

新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin の ラット、ウサギおよびイヌにおける代謝物の構造決定および定量

大家 毅・橋本秀男・弦巻葉子・小室正勝・多賀福太郎・大久保秀夫

杏林製薬株式会社中央研究所*

新キノロン系抗菌薬である gatifloxacin (GFLX) のラット、ウサギおよびイヌにおける代謝について検討し、以下の結果を得た。

1. GFLX を経口投与後のラット胆汁および尿から、未変化体、GFLX のエステル型グルクロン酸抱合体 (M-1)、3-メチルピペラジン環の開環した置換基を有するエチレンジアミン体 (M-2)、2-メチルエチレンジアミン体 (M-3) およびアミノ体 (M-4) がそれぞれ同定された。

2. ^{14}C で標識した GFLX (^{14}C GFLX) をラット、ウサギおよびイヌに経口投与後 24 時間までに、それぞれ 99.9、83.6 および 70.5 % の放射能が体外へと排出された。尿および糞中への放射能の排泄の割合は、それぞれ 34 : 66、40 : 60、69 : 31 であった。

3. ラット、ウサギおよびイヌから採取した尿において、放射能は主に GFLX として存在し、尿中へ排泄された放射能の約 90 % を占めていた。その他に M-1 が約 3 %、M-4 が 1 ~ 2 %、M-2 および M-3 がそれぞれ約 1 % 検出された。各種の動物間でその代謝パターンに大きな差は見られなかった。

これら動物の糞中では、GFLX が主に存在し、その他に M-2、M-3 および M-4 が糞中へ排泄された放射能のそれぞれ 1 ~ 2 % 認められた。

4. 胆管カニュレーションを施したラットに ^{14}C GFLX を経口投与後 24 時間までに 96.1 % の放射能が体外に排泄され、尿、胆汁および糞中への放射能の排泄の割合は 41 : 45 : 14 であった。ラット胆汁中へ排泄された放射能のうち、M-1 が 54 %、GFLX が 18 % であった。その他、M-2、M-3 および M-4 が認められた。

5. ^{14}C GFLX を経口投与した実験動物において、投与後 24 時間までに尿および糞中へ排泄された放射能の中で GFLX と M-1 の占める割合は、ラットで 82 %、ウサギで 91 %、イヌで 89 % を示した。

6. ^{14}C GFLX を経口投与したラットから採取した血清中の放射能は、その大部分が GFLX として存在した。

7. M-2、M-3 および M-4 の抗菌活性は、多くの菌種で GFLX の 1/4 ~ 1/256 以下であった。

Key words : gatifloxacin, 代謝, 排泄, 抗菌活性

Gatifloxacin (GFLX) は、杏林製薬株式会社で合成された新規のキノロン系抗菌薬である。本薬はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示し、優れた抗菌力を有することが明らかにされている¹。各種実験動物における本薬の体内動態について、これまでに非標識体および ^{14}C 標識体 (^{14}C GFLX) を用いた検討が行われている。 ^{14}C GFLX を用いたラットでの検討では、経口投与された GFLX は速やかに、かつ

大部分が吸収され、投与放射能の約 4 割が尿中へ、約 3 割が胆汁中へと排泄された²⁾。さらに、非標識体の GFLX を用いた検討の結果、ラット尿中では大部分が GFLX として、また胆汁中では GFLX およびそのグルクロン酸抱合体として存在することが明らかにされている³⁾。

今回、各種実験動物における GFLX の代謝パターンを検討する目的で ^{14}C GFLX をラット、ウサギおよびイヌに経口投与し、その尿および糞中代謝物、ラット胆汁

中代謝物とそれぞれの排泄量, ならびにラット血清中代謝物の有無について検討した。あわせて, 代謝物の抗菌活性をGFLXと比較した。以下にその結果を報告する。

I. 材料と方法

1. 被験薬物, 代謝物標品および試薬

実験に供したGFLX (1½水和物 Lot No. G655321, G315311 および G155311) は, 杏林製薬 (株) において合成された。[pyridone ring-2-¹⁴C] GFLX (Lot No. ROX9542 および CFQ8394) は, 杏林製薬 (株) および Amersham において合成した。比放射能はそれぞれ 825 および 666 kBq/mg であった。その薄層クロマトグラフィ [プレート: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck; 展開溶媒: クロロホルム/メタノール/28%アンモニア水 (10:10:3, v/v)] による放射化学的純度は98%以上であった。

