

新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin 及びその光学異性体の体内動態, II. 実験動物における体内動態の光学選択的分析法による検討

町田正明*・伊澤 成・堀 弥・石田了三・内田 広

杏林製薬株式会社中央研究所

新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin (GFLX) は、化学構造中に1個のキラル炭素を有するが、その2種の光学異性体が同等の抗菌活性を有することからラセミ体として開発されている。今回我々は、この2種の光学異性体について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による、生体試料中濃度の光学選択的同時定量法を確立した。本法は、血漿 (血清) 及び尿中のR及びS体を光学活性なL-valinamideの誘導体とした後、このジアステレオマーを逆相HPLCにより分離定量するものである。つぎにこの方法を用い、ラット、イヌ及びサルにおける生体内光学異性化の有無について検討した。クロマトグラム上において、GFLXの光学異性体を静脈内投与後の血清試料には互いの対掌体のピークは観察されず、これらは生体内で異性化しないものと考えられた。さらにサルにおいて、本薬物を経口投与後の血中動態及び尿中排泄について検討したところ、光学異性体間で大差は認められなかった。以上のことから、GFLX光学異性体は実験動物で同様の生体内挙動を示すものと考えられた。

Key words : gatifloxacin, 光学異性体, 体内動態

Gatifloxacin (GFLX, Fig. 1) [(±)-1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid] は、杏林製薬株式会社により創製された新キノロン系抗菌薬である¹⁾。本薬物は化学構造中に1個のキラル炭素を有し、2種の光学異性体 (R体, S体) が存在する。しかし、その抗菌活性が同等である²⁾ ことから、ラセミ体として開発されている。R及びS体の各種実験動物における体内動態については、光学非選択的定量法を用いそれぞれ単独投与により検討され、光学異性体間に特筆すべき差がないとされている³⁾。一方、光学異性体の生体内異性化の有無、並びにラセミ体投与後のそれぞれの体内動態を詳細に比較検討するためには、それぞれの光学異性体を同時に分離定量することが必要である。そこで今回我々は、高感度かつ選択性の高い光学異性体の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離定量法を確立し、これを用いて各種実験動物におけるGFLX光学異性体の体内動態を比較したので報告する。

I. 材料及び方法

1. 被験薬物及び試薬

動物への投与、並びに分析用の標品として使用したGFLX (1/2 水和物: Lot No. G955320), そのR体 (Lot

No. R999521, G9Y5334, G9Y5314) 及びS体 (Lot No. R999511, G9Y5343) は、いずれも杏林製薬 (株) において合成された。

Diphenylphosphinic chloride (DPPCl) は、Sigma Chemical Co. 及びAldrich Chemical Co. から、L-valinamideは、Sigma Chemical Co. からそれぞれ購入した。HPLC用メタノールは関東化学 (株) から購入した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

2. 実験動物

雄性Wistar系ラット (10~16週齢, 体重235~410g,

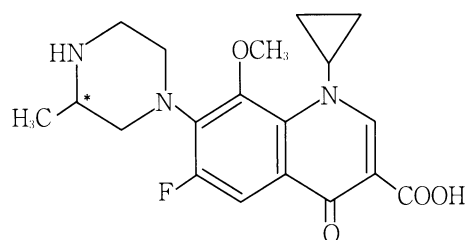


Fig. 1. Chemical structure of gatifloxacin
*: Chiral center

(株)日本医科学動物資材研究所), 雄性ビーグル犬(10~12ヵ月齢, 体重9.1~11.0kg, (株)日本イー・ディー・エム)及び雄性アカゲザル(体重4.55~6.85kg, (株)加商)をそれぞれ用いた。

3. 投薬及び生体試料の採取

1) 各種動物における生体内異性化

0.5~1%のR又はS体のブドウ糖等張水溶液をラット, イヌ, サルにそれぞれ10, 2及び5mg/kgの投与量で静脈内投与し, 2, 0.5及び2時間後に大腿動脈に予め挿入したカニューレ, 前腕静脈または下腿伏在静脈からそれぞれ採血した。

2) サルにおける体内動態

0.25% GFLX水溶液5mg/kgを胃ゾンデを用いてサル3例に経口投与した。投与前, 並びに投与後0.5, 1, 2, 4, 6, 8及び10時間で下腿伏在静脈から採血した。また, 代謝ケージを用い, 投与前, 並びに投与後0~8, 8~24及び24~48時間で蓄尿を採取した。

