2の分子量は未変化体より40小さいと考えられた。またM-2の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。キノリン環のシグナルは全て存在し、8位水素のシグナルがややシフトしていたが、ピペラジン環の3'位メチル基のシグナルは消失し、2.83~3.33 ppmの領域で3プロトン分

のシグナルが減少していた。このことからM-2はピペラジン環が開裂し、ジアミノエチル構造に変化しているものと考えられた。そこでM-2と、この推定構造式に基づいて合成したDM-1705を比較したところ、EI-MSの開裂様式および¹H-NMRのシグナルがよく一致し、HPLCでの保持時間も一致したことからM-2をDM-1705と同定した。

(3) M-3

M-3のEI-MSをFig. 4 (c)に示した。分子イオンピークはm/z 333に認められ、脱炭酸(M-44)⁺によるピークm/z 289, およびm/z 272, m/z 216にフラグメントイオンピークが認められた。従ってM-3の分子量は未変化体より26小さいと考えられた。またM-3の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。キノリン環のシグナルは全て存在し、ピペラジン環の4プロトン分のシグナルが減少していたが3'位メチル基のシグナルは認められた。

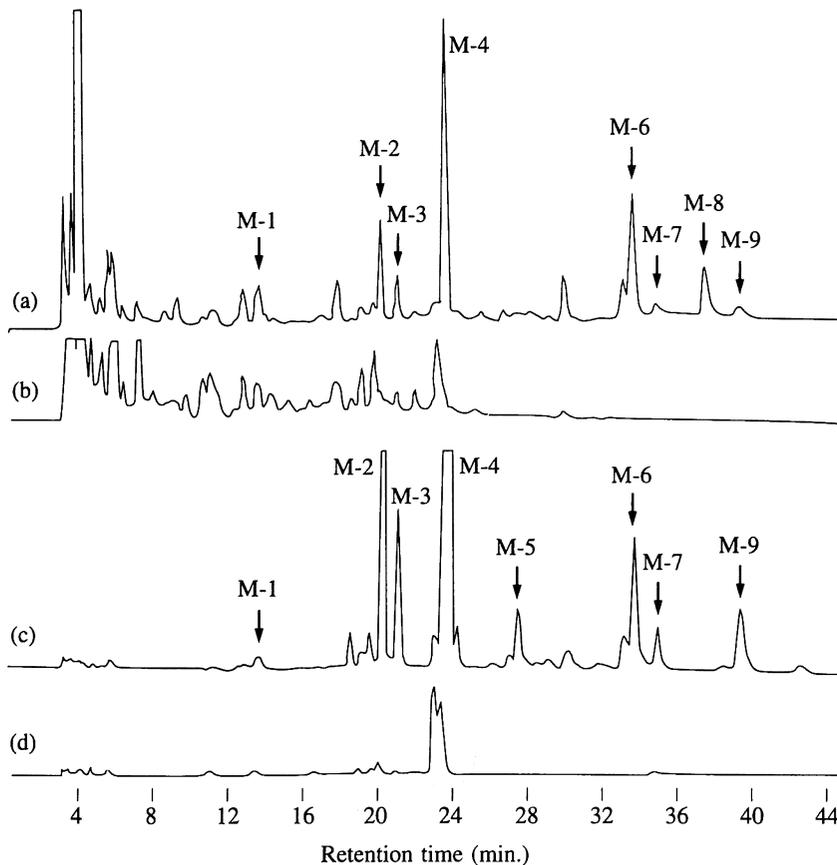


Fig. 2. HPLC chromatograms of urine after repeated oral administration of grepafloxacin at a dose of 300 mg/body for seven days in humans.

- (a) Sample urine detected at UV 280 nm
- (b) Control urine detected at UV 280 nm
- (c) Sample urine detected at fluorescence (Ex: 285 nm, Em: 448 nm)
- (d) Control urine detected at fluorescence (Ex: 285 nm, Em: 448 nm)

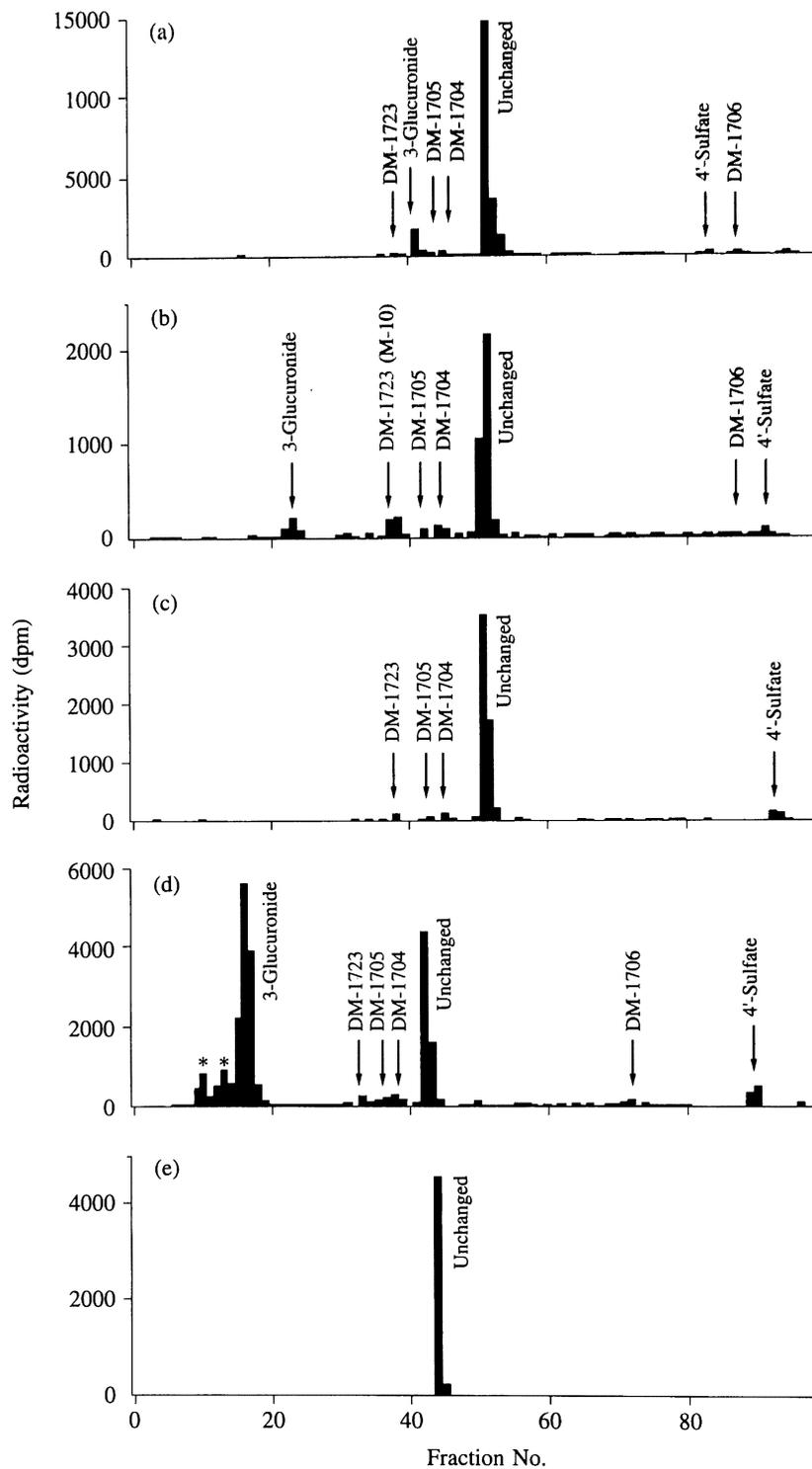


Fig. 3. HPLC radiochromatograms of plasma, urine, feces, bile and lungs after a single oral administration of [^{14}C] grepafloxacin at a dose of 40 mg/kg in rats.