代謝物標品および類縁化合物として以下のものを杏林製薬 (株) で合成した。

エチレンジアミン体 [M-2; 7- [(2-aminoethyl) amino]-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid], 2-メチルエチレンジアミン体 [M-3; (±)-7- [(2-aminopropyl) amino]-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid], アミノ体 [M-4; 7-amino-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid], アミド体 [(±)-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-quinoline-3-carboxamide]。

β-Glucuronidase (*Escherichia coli* 由来) はベーリンガー・マンハイム (株) から購入した。その他の試薬, 溶媒はすべて市販の特級品もしくは高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 用溶媒を用いた。

2. 実験動物

生後8~16週齢, 体重226~420gのWistar系雄性ラット ((株) 日本医科学動物資材研究所), 体重2.0~2.1kgのNew Zealand White種雄性ウサギ ((株) 日本医科学動物資材研究所) ならびに生後79箇月齢, 体重9.6~10.6kgの雄性ビーグル犬 (日本イー・ディ・エム (株)) をそれぞれ使用した。ラットおよびイヌは薬物投与前約16時間, ウサギは約40時間絶食し, それぞれ投与後4時間に給餌を再開した。飼料として, ラットはCE-2 (日本クレア (株)), ウサギはCR-3 (日本クレア (株)), イヌにはDM-2 ((株) 船橋農場) をそれぞれ与えた。飲料水は実験期間を通して自由に摂取させた。

3. 薬物の投与

代謝物の構造決定の目的で, 非標識GFLXを200mg/

10mL/kgの用量で, 原末中水分の補正を行わずラットに単回または1日2回反復経口投与して, その尿または胆汁をそれぞれ採取した。GFLXは0.3%カルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁して投与した。

各種実験動物における代謝物の定量は [¹⁴C] GFLXを用いて行った。 [¹⁴C] GFLXの投与量は, ラット, ウサギおよびイヌでの尿, 糞中排泄の検討ならびにラットでの胆汁排泄の検討では10mg/0.763~1.01MBq/kg, ラットでの血清中代謝物の検討では10mg/3.86MBq/kgとし, 原末中水分の補正は行わなかった。ラットおよびウサギの経口投与では [¹⁴C] GFLXの0.1~0.2%水溶液を用いた。非標識GFLXで適宜希釈した [¹⁴C] GFLXを0.1M塩酸に溶解し, 0.1M水酸化ナトリウムでpHを約5に調整した後にブドウ糖を加えて等張なGFLX水溶液を調製した。一方, イヌへの投与は [¹⁴C] GFLXおよび非標識GFLXの原末を混合して充填したゼラチンカプセルを用いた。

4. 生体試料の採取

尿, 糞中排泄の検討では, 各動物を個別の代謝ケージに収容し, 薬物投与後に自然排泄された尿および糞を採取した。ラットにおける胆汁排泄の検討では, 総胆管にカニューレ (PE-10, Becton Dickinson) を挿入した後, 動物をボールマンケージに固定した。ついで, 薬物を経口投与後24時間までに排泄された尿, 糞および胆汁を採取した。

血清中代謝物の検索では, [¹⁴C] GFLXを経口投与したラットから, 投与後1時間の血液を採取した。血液はエーテル麻酔下に腹大動脈から採取し, 直ちに遠心 (3,000 rpm, 10min) により血清を分取した。

胆汁中の代謝物の検索では, 試料の採取は氷冷下で行い, 試料を秤量後直ちに1M酢酸緩衝液 (pH 5.2) を等量添加した。各試料は使用時まで-20℃にて凍結保存した。