3) 生体試料の処理

血液は37℃で約1時間静置後, 遠心分離(2,000g, 10分)により血清を分取した。尿は容量を測定後遠心分離し, その上清を測定試料とした。採取した血清及び尿は分析時まで-20℃で凍結保存した。

4. 分析方法

1) 前処理方法

血漿(血清)又は尿0.1mLに0.5Mリン酸緩衝液(pH 7.0)0.2mL及びジクロロメタン4mLを加え, 10分間振盪した。遠心(2,000g, 10分)後, ジクロロメタン層3mL

にトリエチルアミン20 μ L(0.143mmol)及びDPPCI20 μ L(0.106mmol)を加え10秒間混合し, 直ちにL-valinamide溶液0.5mL(約0.165mmol)を加え10分間の振盪により反応させた。次に, 反応液に1M塩酸0.2または0.3mLを加えて10分間振盪し, 遠心(2,000g, 10分)後, 水層10 μ LをHPLCに注入した。L-Valinamide溶液(約330mM)は以下の方法により調製した。即ち, L-valinamide塩酸塩1.5gを5M水酸化ナトリウム3mLで溶解後, これにジクロロメタン30mLを加え, 1時間振盪した。次に, ジクロロメタン層を分取し, これに無水硫酸ナトリウムを加え使用時まで4℃で保存した(Fig. 2)。

2) HPLC条件

分析用カラムとしてInertsil ODS-2(内径4.6mm×長さ250mm, ジーエルサイエンス)を用い, これにガードカラムとしてInertsil ODS-2(内径4.0mm×長さ10mm, ジーエルサイエンス)を装着した。カラム温度は, カラムオープン(ジーエルサイエンス 556C型)で40℃に保持した。定量用移動相として0.1Mリン酸/メタノール(7:3)を, 定性用移動相として0.01Mリン酸/メタノール(7:3)をそれぞれ用い, 流速1.2mL/minで送液した。クロマトグラムは, 励起波長295nm, 蛍光波長485nmに設定した分光蛍光光度計(日立 F-1050形)により検出し, クロマトデータ処理装置(日立 D-2500形)により記録した。生体試料中薬物濃度は, 薬物添加濃度とクロマトグラム上のピーク面積から, 最小二乗法により算出した検量線から求めた。

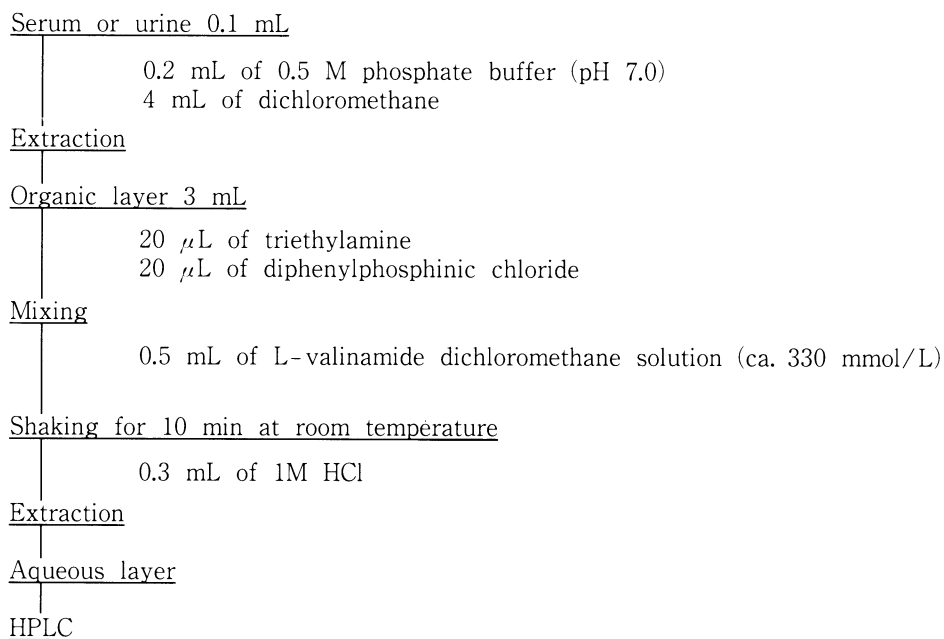


Fig. 2. Procedure for determination of R- and S-isomers of gatifloxacin in serum and urine.