(a) Plasma (b) Urine (c) Feces (d) Bile (e) Lungs

従ってM-3には、M-2と異なる様式でピペラジン環が開裂したジアミノプロピル基が存在することが示唆された。そこでM-3と、この推定構造に基づいて合成したDM-1704を比較したところ、EI-MSの開裂様式および¹H-NMRのシグナルはよく一致し、HPLCでの保持時間も一致したことからM-3をDM-1704と同定した。

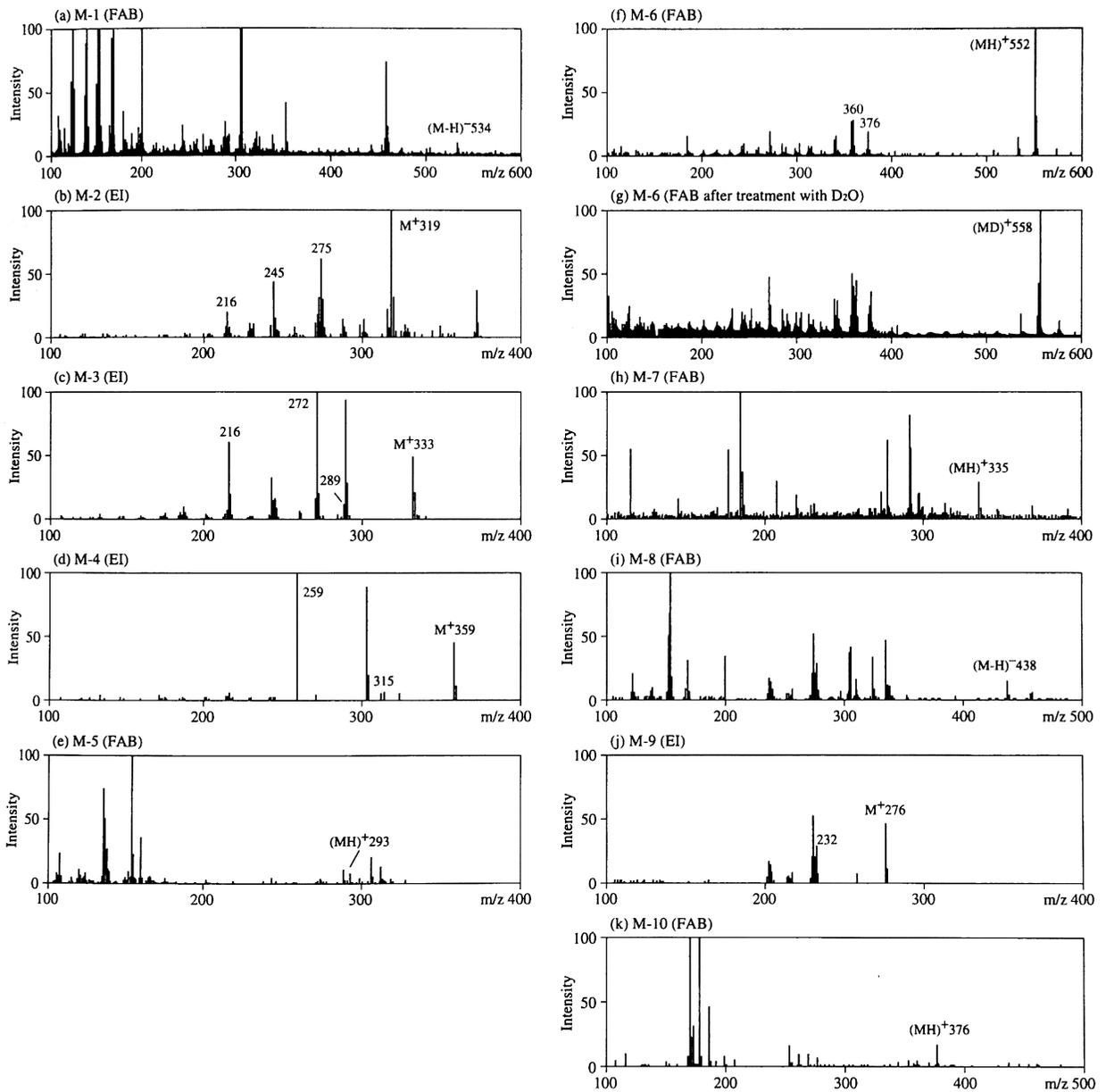
(4) M-4

M-4のEI-MSをFig. 4 (d)に示した。分子イオンピークはm/z 359に認められ、脱炭酸(M-44)⁺によるピークm/

z 315, および脱ピペラジン(M-100)⁺によるm/z 259のフラグメントイオンピークが認められた。またM-4の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。これらの結果、M-4の分子量およびMS開裂様式、¹H-NMRのシグナルはいずれも未変化体のスペクトルと一致し、HPLCでの保持時間も一致したことからM-4を未変化体と同定した。

(5) M-5

M-5のpositive ionモードにおけるFAB-MSをFig. 4 (e)



(a) M-1 (FAB) (b) M-2 (EI) (c) M-3 (EI) (d) M-4 (EI) (e) M-5 (FAB) (f) M-6 (FAB)
(g) M-6 (FAB after treatment with D₂O) (h) M-7 (FAB) (i) M-8 (FAB) (j) M-9 (EI) (k) M-10 (FAB)

Fig. 4. Mass spectra of metabolites of grepafloxacin.

に示した。分子イオンピーク(MH)⁺がm/z 293に認められたので分子量は292と考えられ、これは未変化体より67小さかった。またM-5の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。キノリン環のシグナルのうち5位メチル基のシグナルが消失し、さらにピペラジン環のシグナルは全て消失していた。さらに6.82ppmにアニリン構造を示唆するシグナル、および4.80~5.00ppmに水酸化されたメチレン基のシグナルが認められたことから、M-5は5位にヒドロキシメチル基、7位にアミノ基を有することが示唆された。そこでM-5と、この推定構造に基づいて合成したDM-1722を比較したところ、EI-MSの開裂様式および¹H-NMRのシグナルがよく一致し、HPLCでの保持時間もよく一致したことからM-5をDM-1722と同定した。

(6) M-6

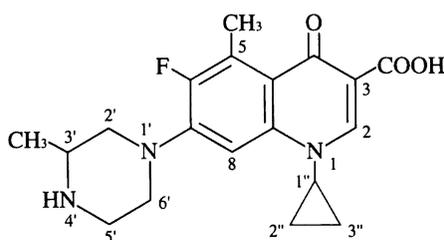
M-6はFAB-MSのpositive ionモードで分子イオンピーク(MH)⁺としてm/z 552, negative ionモードで分子イオンピーク(M-H)⁻としてm/z 550を示し、分子量は551と考えられた。さらにpositive ionモードで認められたフラグメントイオンピークm/z 376は、分子イオンピークから質量数176が減少したピークであり、グルクロン酸抱合体であることを示唆していた。これからさらに質量数16が減少したピークは脱酸素を示唆し、551→376→360のフラグメンテーションの様式からM-6は未変化体のO-グルクロン酸抱合体であることが示唆された(Fig. 4(f))。一方、高分解能FAB-MSにより分子イオンピーク

(MH)⁺はm/z 552.1995と決定され、分子式としてC₂₆H₃₁O₁₀N₃Fが推定された。この分子式から、M-6は未変化体とグルクロン酸に酸素が加わった構造であることが推定された。またM-6の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。NMRでは未変化体とグルクロン酸のシグナルが検出され、グルクロン酸の1位プロトンのシグナルが4.51および4.61ppmに認められたことから、M-6は未変化体のO-グルクロン酸抱合体であることが示唆された。一方、O-グルクロン酸抱合の結合位置はピペラジン環の炭素あるいは4'位窒素のいずれかであることが¹H-NMRより推定されたので、M-6を重水置換後マトリクスとして²H₈-glycerolを用いたFAB-MSを測定した。すなわち、Fig. 5に示すように重水素で置換されるプロトンの数が推定構造式(a)では5個、(b)では6個であることに基づく結合位置の推定を試みた。その結果(MD)⁺としてm/z 558が検出され、重水置換後の分子量は556であると推定された(Fig. 4(g))。これはM-6の5個の水素が重水素に置換されたことを示している。これらの結果、M-6は未変化体のピペラジン環4'位の窒素にO-グルクロン酸が結合した(a)の構造であることが推定された。

(7) M-7

M-7はFAB-MSのpositive ionモードで分子イオンピーク(MH)⁺としてm/z 335を示し、分子量は334と考えられた(Fig. 4(h))。これは未変化体より25小さかった。またM-7の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。キノリン環のシグナルには変化はないが、ピペラジ

Table 1. ¹H-NMR chemical shifts of metabolites of grepafloxacin



Metabolite	Main chemical shifts (ppm)											Others (glucuronic acid 1-H)		
	1'' (H)	2''3'' (2H)	2 (H)	3 (COOH)	5 (CH ₃)	8 (CH ₂)	1' (H)	1' (NH)	1' (NH ₂)	2'3'5'6' (H)	3' (CH ₂)		4' (NH)	4' (NH ₂)
M-1 (3-Glucuronide)	3.78	1.24-1.36	8.45		2.68		7.29			2.99, 3.27-3.37	1.02			5.49
M-2 (DM-1705)	3.70	1.00-1.45	8.53		2.72		7.07	6.94		2.83, 3.33				2.50-3.50
M-3 (DM-1704)	3.70	1.00-1.40	8.54		2.72		7.07	7.06		3.13	1.07			3.00-3.50
M-4 (Unchanged)	3.82	1.15-1.34	8.62	15.56	2.75		7.50			3.14-3.21, 3.36-3.76	1.37	9.70		
M-5 (DM-1722)	3.66	1.00-1.45	8.59	15.66		4.80-5.00	4.96	7.41	6.82					
M-6 (4'-Glucuronide)	3.78	1.34-1.40	8.63	15.50	2.78		7.46			2.91, 3.51	1.24			4.51, 4.61
M-7 (DM-1725)	3.65	1.02-1.38	8.53	16.21	2.74		6.79			3.90				
M-8 (4'-Sulfate)	3.75	1.14-1.23	8.61		2.75		7.43			3.10-3.33, 3.75	1.24			
M-9 (DM-1706)	3.61	1.05-1.35	8.52	16.13	2.72		7.29	6.66						
M10 (DM-1723)	3.85	1.10-1.40	8.70			5.00-5.15	4.82	7.55		2.27-3.65	1.05			