5. 尿, 胆汁および糞中排泄率の測定

尿はケージ洗浄液と共に捕集した。全容量を測定後, その0.5mLをバイアルに採取した。ラットから得た胆汁はその全重量を測定後, 約100mgをバイアルに採取した。採取した尿および胆汁はメタノール1mLを加えた後, ACS II[®] (Amersham) を加え放射能測定のための試料とした。糞は適量の水を加え乳鉢で均一に練合し, その一部 (200~700mg) を採取した。風乾した試料は, サンプルオキシダイザー (Tri-Carb[®] 306型, Packard) で燃焼した。放射能は¹⁴CO₂としてCARBO-SORB[®] E (Packard) に捕集し, 液体シンチレーター (PERMAFLUOR[®] E⁺, Packard) を加えて放射能測定試料とした。

6. 放射能の測定

放射能は液体シンチレーションアナライザー (Tri-Carb[®] 2000CA型, Packard) で測定した。クエンチング補正

は外部標準線源法により行った。

7. HPLC

装置としてL-6000形または655形HPLCシステム（日立）を用い、検出はUV（検出波長285または289nm）または蛍光モニター（励起波長290nm, 蛍光波長490nm）で行った。また、移動相中の放射能はラジオLC検出器（RS-8000型, 東ソー）を用いて測定した。カラムはTSK gel ODS-80T_M（内径4.6mm×長さ150mm, 東ソー）を用い、移動相および流速は以下の条件を使用した。

（条件1）A液：5mMクエン酸/アセトニトリル/1M酢酸アンモニウム（81：18：1, v/v），B液：アセトニトリル，流速：1.0mL/min, 0～45分までA液100%，45～75分は、A液100%からB液100%となる直線グラジエント

（条件2）A液：0.1M酢酸/アセトニトリル（90：10, v/v），B液：アセトニトリル，流速：1.0mL/min, 0～30分でA液100%からB液100%となる直線グラジエント

（条件3）A液：0.8mM 1-octane sulfonate sodiumを含む0.01Mリン酸/アセトニトリル/テトラヒドロフラン（82：16：2, v/v），B液：アセトニトリル，流速：1.0mL/min, 0～45分までA液100%，45～55分はA液100%からB液50%となる直線グラジエント，55分以後B液100%

8. 紫外線吸収 (UV) スペクトル

フォトダイオードアレイ検出器 (991J型, Waters) を装着した前述のHPLCを用い、上記HPLC条件3で測定した。

9. 質量分析 (MS) スペクトル

二重収束質量分析装置 (M-2000型, 日立) を用いた。高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) は上記のHPLC条件2を用い、大気圧化学イオン化法 (APCI) により正イオンモードで測定した。ラット尿から単離した代謝物については二次イオン質量分析スペクトル (SIMS) を併せて測定した。測定には一次イオンに8kVのXe⁺を用い、マトリックスにグリセロールを使用した。

10. 代謝物の検索

採取した胆汁または尿をBond Elut[®]C₁₈ (Varian) に負荷し、水洗後にアセトニトリルまたはメタノールにて溶出した。減圧乾固後、残渣を0.1M酢酸/アセトニトリル (1：1, v/v) に溶解し、その一部をLC/MSに注入した。抱合体は、精製あるいは希釈した試料を、アルカリ加水分解 (1M水酸化ナトリウム中, 37℃, 1時間) またはβ-glucuronidase処理 (0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中, 37℃, 1時間) 後HPLCで分析し、未処置試料とクロマトグラムを比較することより検索した。また、胆汁から精製した試料をアンモニア水と反応させ (37℃, 30分)、アミド体の生成の有無を検討した¹⁾。

11. 代謝物の同定

代謝物の同定は、UVスペクトル、HPLCの保持時間およびMSスペクトルを合成代謝物標品のそれと比較することにより行った。ラットから採取した尿あるいは胆汁中の微量代謝物は、HPLC (条件1) による粗分画を行った後、LC/MSに供した。グルクロン酸抱合体は、HPLC分取による単離・精製を行った後、その正イオンおよび負イオンSIMSスペクトルを測定した。