5. 光学異性体のL-valinamide誘導体の精製、並びにその構造解析

上述の定量法において用いたジアステレオマー誘導体化反応を確認するため、以下の方法でR体とL-valinamideとのジアステレオマーを合成した後、その構造解析を行った。

R体原末100mgを25mLのジクロロメタンに溶解し、これにトリエチルアミン50 μ L及びDPPCl 200 μ Lを加えた後、L-valinamide溶液2mLを加え攪拌しながら一晩反応させた。反応溶液を1M塩酸30mL(5mL \times 6)で抽出後、0.5M水酸化ナトリウムで中和した。次にメタノール6mL、ついで、水6mLで活性化した固相抽出カラムBond Elut[®]C₁₈(500mg/3mL, Varian製)に負荷し、3mLのヘキサン及びベンゼンで洗浄後、メタノール3mLで溶出した。溶出液を乾固しメタノール3mLに溶解した後、これをTLC用薄層板(Kieselgel 60 F₂₅₄, 厚さ1.0mm, Merck製)に塗布し、クロロホルム/メタノール/トリエチルアミン(3:3:1)で展開した。主反応物のスポットを掻き取り、1M塩酸30mL(3mL \times 10)で抽出した。0.5M水酸化ナトリウムで抽出液を中和後、メタノール6mLと水6mLで活性化したBond Elut[®]C₁₈に負荷し、3mLのベンゼン及び水/メタノール(7:3)で洗浄後、メタノール3mLで溶出し、これを乾固した。精製した試

料について、MSスペクトルによる解析を行った。

MSスペクトルの測定は、マトリックスにグリセロールを用いたpositive-SIMS法で行った。

6. 解析方法

測定結果は平均値及び標準偏差として示した。サルにおける血清中濃度推移から最高血清中濃度(C_{max})及びC_{max}到達時間(T_{max})を求め、投与後10時間までの血清中濃度曲線下面積(AUC₀₋₁₀)を台形法により算出した。また、消失相における血清中濃度を一次速度式に近似し、最小二乗法により消失速度定数(kel)を算出した。さらに、血中半減期(T_{1/2})及び無限時間までの血清中濃度曲線下面積(AUC_{0-∞})を、以下の式により求めた。ここで、C₁₀は投与後10時間における血清中濃度を示す。

$$T_{1/2} = 0.693 / kel \quad (1)$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-10} + C_{10} / kel \quad (2)$$