ン環の3'位メチル基のシグナルに加え、さらに5個のプロトンが消失していることが認められた。また分子イオンピークにおいて、未変化体から減少した質量数が25であることから、消失したフラグメントには窒素原子が含まれていることが示唆された(窒素ルール)⁸⁾。ここで3-メチルピペラジン環が開裂を受けたと考えられる箇所は3箇所ある(Fig. 6)が、M-7では3'位メチル基のシグナルおよび窒素原子が消失していることから、その構造としてヒドロキシカルボニルメチルアミノ基の存在が示唆された。この構造は、¹H-NMRにおいて3.90 ppmにヒドロキシカルボニルに結合したメチレン基のシグナルが認められることから支持された。以上の結果からM-7と、この推定構造に基づいて合成したDM-1725を比較したところ、EI-MSの分子量、開裂様式および¹H-NMRのシグナルがよく一致し、HPLCでの保持時間もよく一致したことからM-7をDM-1725と同一化した。

(8) M-8

M-8はFAB-MSのnegative ionモードで分子イオンピーク(M-H)⁻としてm/z 438を示し、分子量は439と考えられた(Fig. 4(i))。これは未変化体より80大きいことから、M-8は未変化体の硫酸抱合体であることが示唆された。M-8の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。その結果、M-8とGPFXのシグナルにはほとんど変化がないが、ピペラジン環のシグナルがわずかにシフトしていたことから、M-8を未変化体の4'位硫酸抱合体であると推定した。

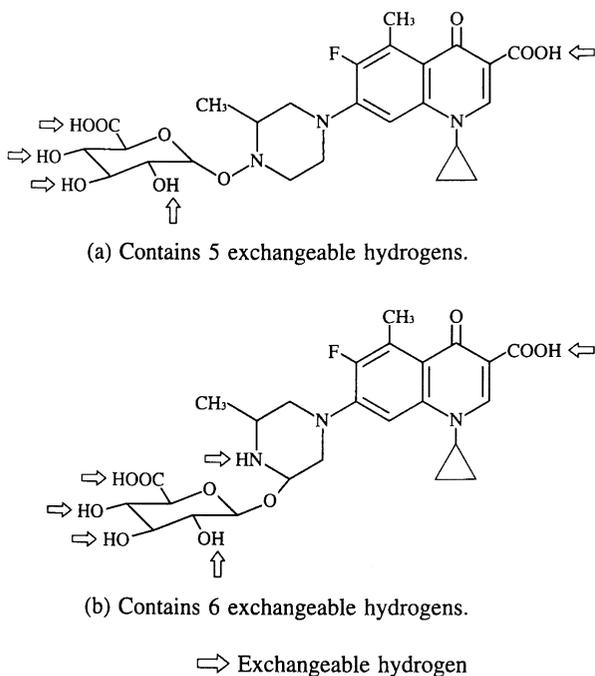


Fig. 5. Two possible chemical structures for M-6.

(9) M-9

M-9のEI-MSをFig. 4(j)に示した。分子イオンピークとしてm/z 276が認められ、分子量は未変化体より83小さかった。さらに脱炭酸(M-44)⁺によるフラグメントイオンピークm/z 232も認められた。またM-9の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。キノリン環のシグナルには変化はないが、ピペラジン環の全てのシグナルが消失していた。さらに6.66 ppmにアニリン構造を示唆するシグナルが認められたことから、7位アミノ基の存在が示唆された。そこでM-9と、この推定構造に基づいて合成したDM-1706を比較したところ、EI-MSの開裂様式および¹H-NMRのシグナルはよく一致し、HPLCでの保持時間も一致したことからM-9をDM-1706と同一化した。

(10) M-10

M-10はFAB-MSのpositive ionモードで分子イオンピーク(MH)⁺としてm/z 376を示し、分子量は375と考えられた(Fig. 4(k))。これは未変化体より16大きく、未変化体の一部が酸化されたものと考えられた。またM-10の¹H-NMRにおけるシグナルをTable 1に示した。キノリ

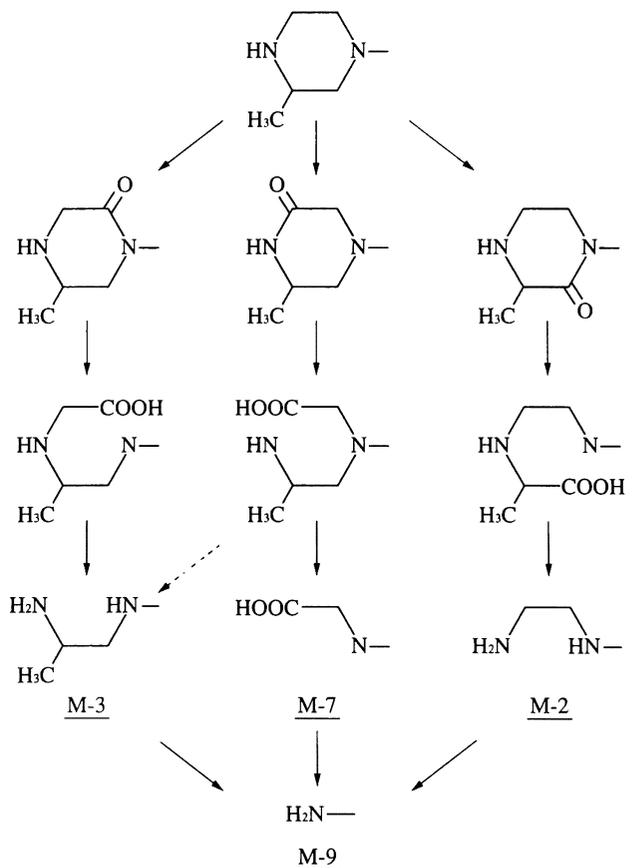


Fig. 6. Proposed metabolic pathways of 3-methylpiperaziny ring.

ン環およびピペラジン環のシグナルにはいずれも変化はないが、5-位メチル基のシグナルが消失し、5.00～5.15ppmに酸素原子に隣接したメチレン基のシグナルが認められたことから、未変化体の5-ヒドロキシメチル体の構造が示唆された。そこでM-10と、この推定構造に基づいて合成したDM-1723を比較したところ、EI-MSの開裂様式および¹H-NMRのシグナルはよく一致し、HPLCでの保持時間も一致したことからM-10をDM-1723と同定した。

(11) その他

ラット胆汁において、M-1より保持時間の短い2つのピーク (Fig. 3 (d) で*印を記した) が認められた。これらのピークは胆汁排泄後直ちに分析した際のHPLCクロマトグラムではごく微量しか存在しないが、室温で24時間放置後再分析したクロマトグラムでは、M-1が減少し*印で示したピークが増加することが認められた。よって*印のピークは、GPFXの代謝産物ではなくM-1から生成した副生成物である可能性が示唆された。さらに、精製したM-1および*印で示したピークを含む画分に1 N 水酸化ナトリウムを添加したところ、いずれの化合物か

らも未変化体が生成することが認められたので、*印で示したピークはM-1から生成する副生成物であると考えられた。

3. 代謝産物の定量

1) ヒト

(1) 血漿中代謝産物

GPFXを健常成人男子に400 mg/bodyの用量で単回経口投与後の血漿中未変化体および代謝産物濃度をFig. 7に示した。また各種パラメータをTable 2に示した。未変化体は投与後1.9時間(Tmax)に最高濃度(Cmax)1635 ng/mlを示し、AUC_{0-24h}は15981 ng・h/mlであった。代謝産物としてはDM-1705が最も多く認められ、Tmaxは1.8時間、Cmaxは328 ng/mlを示し、AUC_{0-24h}は2852 ng・h/mlであった。さらに血漿中には代謝産物としてDM-1704、DM-1706、4'-Glucuronideおよび4'-Sulfateが検出された。ヒト血漿中における主代謝産物はDM-1705であった。