12. 代謝物の定量

GFLXの各代謝物の分画、定量はHPLC条件3で行った。^[14C]GFLXを投与したラット、ウサギおよびイヌから採取した尿、ならびにラットから採取した胆汁は直接、またはアルカリ加水分解処理後HPLCに注入した。各動物から得た糞は乳鉢で均一に練合した後、その一部 (約500mg) を採取した。これに0.1M塩酸5mLを加え攪拌、振盪した後、3,000rpmで10分間遠心し、その上清を採取した。この操作を5回繰り返す、その上清すべてを合わせ、中和した後に凍結乾燥した。ついで残渣を移動相に溶解し、試料とした。ラットから採取した血清は、4倍量のアセトニトリルを加え攪拌、振盪後、3,000rpmで10分間遠心し、上清を採取した。この操作を3回繰り返す、その上清を合わせて減圧下で濃縮乾固した。ついで残渣を移動相に溶解し、試料とした。

HPLC溶出液は60秒ごとに分取した。分取した各分画には、シンチレータ (ACS II[®], Amersham) 7mLおよびメタノール1mLを加え、その放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。各試料中の代謝物は、合成標品の保持時間との比較により確認し、クロマトグラム上の各代謝物の存在比を算出した。尿、胆汁および糞中の各代謝物の排泄率は、それぞれの試料についてその総放射能の測定から算出された放射能排泄率 (% of dose) に、それぞれの試料中での各代謝物の存在割合を乗ずることで算出した。抱合体量は、アルカリ加水分解処理の有無による定量値の差として算出した。

13. 代謝物の抗菌活性

代謝物の抗菌活性は、日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法²⁾ に準じて測定した。

II. 結 果

1. 代謝物の同定

^[14C]GFLXを投与したラットから採取した胆汁を直接、あるいはβ-glucuronidaseまたは1M水酸化ナトリウム水溶液による加水分解処理後にHPLC条件1で分析したときのクロマトグラムをFig. 1に示す。ここで放射活性の認められた分画をそれぞれP-1～P-5とした。これらの分画は^[14C]GFLXを投与したラットから採取した尿のラジオクロマトグラムにおいても見られた。以下、ラット胆汁および尿を直接あるいは前処理後LC/MSに