薬物速度論的パラメータ及び尿中排泄率について、対応のあるStudentのt検定により統計学的解析を行い、光学異性体間の体内動態を比較した。有意水準は5%とした。

II. 結 果

1. 分析方法

分析方法の定量性をヒト血漿及び尿を用いて確認した。血漿及び尿試料についてのHPLCクロマトグラムをFig. 3

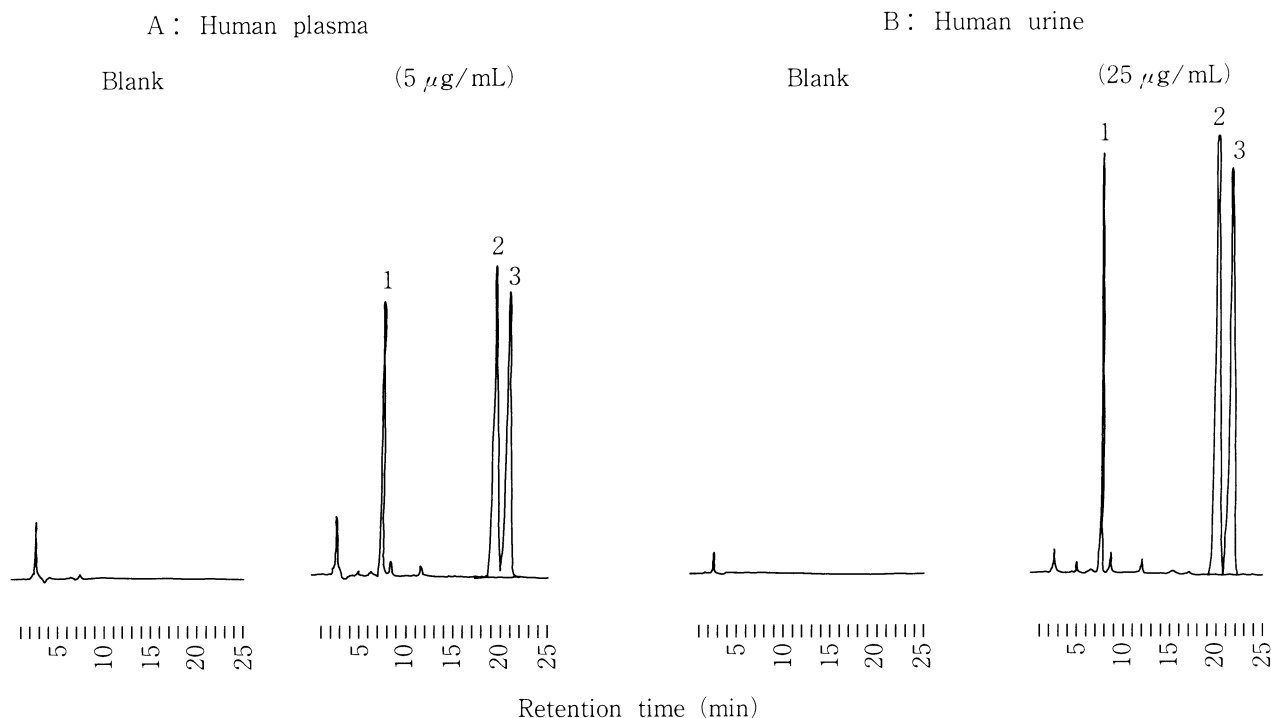


Fig. 3. Typical HPLC chromatograms of human plasma and urine.
Eluent: 0.1M phosphoric acid/methanol (7:3)
1: Unreacted gatifloxacin
2: L-valinamide derivative of R-isomer
3: L-valinamide derivative of S-isomer

に示す。本定量法における異性体の分離は良好であり、測定を妨害するブランクピークは認められなかった。測定濃度範囲は血漿試料についてR体、S体ともに0.02~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、尿試料について0.1~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。検量線の相関係数は血漿及び尿試料について、各異性体で0.999以上の値が得られた。日内再現性(変動係数)は、血漿中濃度が0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のときR体で3.9%、S体で4.3%、尿中濃度が5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のときR体で2.2%、S体で2.5%であった($n=5$)。

本法で採用した、ジアステレオマー誘導化反応をFig. 4に示す。R体のL-valinamide誘導体化生成物のMSスペクトルを測定したところ、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ として m/z 474が得られ、誘導化反応を確認した(Fig. 5)。

2. 各種動物における生体内異性化

ラット、イヌ及びサルにR又はS体を単独に静脈内投与した時の血清試料についてのHPLCクロマトグラムをFig. 6に示す。いずれの動物種においても、クロマトグラム上には、血清由来の妨害ピークは観察されず、本分析方法の適用が可能と判断された。R又はS体単独投与後のクロマトグラム上には、互いの対掌体のピークは検出されなかった。

3. サルにおける体内動態

GFLX投与後のR及びS体の血清中濃度推移をFig. 7に、薬物速度論的パラメータをTable 1に、累積尿中排泄率をFig. 8にそれぞれ示す。R及びS体の血清中濃度推移に大差はなく、光学異性体濃度比(S/R比)は、0.99~1.07の範囲であった。R体の C_{max} 、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-10} 及び $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ0.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.3時間、2.6時間、4.10 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、4.67 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、S体ではそれぞれ0.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.3時間、2.5時間、4.29 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、4.85 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。これら薬物速度論的パラメータにはいずれも有意な差は認められなかった。さらに、投与後48時間までにR体、S体ともに投与量の26~27%が排泄され、そのS/R比は1.00~1.02で、光学異性体間で差は認められなかった。

III. 考 察

薬物の中には光学活性を有するものが存在し、これらの多くは薬効、毒性、さらに体内動態において光学異性体間で異なることが知られている⁴⁾。新キノロン系抗菌薬においてもofloxacin (OFLX)の場合、その抗菌活性^{5,6)}や体内動態^{7,8)}で光学異性体間の差が知られている。これ