(2) 尿中代謝産物

GPFXを健常成人男子に400 mg/bodyの用量で単回経口投与後の尿中未変化体および代謝産物濃度をTable 3に、累積排泄率をTable 4に示した。尿中には未変化体、DM-1704、DM-1705、DM-1706および抱合体として3-Glucuronide、4'-Glucuronide、4'-Sulfateが検出された。投与後72時間までに、未変化体は投与量の9.8%排泄され、次いで3-Glucuronide、4'-Glucuronide、DM-1705、DM-1704、4'-SulfateおよびDM-1706がそれぞれ投与量の4.0、3.5、3.0、1.3、1.0および0.2%排泄された。ヒト尿中における主代謝産物は3-Glucuronideであった。

(3) 糞中代謝産物

GPFXを健常成人男子に400 mg/bodyの用量で単回経口投与後の糞中未変化体および代謝産物濃度をTable 3に、累積排泄率をTable 4に示した。糞中には未変化体、DM-1704、DM-1705、DM-1706、DM-1725および4'-Sulfateが検出された。投与後72時間までに、未変化体は投与量の31.5%排泄され、次いでDM-1705、DM-1704、DM-1725、DM-1706および4'-Sulfateがそれぞれ投与量の2.6、2.1、1.9、1.8および1.3%排泄された。ヒト糞中における

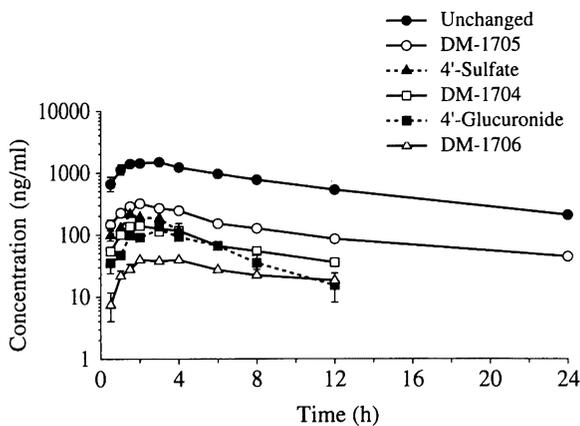


Fig. 7. Plasma concentrations of metabolites after a single oral administration of grepafloxacin at a dose of 400 mg/body in humans (mean±SE, n=6).

Table 2. Pharmacokinetic parameters of plasma concentrations of metabolites after a single oral administration of grepafloxacin at a dose of 400 mg/body in humans

Parameter	Unchanged	DM-1704	DM-1705	DM-1706	4'-Glucuronide	4'-Sulfate
Tmax (h)	1.9±0.4	1.8±0.1	1.8±0.1	3.0±0.4	2.1±0.3	1.7±0.3
Cmax (ng/ml)	1635±111	147±7	328±14	42±3	137±15	254±13
AUC _{0-T} * (ng・h/ml)	15981±1306	897±27	2852±57	375±52	649±68	993±155

Each value represents the mean±SE of six subjects. *: AUC in 0~terminal detected point

Table 3. Urinary and fecal concentrations of metabolites after a single oral administration of grepafloxacin at a dose of 400 mg/body in humans

Metabolite	Time (h)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$ or g)	
		Urine	Feces
Unchanged	0~24	24.38 \pm 3.10	493.7 \pm 62.3
	24~48	5.88 \pm 1.30	307.2 \pm 43.7
	48~72	1.33 \pm 0.26	82.0 \pm 25.3
DM-1704	0~24	2.65 \pm 0.30	30.4 \pm 5.7
	24~48	1.14 \pm 0.12	24.7 \pm 5.1
	48~72	ND	4.9 \pm 1.7
DM-1705	0~24	6.03 \pm 0.61	39.9 \pm 8.6
	24~48	2.18 \pm 0.28	29.6 \pm 6.8
	48~72	0.35 \pm 0.09	5.2 \pm 1.9
DM-1706	0~24	0.38 \pm 0.05	21.0 \pm 4.1
	24~48	0.14 \pm 0.03	17.2 \pm 3.4
	48~72	ND	4.4 \pm 1.6
DM-1725	0~24	ND	28.3 \pm 7.0
	24~48	ND	23.6 \pm 4.2
	48~72	ND	6.4 \pm 3.1
3-Glucuronide	0~24	9.71 \pm 1.39	ND
	24~48	2.48 \pm 0.59	ND
	48~72	0.49 \pm 0.11	ND
4'-Glucuronide	0~24	9.92 \pm 1.25	ND
	24~48	1.00 \pm 0.23	ND
	48~72	ND	ND
4'-Sulfate	0~24	3.25 \pm 0.67	32.0 \pm 9.1
	24~48	ND	10.0 \pm 3.0
	48~72	ND	1.2 \pm 0.8

Each value represents the mean \pm SE for six subjects.
 ND: $<0.02 \mu\text{g/ml}$ in urine ($<0.01 \mu\text{g/ml}$ in DM-1706)
 $<0.2 \mu\text{g/g}$ in feces

Table 4. Cumulative urinary and fecal excretion of metabolites after a single oral administration of grepafloxacin at a dose of 400 mg/body in humans

Metabolite	Time (h)	Excretion (% of dose)		
		Urine	Feces	Total
Unchanged	0~24	7.8 \pm 0.6	19.3 \pm 3.8	27.0 \pm 3.9
	48	9.4 \pm 0.7	27.0 \pm 3.4	36.4 \pm 3.6
	72	9.8 \pm 0.8	31.5 \pm 2.7	41.2 \pm 3.0
DM-1705	0~24	2.2 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	3.7 \pm 0.3
	48	2.9 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3
	72	3.0 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2	5.7 \pm 0.3
DM-1704	0~24	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2
	48	1.3 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2	3.1 \pm 0.2
	72	1.3 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	3.4 \pm 0.3
DM-1706	0~24	0.1 \pm 0.0	0.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2
	48	0.2 \pm 0.0	1.4 \pm 0.4	1.6 \pm 0.4
	72	0.2 \pm 0.0	1.8 \pm 0.4	1.9 \pm 0.4
DM-1725	0~24	ND	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2
	48	ND	1.6 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3
	72	ND	1.9 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3
3-Glucuronide	0~24	3.2 \pm 0.4	ND	3.2 \pm 0.4
	48	3.9 \pm 0.6	ND	3.9 \pm 0.6
	72	4.0 \pm 0.6	ND	4.0 \pm 0.6
4'-Glucuronide	0~24	3.2 \pm 0.3	ND	3.2 \pm 0.3
	48	3.5 \pm 0.3	ND	3.5 \pm 0.3
	72	3.5 \pm 0.3	ND	3.5 \pm 0.3
4'-Sulfate	0~24	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3
	48	1.0 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	2.3 \pm 0.3
	72	1.0 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	2.3 \pm 0.3

Each value represents the mean \pm SE for six subjects.

主代謝産物はDM-1705であった。

尿および糞を合わせた排泄率においても未変化体が最も多く、投与量の41.2%であった。

2) ラット

(1) 血漿中代謝産物

雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを40mg/kgの用量で単回経口投与後の血漿における代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 3(a)に示した。血漿中にはDM-1723, 3-Glucuronide, DM-1705, DM-1704, 未変化体, 4'-SulfateおよびDM-1706が認められた。また雌雄ラットの血漿中未変化体および代謝産物濃度をFig. 8に示した。血漿中には雄性および雌性ラットともに未変化体が最も多く存在し、それぞれ血漿中総放射能濃度の60.9~71.4%および51.8~63.2%であった。その濃度は投与後0.5時間に最高濃度2.12および2.01 $\mu\text{g eq./ml}$ を示した後減少し、 $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ は6.10および5.46 $\mu\text{g eq. h/ml}$ であった。次いで3-Glucuronideが多く認められ、雄では血漿中総放射能濃度の7.4~14.0%, 雌ではND~17.2%であった。またそれぞれ C_{max} は0.41および0.64 $\mu\text{g eq./ml}$, $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ は0.93および0.80 $\mu\text{g eq. h/ml}$ であった。ラット血漿中における主代謝産物は3-Glucuronideであった。

(2) 尿中代謝産物

ラットに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後24時間までに得られた尿の代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 3(b)に示した。尿中には3-Glucuronide, DM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体, DM-1706および4'-Sulfateが認められた。また尿中の未変化体および代謝産物の割合を、雄性ラットではTable 5に、雌性ラットではTable 6に示した。雄性および雌性ラットの尿中には未変化体が最も多く存在し、尿中総放射能の53.3および63.2%, 投与量の6.8および6.4%であった。次いで雄性ラットではDM-1723, 雌性ラットでは3-Glucuronideが多く認められ、尿中総放射能の8.6および12.5%, 投与量の1.1および1.2%であった。ラット尿中における主代謝産物は、雄性ラットではDM-1723, 雌性ラットでは3-Glucuronideであった。