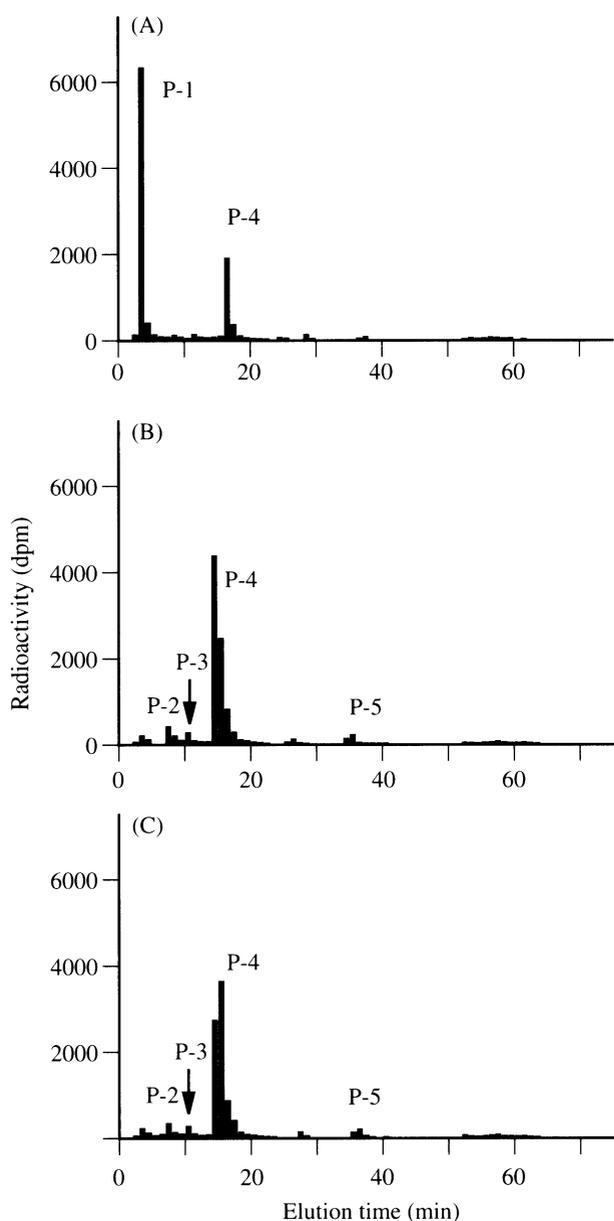


Fig. 1. Typical radiochromatograms of rat bile collected for 24 h after oral administration of [14 C] gatifloxacin (10 mg/kg) [Solvent 1].
 (A) Untreated bile
 (B) Bile treated with β -glucuronidase
 (C) Bile treated with 1M NaOH

供し、それぞれの分画に含まれる代謝物の構造を決定した。

1) P-4

P-4のHPLCにおける保持時間およびUVスペクトルは、GFLXに一致した (Table 1)。次に、胆汁をBond Elut[®] C₁₈で固相抽出し、その濃縮液の一部をLC/MS (条件2)に注入した。最大ピークを示した分画P-4のMSスペクトルをFig. 2 (A)に、また別途測定したGFLX標品のスペクトルをFig. 2 (B)にそれぞれ示す。両スペクトルにはともにm/z 376 ([M+H]⁺)がベースピークとして検出された。これらのことから、P-4をGFLXと同定した。

2) P-1

P-1は β -glucuronidaseおよびアルカリ加水分解処理により著しくピーク高さが低下し、逆にP-4のピーク高さが増大した (Fig. 1)。そのUVスペクトルはGFLXと類似し、GFLXのグルクロン酸抱合体であることが推察された。

次に、ラットから採取した未処理の胆汁をBond Elut[®] C₁₈で固相抽出し、その濃縮液の一部をLC/MS (条件2)に注入した。P-1のMSスペクトルをFig. 3 (A)に示す。スペクトルには、主としてGFLX相当のm/z 376がフラグメントイオンとして見られるとともに、m/z 552 ([M+H]⁺)のイオンが検出された。552と376との質量差176はグルクロン酸部分に相当した。さらに相当する分画について、HPLC分取による精製を行い、負イオンおよび正イオンSIMSスペクトルを測定した (Fig. 3 (B) および (C))。スペクトルには、それぞれm/z 550 ([M-H]⁻) および552 ([M+H]⁺)のピークが観察されることから、本代謝物の分子量は551であることが示された。一方、未処理の胆汁をBond Elut[®]で精製し、アンモニアで処理した後、HPLCに注入した (条件1)。溶離液をラジオLC検出器に導入し、直接その放射能を測定したラジオクロマトグラムをFig. 4に示す。P-1のピークは消失し、別途合成したアミド体と同一の保持時間を有する新たな放射能ピークおよびGFLXのピークが出現し、エステル型グルクロン酸抱合体の性質を示した¹⁾。以上の結果から、P-1をGFLXの3位カルボキシル基がグ

Table 1. Retention times on HPLC and wavelength of maximum UV absorption of gatifloxacin and its metabolites in rat bile

Compound	Retention time (min)				Wavelength of maximum UV absorption (nm)	
	Solvent 1		Solvent 3		Fraction in bile	Authentic sample
	Fraction in bile	Authentic sample	Fraction in bile	Authentic sample		
Gatifloxacin	15.6	15.6	40.6	40.1	294	294
M-2	7.8	7.6	21.5	21.3	286	286
M-3	10.7	10.5	30.6	29.9	285	286
M-4	46.1	46.0	34.5	35.2	282	280