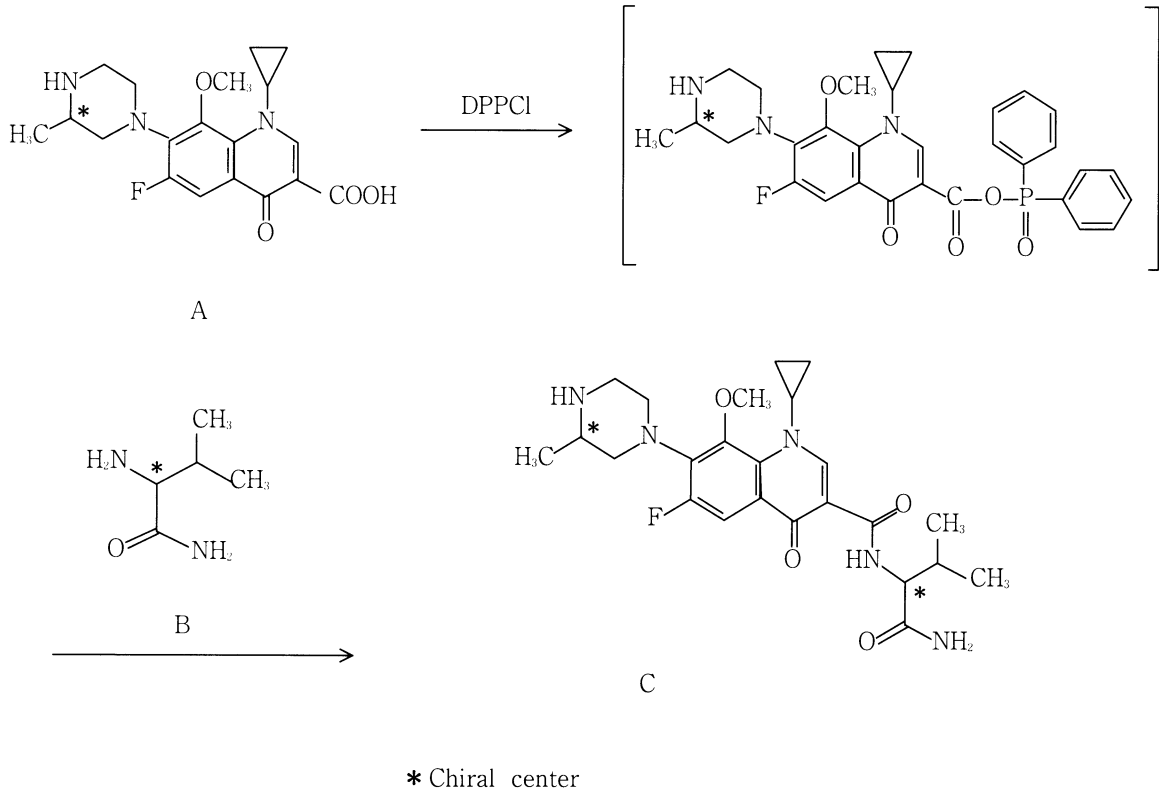


Fig. 4. Chemical structures of gatifloxacin (A), L-valinamide (B), and L-valinamide derivative of gatifloxacin (C).