(3) 糞中代謝産物

ラットに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後24時間までに得られた糞の代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 3(c)に示した。糞中にはDM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体および4'-Sulfateが認められた。また糞中の未変化体および代謝産物の割合を、雄性ラットではTable 5に、雌性ラットではTable 6に示した。雄性および雌性ラットの糞中には未変化体が最も多く存在し、糞中総放射能の81.9および77.9%, 投与量の59.4および64.7%であった。次いで4'-Sulfateが多く認められ、糞中総放射能の4.3および10.3%, 投与量の3.0および8.6%であった。ラット糞中における主代謝産物は4'-Sulfateであった。

尿および糞を合わせた排泄率においても未変化体が最も多く、雄性および雌性ラットでそれぞれ投与量の66.2および71.1%であった。

(4) 胆汁中代謝産物

胆管カニキュレーションした雄性ラットに、 $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後24時間までに得られた胆汁の代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 3(d)に示した。胆汁中には3-Glucuronide, DM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体, DM-1706および4'-Sulfateが認められた。また胆汁中の未変化体および代謝産物の割合をTable 7に示した。ラット胆汁中には未変化体および3-Glucuronideが多く認められ、それぞれの胆汁中総放射能の27.3および55.8%, 投与量の19.7および40.5%であった。次いで4'-Sulfateが多く認められ胆汁中総放射能の4.2%, 投与量の3.1%であった。

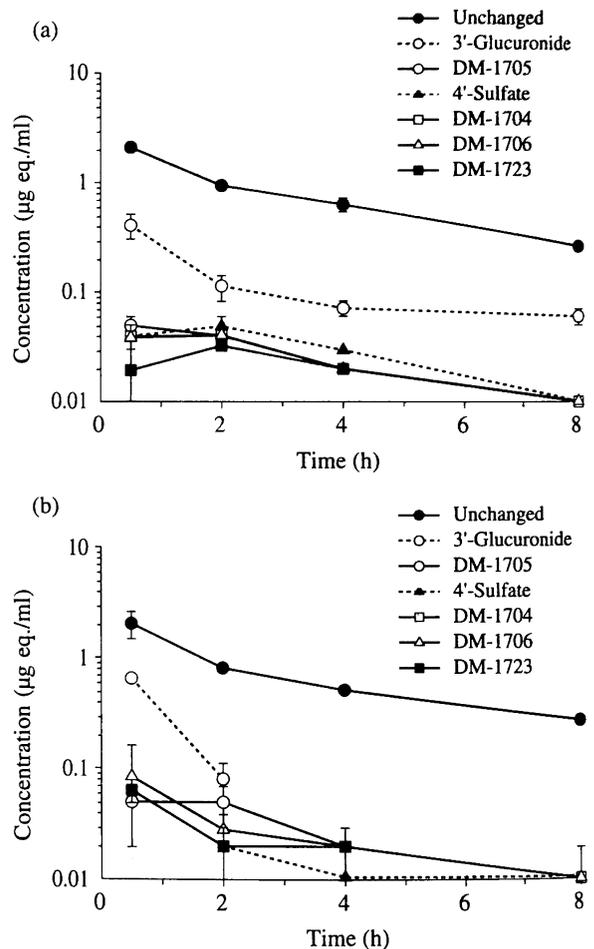


Fig. 8. Plasma concentrations of metabolites after a single oral administration of $[^{14}\text{C}]$ grepafloxacin at a dose of 40 mg/kg in male and female rats (mean \pm SE, n=3).

(a) Male (b) Female

(5) 胆管カニューレーション時の尿中代謝産物
胆管カニューレーションした雄性ラットに、 $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後24時間までに得られた尿中には3-Glucuronide, DM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体および4'-Sulfateが認められた。尿中の未変化体および代謝産物の割合をTable 7に示した。尿中には未変化体

が多く認められ、尿中総放射能の62.9%, 投与量の10.5%であった。次いで3-Glucuronideが多く認められ、尿中総放射能の14.1%, 投与量の2.4%であった。

(6) 腸肝循環後の胆汁中代謝産物
別のラットに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後6時間までに得られた胆汁を、胆管カニューレーションした雄性ラッ

Table 5. Urinary and fecal excretion of metabolites within 24 hours after a single oral administration of $[^{14}\text{C}]$ grepafloxacin at a dose of 40 mg/kg in male rats

Metabolite	Cumulative excretion (% of dose)		
	Urine	Feces	Total
DM-1723	1.1 ± 0.1 (8.6 ± 1.0)	1.9 ± 0.3 (2.6 ± 0.3)	3.0 ± 0.3
3-Glucuronide	1.0 ± 0.2 (7.5 ± 1.1)	ND (ND)	1.0 ± 0.2
DM-1705	0.2 ± 0.1 (1.9 ± 0.3)	1.2 ± 0.2 (1.6 ± 0.3)	1.4 ± 0.2
DM-1704	0.6 ± 0.0 (4.4 ± 0.2)	2.0 ± 0.3 (2.8 ± 0.3)	2.6 ± 0.3
Unchanged	6.8 ± 0.5 (53.3 ± 2.2)	59.4 ± 5.3 (81.9 ± 1.7)	66.2 ± 4.8
4'-Sulfate	0.5 ± 0.1 (4.1 ± 0.8)	3.0 ± 0.2 (4.3 ± 0.6)	3.5 ± 0.1
DM-1706	0.1 ± 0.1 (0.9 ± 0.5)	ND (ND)	0.1 ± 0.1
Total	12.7 ± 0.8	72.5 ± 6.0	85.2 ± 1.4

Each value represents the mean ± SE for three rats.

Each value in parentheses represents the percentage of radioactivity in the samples.

ND: <1% of total radioactivity in the samples

Table 6. Urinary and fecal excretion of metabolites within 24 hours after a single oral administration of $[^{14}\text{C}]$ grepafloxacin at a dose of 40 mg/kg in female rats

Metabolite	Cumulative excretion (% of dose)		
	Urine	Feces	Total
DM-1723	0.3 ± 0.0 (3.2 ± 0.5)	ND (ND)	0.3 ± 0.0
3-Glucuronide	1.2 ± 0.6 (12.5 ± 7.4)	ND (ND)	1.2 ± 0.6
DM-1705	0.1 ± 0.0 (1.5 ± 0.0)	0.9 ± 0.5 (1.2 ± 0.7)	1.0 ± 0.5
DM-1704	0.3 ± 0.0 (3.1 ± 0.2)	1.7 ± 0.3 (2.1 ± 0.3)	2.0 ± 0.3
Unchanged	6.4 ± 1.2 (63.2 ± 8.1)	64.7 ± 7.1 (77.9 ± 2.0)	71.1 ± 6.6
4'-Sulfate	0.6 ± 0.1 (6.0 ± 0.4)	8.6 ± 1.3 (10.3 ± 0.8)	9.2 ± 1.2
DM-1706	ND (ND)	ND (ND)	ND
Total	10.0 ± 0.7	82.6 ± 7.2	92.6 ± 6.6

Each value represents the mean ± SE for three rats.

Each value in parentheses represents the percentage of radioactivity in the samples.

ND: <1% of total radioactivity in the samples

トの十二指腸内に投与後24時間までに得られた胆汁中には 3-Glucuronide, DM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体およびDM-1706が認められた。胆汁中の未変化体および代謝産物の割合をTable 7に示した。胆汁中には未変化体, 3-GlucuronideおよびDM-1706が多く認められ, それぞれの胆汁中総放射能の15.0, 42.9および12.8%, 投与量の5.9, 17.9および5.0%であった。

(7) 腸肝循環後の尿中代謝産物

別のラットに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後6時間までに得られた胆汁を, 胆管カニューレションした雄性ラットの十二指腸内に投与後24時間までに得られた尿中には 3-Glucuronide, DM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体およびDM-1706が認められた。尿中の未変化体および代謝産物の割合をTable 7に示した。尿中には未変化体およびDM-1706が多く認められ, それぞれの尿中総放射能の24.4および24.2%, 投与量の0.9および1.0%であった。

(8) 肺内代謝産物

雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後の肺における代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 3(e)に示した。肺内では測定した全ての時間においてほとんどが未変化体であり, 代謝産物はほとんど認められなかった。各時間における未変化体の割合をTable 8に示した。未変化体はいずれの時間においても肺内総放射能の90.5%以上を占め, 投与後0.5時間に $9.2\mu\text{g eq./g}$ を示した後, 時間とともに減少した。