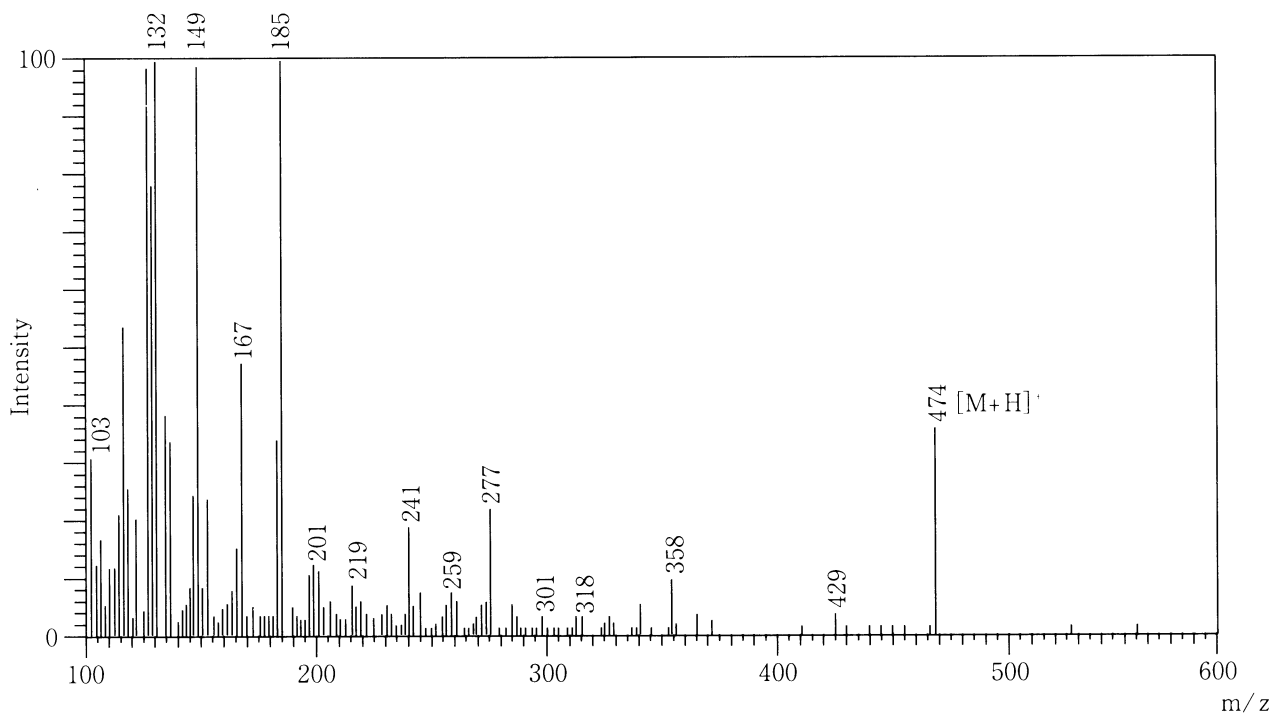


Fig. 5. Mass spectrum of L-valinamide derivative of R-isomer.