3) サル

(1) 血漿中代謝産物

雄性サルに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後の血漿における代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 9(a)に示した。血漿中にはDM-1705, DM-1704, 未変化体, 4'-Glucuronideおよび4'-Sulfateが認められた。また血漿中の未変化体および代謝産物濃度をFig. 10に示した。血漿中には未変化体が最も多く存在し, その割合は血漿中総放射能濃度の73.3~91.5%であった。その濃度は投与後2時間に最高濃度 $2.50\mu\text{g eq./ml}$ を示した後減少し, $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ は $15.54\mu\text{g eq. h/ml}$ であった。次いでDM-1704が多く認められ, 血漿中総放射能濃度の1.5~3.9%であった。また T_{max} は2時間, C_{max} は $0.12\mu\text{g eq./ml}$ および $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ は $0.58\mu\text{g eq. h/ml}$ であった。サル血漿中における主代謝産物はDM-1704であった。

(2) 尿中代謝産物

雄性サルに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後72時間までに得られた尿の代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 9(b)に示した。尿中には3-Glucuronide, DM-1723, DM-1705, DM-1704, 未変化体, 4'-Glucuronide, DM-1706および4'-Sulfateが認められた。また尿中の未変化体および代謝産物の割合をTable 9に示した。尿中には未変化体が最も多く存在し, その割合は尿中総放射能の55.3%, 投与量の6.7%であった。次いでDM-1704が多く認められ, 尿中総放射能の6.2%, 投与量の0.7%であった。サル尿中における主代謝産物はDM-1704であった。

Table 7. Biliary and urinary excretion of metabolites within 24 hours after a single oral administration of $[^{14}\text{C}]$ grepafloxacin at a dose of 40 mg/kg and after a single intraduodenal administration of 1026 kBq/kg of $[^{14}\text{C}]$ bile in bile duct-cannulated rats

Metabolite	Cumulative excretion (% of dose)					
	After oral administration			After intraduodenal administration		
	Bile	Urine	Total	Bile	Urine	Total
DM-1723	1.7±0.3 (2.3±0.5)	1.0±0.1 (6.0±0.7)	2.6±0.4	1.3±0.1 (3.2±0.2)	0.3±0.1 (8.0±1.8)	1.6±0.1
3-Glucuronide	40.5±1.5 (55.8±6.2)	2.4±0.6 (14.1±1.7)	42.8±1.2	17.9±4.1 (42.9±5.8)	0.2±0.1 (8.0±4.4)	18.1±4.1
DM-1705	1.3±0.2 (1.7±0.2)	0.3±0.0 (2.1±0.2)	1.6±0.2	1.3±0.2 (3.1±0.2)	0.1±0.0 (3.0±0.5)	1.4±0.2
DM-1704	1.1±0.2 (1.5±0.2)	0.6±0.0 (3.8±0.6)	1.7±0.2	1.1±0.3 (2.5±0.6)	0.1±0.0 (3.3±0.6)	1.2±0.4
Unchanged	19.7±1.2 (27.3±2.1)	10.5±1.3 (62.9±0.8)	30.2±2.3	5.9±0.3 (15.0±2.4)	0.9±0.2 (24.4±4.2)	6.7±0.2
4'-Sulfate	3.1±0.7 (4.2±1.0)	0.3±0.2 (1.6±1.0)	3.4±0.8	ND (ND)	ND (ND)	ND
DM-1706	0.6±0.2 (0.8±0.2)	ND (ND)	0.6±0.1	5.0±0.8 (12.8±3.1)	1.0±0.4 (24.2±4.4)	6.0±1.1

Each value represents the mean ± SE for three rats.

Each value in parentheses represents the percentage of radioactivity in the samples.

ND: <1% of total radioactivity in the samples

(3) 糞中代謝産物

サルに $[^{14}\text{C}]$ GPFXを単回経口投与後72時間までに得られた糞の代表的なHPLCラジオクロマトグラムをFig. 9(c)に示した。糞中にはDM-1705, DM-1704, 未変化体,

Table 8. Lung concentration of unchanged compound after a single oral administration of $[^{14}\text{C}]$ grepafloxacin of 40 mg/kg in male rats

Time (h)	Concentration ($\mu\text{g eq.}/\text{g tissue}$)
0.5	9.2 ± 0.5 (93.7 ± 0.5)
2	6.8 ± 1.2 (94.9 ± 0.1)
4	3.5 ± 0.3 (93.0 ± 2.2)
8	1.1 ± 0.2 (90.5 ± 2.1)

Each value represents the mean \pm SE for three rats. Each value in parentheses represents the percentage of radioactivity in the lungs.

4'-Glucuronide, DM-1706および4'-Sulfateが認められた。また糞中の未変化体および代謝産物の割合をTable 9に示した。糞中には未変化体が最も多く存在し、糞中総放射能の53.8%, 投与量の25.9%であった。次いで4'-Sulfateが多く認められ、糞中総放射能の10.9%, 投与量の5.2%であった。サル糞中における主代謝産物は4'-Sulfateであった。

尿および糞を合わせた排泄率においても未変化体が最も多く、投与量の32.7%であった。

III. 考 察

GPFXの代謝産物を同定した結果、GPFXはその構造中の4ヶ所が代謝を受けることが認められた。すなわち、3位カルボン酸およびピペラジン環の4'位窒素での抱合、ピペラジン環の解裂、5位メチル基の水酸化である。3位カルボン酸が抱合を受けた代謝産物としてはグルクロン酸がエステル結合した3-Glucuronideが認められた。この様な3位カルボン酸でのグルクロン酸抱合体はニューキノロン薬においてはよく認められ^{9,10)}, sparfloxacin

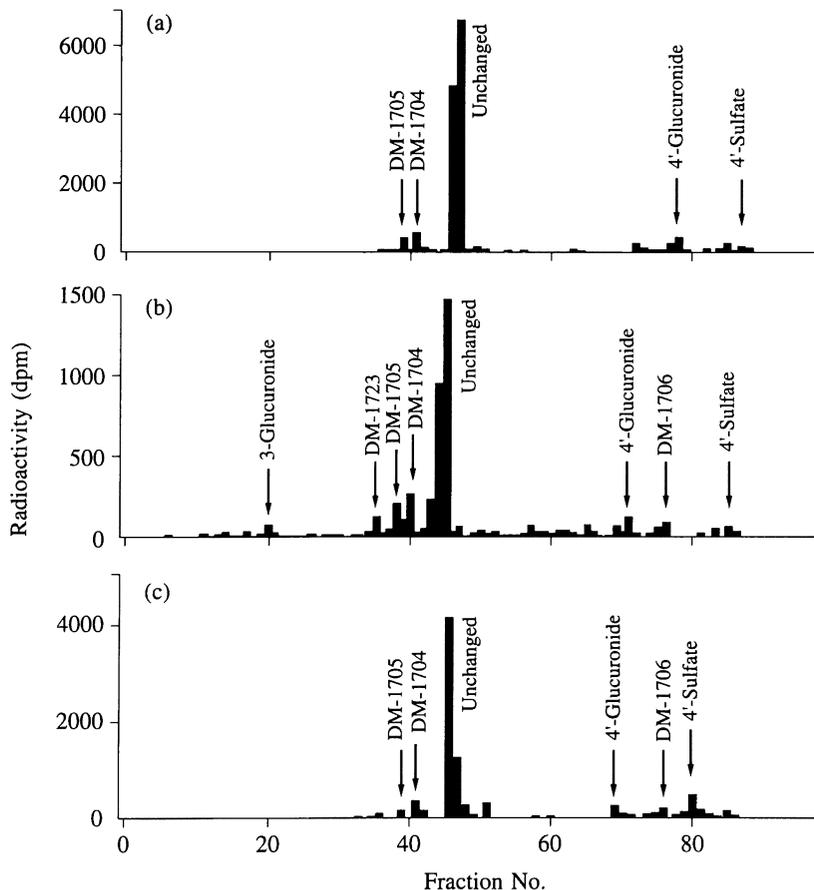


Fig. 9. HPLC radiochromatograms of plasma, urine and feces after a single oral administration of $[^{14}\text{C}]$ grepafloxacin at a dose of 20 mg/kg in monkeys.

(a) Plasma (b) Urine (c) Feces

(SPFX)では主要な代謝経路となっている¹¹⁾。またピペラジン環の4'位窒素で抱合を受けた代謝産物として、4'-Sulfateと4'-Glucuronideが認められた。硫酸抱合体はciprofloxacin (CPF)においても認められているが¹²⁾、4'-Glucuronideの様なタイプの抱合体は今まで報告されていない。構造的に見ておそらくピペラジン環の4'位窒素が水酸化された後に抱合されると考えられるが、その中

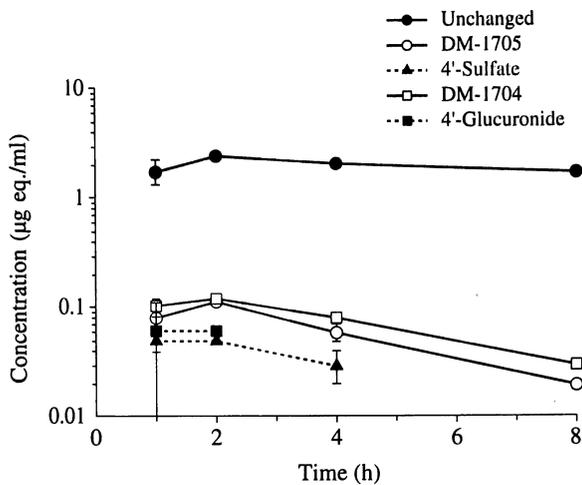


Fig. 10. Plasma concentrations of metabolites after a single oral administration of [¹⁴C] grepafloxacin at a dose of 20 mg/kg in monkeys (mean±SE, n=3).