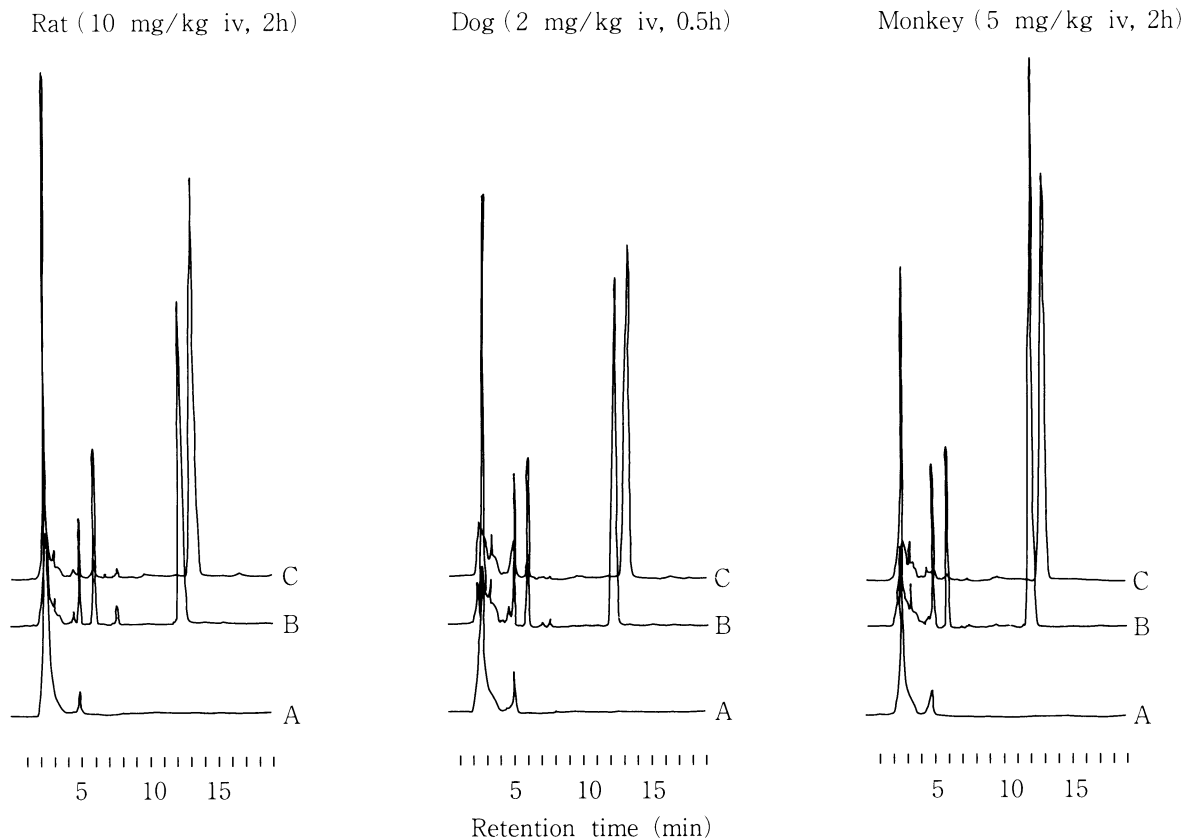


Fig. 6. Typical HPLC chromatograms of serum following intravenous administration of a single isomer of gatifloxacin in rat, dog, and monkey.

Eluent: 0.01M phosphoric acid/methanol (7:3)

A: before administration

B: after administration of R-isomer

C: after administration of S-isomer

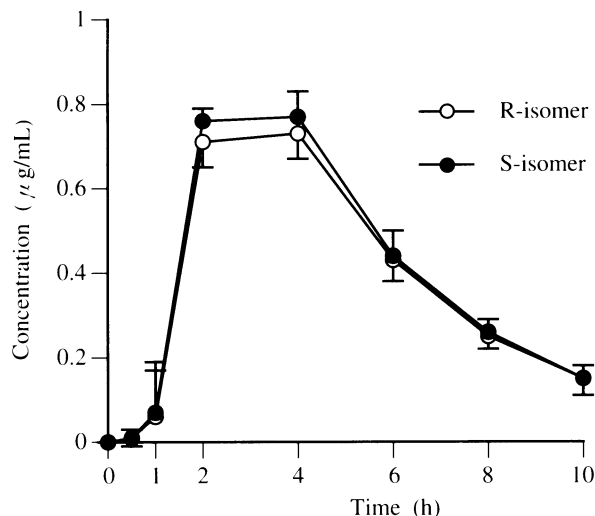


Fig. 7. Serum concentrations of R- and S-isomers of gatifloxacin following oral administration of 5 mg/kg of gatifloxacin in monkeys (mean \pm SD, n=3).

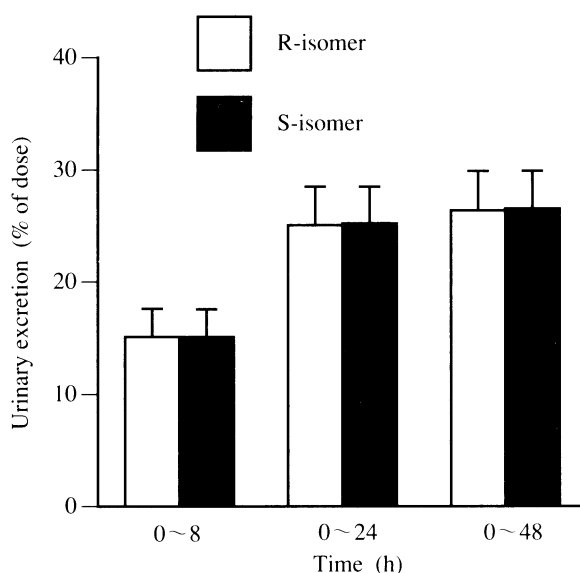


Fig. 8. Cumulative urinary excretion of R- and S-isomers of gatifloxacin following oral administration of 5 mg/kg of gatifloxacin in monkeys (mean \pm SD, n=3).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of R- and S- isomers following oral administration of 5 mg/kg of gatifloxacin in monkeys

Parameter	R-isomer	S-isomer
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.77 \pm 0.01	0.80 \pm 0.02
Tmax (h)	3.3 \pm 1.2	3.3 \pm 1.2
T _{1/2} (h)	2.6 \pm 0.3	2.5 \pm 0.4
AUC ₀₋₁₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	4.10 \pm 0.23	4.29 \pm 0.19
AUC ₀₋₁₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	4.67 \pm 0.35	4.85 \pm 0.40
Urinary excretion (0~48h, % of dose)	26.35 \pm 3.54	26.51 \pm 3.39

Each value represents the mean \pm SD (n=3).