間代謝産物と推定されるDM-1714 (Fig. 11)は検出されなかった。一方、今回最も多くの種類が認められた代謝産物はピペラジン環が開裂を受けたタイプの代謝産物であった。そのうちDM-1704, 1705および1706の様なタイプの代謝産物は、GPFXと同じ側鎖(3-メチルピペラジン環)を有するlomefloxacin (LFLX)においても認められており⁹⁾、ピペラジン環の酸化的開裂による代謝産物であると考えられている。GPFXの場合、LFLXで認められた中間代謝産物(オキソ体およびカルボン酸体)は検出されなかったが、おそらく同様な代謝経路により生成すると推定された。さらにGPFXでは新たにDM-1725の様なタイプの代謝産物が認められ、3-メチルピペラジンの酸化的開裂によるFig. 6に示す様な代謝ルートにより生成したものと考えられる。またGPFXのキノリン環5位メチル基は、DM-1722および1723の様に水酸化を受けることが明らかとなった。

ラット胆汁中における副生成物であるFig. 3(d)に*印で示したピークは3-Glucuronideから生じ、アルカリ水解すると未変化体になることから、3-Glucuronideのグルクロン酸がアシル転移した生成物であると考えられた。グルクロン酸のアシル転移はSPFXにおいても報告されており¹¹⁾、生体内物質であるビリルビン¹³⁾や他の化合物¹⁴⁻¹⁷⁾の抱合体においても認められている。今回*印で示したピークの精製を試みたが、微量であったため単離には到らなかった。

Table 9. Urinary and fecal excretion of metabolites within 72 hr after a single oral administration of [¹⁴C] grepafloxacin at a dose of 20 mg/kg in monkeys

Metabolite	Cumulative excretion (% of dose)		
	Urine	Feces	Total
3-Glucuronide	0.4±0.2 (3.5±1.8)	ND (ND)	0.4±0.2
DM-1723	0.3±0.0 (2.9±0.2)	ND (ND)	0.3±0.0
DM-1705	0.6±0.1 (4.9±1.0)	1.1±0.1 (2.2±0.3)	1.6±0.1
DM-1704	0.7±0.1 (6.2±0.8)	2.2±0.3 (4.5±0.5)	2.9±0.4
Unchanged	6.7±0.9 (55.3±3.8)	25.9±2.3 (53.8±2.3)	32.7±2.9
4'-Glucuronide	0.3±0.0 (2.5±0.5)	1.5±0.2 (3.1±0.2)	1.8±0.2
DM-1706	0.3±0.2 (2.6±1.4)	1.6±0.2 (3.2±0.3)	1.9±0.2
4'-Sulfate	ND (ND)	5.2±0.6 (10.9±1.5)	5.3±0.6
Total	12.1±0.8	48.1±3.0	60.2±3.8

Each value represents the mean ± SE for three monkeys.

Each value in parentheses represents the percentage of radioactivity in the samples.

ND: <1% of total radioactivity in the samples

以上の結果, GPFXの代謝経路としてFig. 12に示す経路が推定された。

ヒト代謝産物を定量した結果, 血漿中では未変化体が最も多く存在し, 代謝産物はいずれも未変化体のC_{max}およびAUCの約1/5以下であった。また今回同定された代謝産物の抗菌活性はいずれもGPFXの約1/10以下である

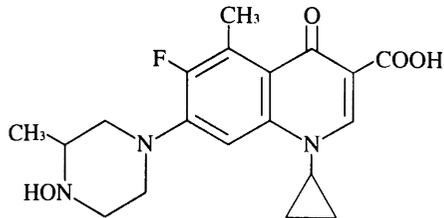


Fig. 11. Chemical structure of DM-1714.

こと¹⁸⁾から, 血漿中での本剤の薬効はほとんど未変化体によるものと考えられた。

ヒト糞中では未変化体が投与量の31.5%認められたが, グルクロン酸抱合体は認められなかった。これは腸管に排泄されたグルクロン酸抱合体は, 化学的あるいは腸内細菌叢により未変化体に加水分解されている可能性を示唆している。

一方, 今回ヒトで定量できた未変化体および代謝産物の排泄率は, 投与後72時間までの尿, 糞中に合わせて64%程度でありやや低かった。ヒトにおける排泄率を他の動物の結果^{4,5)}と比較すると, ヒトでは糞中排泄率が小さく, この原因のひとつとして糞からの抽出率の影響が考えられた。すなわち今回用いた抽出法は, ラットおよびサルで良好な回収率が得られたものであるが, ヒトの食事が多種多様であることなどの原因により良好な抽出率が得られなかった可能性が考えられた。

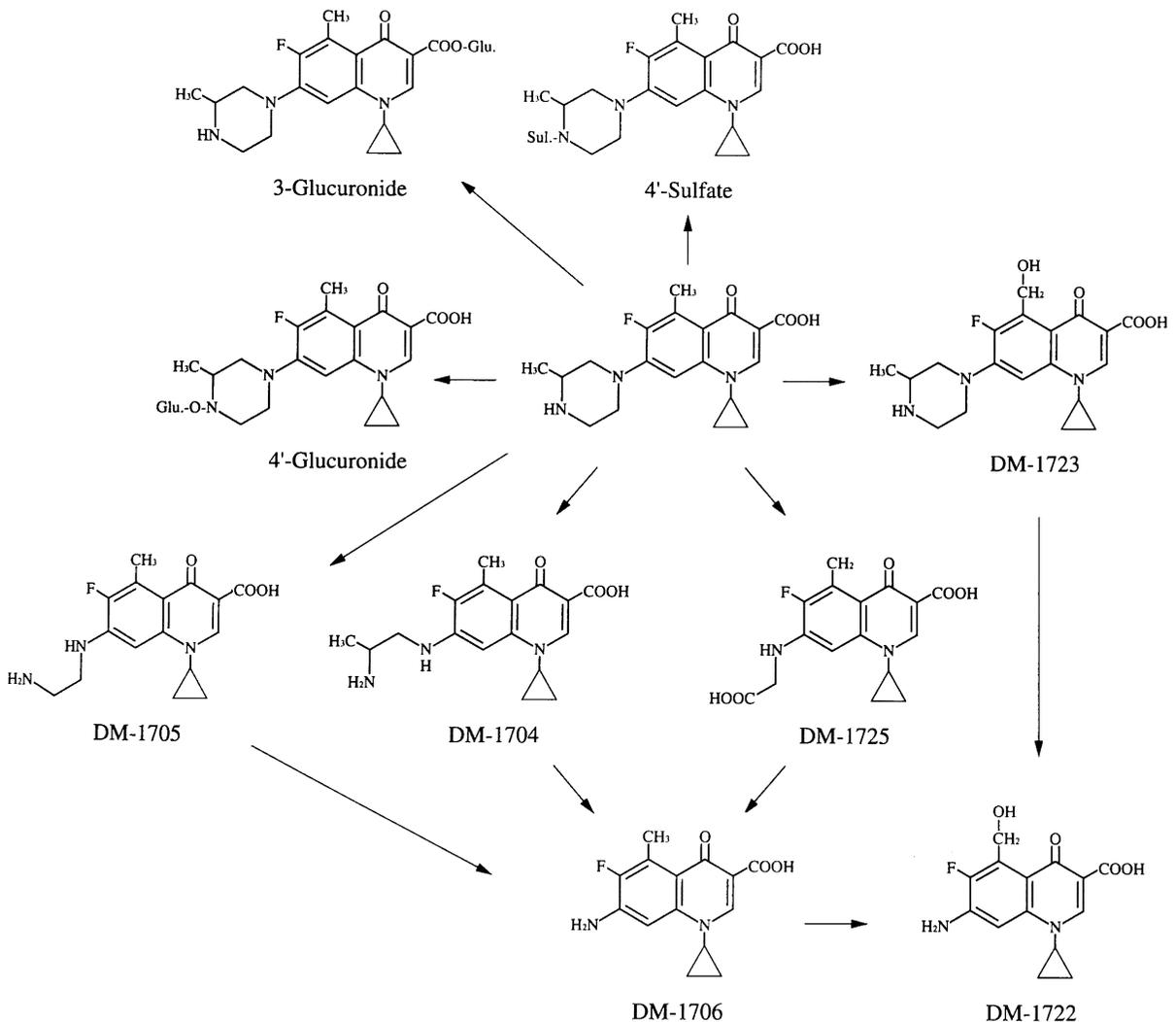


Fig. 12. Proposed metabolic pathways of grepafloxacin.

ラットでは血漿中放射能の大部分が未変化体であり、投与後8時間でも代謝産物の増加する傾向は認められなかった。尿および糞中においても代謝産物の割合は小さかった。これらのことから、GPFXはラットにおいて代謝を受けにくいものと考えられた。また肺においては、代謝産物が認められず放射能のほとんどが未変化体であったことから、本剤投与後の肺での効力は未変化体由来し代謝産物の関与はほとんどないと考えられた。ここでGPFXの主な排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であることが報告されている⁴⁾。今回定量した胆汁中代謝産物の割合は、未変化体およびグルクロン酸抱合体がそれぞれ胆汁中排泄率の27.3および55.8%であり、胆汁中総放射能の大部分を占めていた。従って吸収されたGPFXの大部分は肝臓において未変化体のまま、あるいはグルクロン酸抱合され胆汁中へ排泄されると考えられた。

サルにおいてもラットの場合と同様に、血漿中放射能の大部分が未変化体であり、投与後8時間においても代謝産物の割合が増加する傾向は認められなかった。尿および糞中においても代謝産物の割合は小さく、未変化体はサルにおいても代謝を受けにくいと考えられた。

謝 辞

本研究の実施にあたり、GPFXの経口剤Phase I試験におけるヒト試料を供与していただいた浜松医大薬理学教室の中島光好教授に深謝いたします。またマスペクトルの測定に御協力いただいた当社の辻見祥子、永澤正和の両氏、および論文の作成に御協力いただいた二木徳子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 大黒絹枝, 他: Grepafloxacinの *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用。日化療会誌43(S-1): 74~90, 1995
- 2) Ohmori H, Kuramoto M, Mukai F, Tamaoka H, Kikuchi M: OPC-17116, A novel broad-spectrum 5-methyl quinolone derivative. Therapeutic effects against various infections in animals. Program Abstr 31st ICAAC, Chicago, abstract no. 1475, 1991
- 3) 秋山 仁, 阿部佳史, 小池正己, 急式和代, 藤尾直希, 小富正昭, 向井典江, 大森和則: Grepafloxacinの体内動態(I) - HPLC法による各種動物における吸収, 分布, 排泄。日化療会誌43(S-1): 99~106, 1995
- 4) 秋山 仁, 阿部佳史, 楠本直俊, 小富正昭, Stewart F P, Hopkins R, 田野倉吉則, Thonoor M C: Grepafloxacinの体内動態(II) - ラットにおける [¹⁴C] Grepafloxacinの吸収, 分布, 排泄。日化療会誌43(S-1): 107~124, 1995
- 5) 秋山 仁, 小富正昭, Stewart F P, Hopkins R, 堀勝行, 市毛一美: Grepafloxacinの体内動態(III) - サルおよびイヌにおける [¹⁴C] Grepafloxacinの吸収, 排泄。日化療会誌43(S-1): 125~130, 1995
- 6) Morita S, Otsubo K, Matsubara J, Ohtani T, Kawano Y, Ohmori K, Ohguro K, Uchida M: Synthesis of expected metabolites of 1-cyclopropyl-1, 4-dihydro-6-fluoro-5-methyl-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid. Chem Pharm Bull (submitted for the publication)
- 7) 中島光好, 植松俊彦, 長嶋 悟, 小管和仁, 金丸光隆: Grepafloxacinの臨床第一相試験。日化療会誌43(S-1): 155~175, 1995
- 8) Silverstein R M, Bassler G C and Morrill T C著, 荒木 峻, 益子洋一郎, 山本 修訳: 有機化合物のスペクトルによる同定法。第4版。p12, 東京化学同人, 1983
- 9) 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, [¹⁴C] NY-198によるラット, イヌにおける代謝。Chemotherapy 36(S-2): 174~187, 1988
- 10) 田井 賢, 小西義憲, 杉本由美子, 出町久美子, 前田豊男: ピリドン, カルボン酸系抗菌剤の代謝研究(第1報) - (±)-7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1-(2, 4-difluorophenyl)-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid *p*-toluenesulfonate hydrate (T-3262)の尿中代謝物の単離及び同定。Jap J Antibiotics XLII: 4: 868~875, 1989
- 11) 山口俊和, 横川真喜子, 坂下素子, 糸川 彰, 黒野益男, 関根 豊: Sparfloxacinのラット, イヌ, サル, ヒトにおける代謝。薬物動態 6(1): 21~32, 1991
- 12) Gau W, Kurz J, Petersen U, Ploschke H J and Wuensche C: Isolation and structural elucidation of urinary metabolites of ciprofloxacin. Arzneimittel/ Drug Res 36 (II) Nr10: 1545~1549, 1986
- 13) Blanckaert N, Compennolle F, Leory P, Houtte R V, Fevery J and Heirwegh K P M: The fate of bilirubin-IX α glucuronide in cholestasis and during storage *in vitro*. Intramolecular rearrangement to positional isomers of glucuronic acid. Biochemical J 171: 203~214, 1978
- 14) Hyneck M L, Munafa A and Benet L Z: Effect of pH on acyl migration and hydrolysis of tolmetin glucuronide. Drug Metab Dispos 16 (2): 322~324, 1988
- 15) Breemen R B V and Fenselau C C: Reaction of 1-

- O-acyl glucuronides with 4-(*p*-nitrobenzyl) pyridine. *Drug Metab Dispos* 14 (2) : 197 ~ 201, 1986
- 16) Rachmel A, Hazelton G A, Yergey A L and Liberato D J: Furosemide 1-O-acyl glucuronide. *In vitro* biosynthesis and pH-dependent isomerization to β -glucuronidase-resistant forms. *Drug Metab Dispos* 13(6): 705~710, 1985
- 17) Hansen-Moller J, Dalgaard L and Hansen S H: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of diflunisal and its glucuronides in serum and urine. Rearrangement of the 1-O-acyl glucuronide. *J Chromatogr* 420: 99~109, 1987
- 18) Koike M, Nii S, Morita S, Akiyama H, Odomi M: OPC-17116, A new quinolone. Pharmacokinetics and metabolism in healthy volunteers. Program Abstr 31st ICAAC, Chicago, abstract no. 1482, 1991
- 17) Hansen-Moller J, Dalgaard L and Hansen S H: Reversed-phase high-performance liquid chroma-

Pharmacokinetics of grepafloxacin (IV)

—Metabolism after oral administration of grepafloxacin in rats, monkeys and humans—

Hitoshi Akiyama, Masami Koike, Kazuyo Kyuushiki, Takashi Suzuki,
Naotoshi Kusumoto, Seiji Morita and Masaaki Odomi
Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.
463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

The metabolism after oral administration of grepafloxacin (GPFX) or [14 C]GPFX was investigated in rats, monkeys and humans.

1. The metabolites of GPFX identified using human urine and rat urine and bile were two GPFX glucuronic acid conjugates (3-glucuronide and 4'-glucuronide), one GPFX sulfate conjugate (4'-sulfate), four metabolites with a metabolized 3-methylpiperazinyl ring (DM-1704, DM-1705, DM-1706 and DM-1725) and two 5-hydroxymethyl-type metabolites (DM-1722 and DM-1723).

2. The main metabolite of GPFX in human plasma was DM-1705. The metabolites excreted in urine during the period of 0~72 hours after dosing were 3-glucuronide (4.0% of the administered dose), 4'-glucuronide (3.5%), DM-1705 (3.0%), DM-1704 (1.3%), 4'-sulfate (1.0%) and DM-1706 (0.2%). The metabolites excreted in feces during the period of 0~72 hours after dosing were DM-1705 (2.6%), DM-1704 (2.1%), DM-1725 (1.9%), DM-1706 (1.8%) and 4'-sulfate (1.3%).

3. The main metabolite of GPFX in plasma in both male and female rats was 3-glucuronide. The main metabolite in urine was DM-1723 in male rats and 3-glucuronide in female rats. The main metabolite in feces in both sexes was 4'-sulfate. The main metabolite in bile in male rats was 3-glucuronide. GPFX in male rat lungs accounted for more than 90.5% of the total radioactivity in the lungs, and other metabolite was detected.

4. The main metabolites in monkey plasma, urine and feces were DM-1704, DM-1704 and 4'-sulfate, respectively.