ら光学異性体の体内動態を解明する手段のひとつとして、異性体の分離定量が考えられる。光学異性体の分離法としては、光学分離カラムによる直接法が考えられるが、我々が検討したGFLXの場合、直接法では生体由来のブランクと薬物の分離、並びに定量感度が不十分のため、ジアステレオマーを形成後逆相系カラムで分析する方法を選択した。

本法は、OFLXとL-leucinamideによるジアステレオマー化反応を用いたLehrらの方法⁶⁾に準じたものであり、この反応に光学活性なアミドとしてL-leucinamideに代えて、炭素鎖の短いL-valinamideを用いることで保持時間の短縮を可能とした。GFLXのL-leucinamide誘導体の保持時間が21.5及び23.3分の時、L-valinamide誘導体の保持時間は8.6及び9.2分であった(データ未掲載)。一般に、キラル中心に近い位置に別のキラル中心を導入

することにより、そのジアステレオマーの分離は良好になるとされる。しかし、本法ではキラル中心に近いアミノ基ではなくカルボキシル基の誘導化にもかかわらず良好な分離を示し、各種実験動物の血清及び尿試料への適用が可能であった。

生体内での光学異性化反応については、2-アシルプロピオン酸系非ステロイド性抗炎症剤のR体からS体への変換が、活性体への選択的光学異性化として良く知られている⁴⁾。今回、我々はGFLXについて定性的な検討を試み、HPLCクロマトグラム上にそれぞれの対掌体ピークが検出されないことから、本薬物の生体内での光学異性化反応は無視しうるものと判断した。

次に、GFLX経口投与後のサルにおける各光学異性体の血中動態及び尿中排泄には差は認められず、体内での異性化もないことが確認された。したがって、サルにおいては、2種の光学異性体が体内動態的に同一であるといえた。

以上、GFLXは抗菌活性に加え、体内動態の面においても、各種動物で光学異性体間に大差はないものと結論された。

文 献

- 1) Hosaka M, Yasue T, Fukuda H, et al.: In vitro and in vivo antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2108~2117, 1992
- 2) 安江徳太郎, 三浦資子, 弦巻葉子, 他:

- Gatifloxacin 光学異性体の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力. 日化療会誌 47 (S-2) : 27~30, 1999
- 3) 大家 毅, 石川紅美, 町田正明, 他: 新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin 及びその光学異性体の体内動態, I. 各種実験動物における体内動態. 日化療会誌 47 (S-2) : 112~123, 1999
- 4) 加藤隆一: 薬物の立体選択性代謝と医薬品開発. 薬物動態 2 : 177~182, 1987
- 5) Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, et al.: Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 29 : 163~164, 1986
- 6) Fujimoto T, Mitsuhashi S : In vitro antibacterial activity of DR-3355, the S-(-)-isomer of ofloxacin. Chemotherapy 36 : 268~276, 1990
- 7) Okazaki O, Kurata T, Tachizawa H : Stereoselective metabolic disposition of enantiomers of ofloxacin in rats. Xenobiotica 19 : 419~429, 1989
- 8) Okazaki O, Kojima C, Hokusui H, et al.: Enantioselective disposition of ofloxacin in humans. Antimicrob Agents Chemother 35 : 2106~2109, 1991
- 9) Lehr K H, Damm P : Quantification of the enantiomers of ofloxacin in biological fluids by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 425 : 153~161, 1988

Pharmacokinetics of gatifloxacin,
a new quinolone, and its enantiomers :
II. Enantioselective method for the determination of gatifloxacin
and its application to pharmacokinetic studies in animals

Masaaki Machida, Shigeru Izawa, Wataru Hori,
Ryozo Ishida, and Hiroshi Uchida

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.
2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun,
Tochigi 329-0114, Japan

Gatifloxacin (GFLX), a new quinolone with a chiral center in its structure, has been developed as a racemate because its two enantiomers have almost the same antimicrobial activity. An enantioselective high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of two enantiomers of GFLX in biological samples. This method was based on the derivation of R- and S-isomers in plasma (or serum) and urine with optically active L-valinamide, followed by the separation of these diastereomers by reversed-phase HPLC. The pharmacokinetics of GFLX and its two enantiomers were investigated in animals using this method. No interconversion of the enantiomers of GFLX was observed on chromatograms of serum following intravenous administration of single enantiomers in rats, dogs, and monkeys. Furthermore, there was no difference between the two enantiomers following oral administration of GFLX in monkeys with respect to disposition in serum and urinary excretion. These results indicate that R- and S-isomers of GFLX have similar pharmacokinetic profiles in laboratory animals.