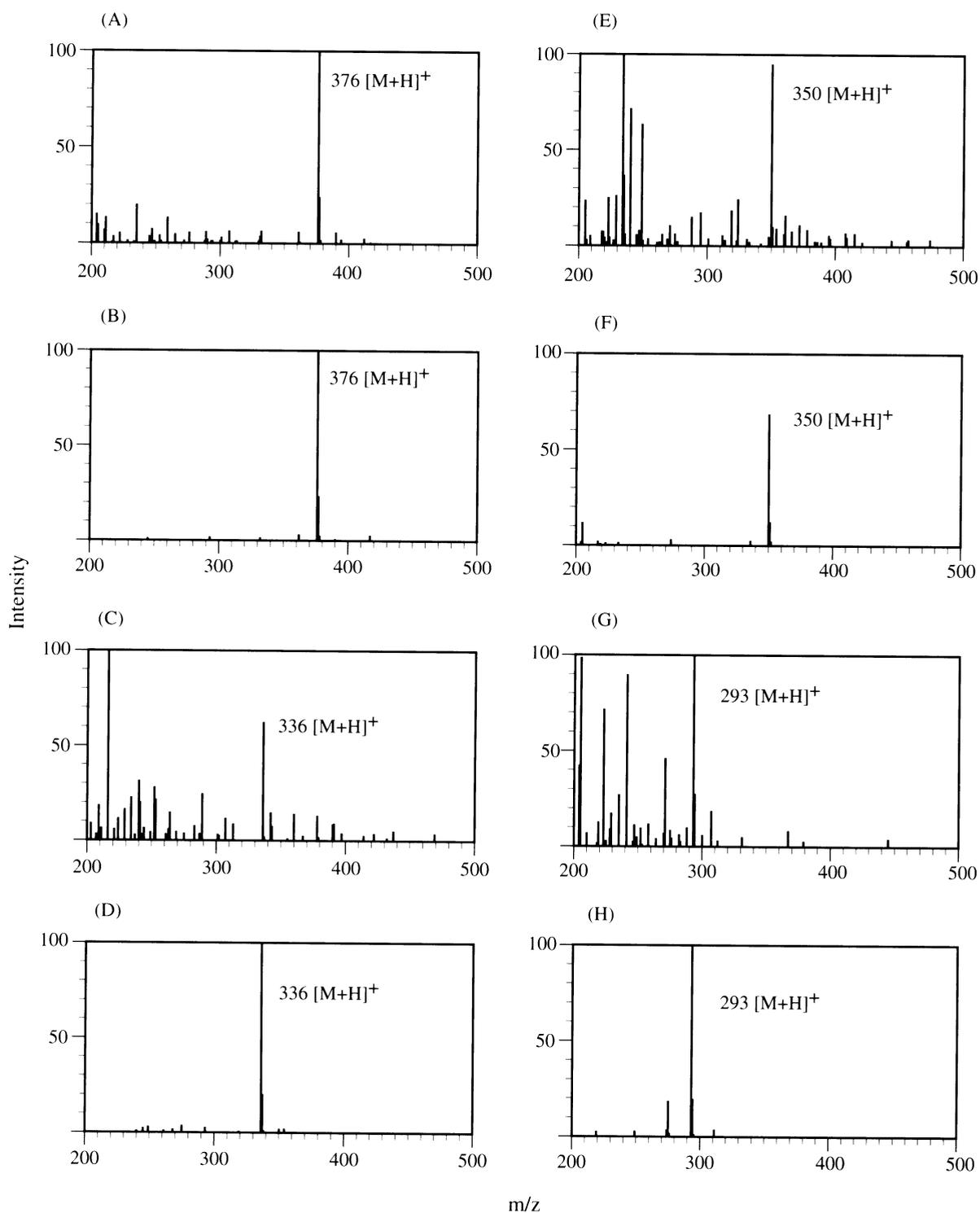


Fig. 2. HPLC-mass spectra of gatifloxacin and its metabolites [Solvent 2].
(A) Fraction P-4, (B) authentic gatifloxacin, (C) fraction P-2, (D) authentic M-2,
(E) fraction P-3, (F) authentic M-3, (G) fraction P-5, (H) authentic M-4

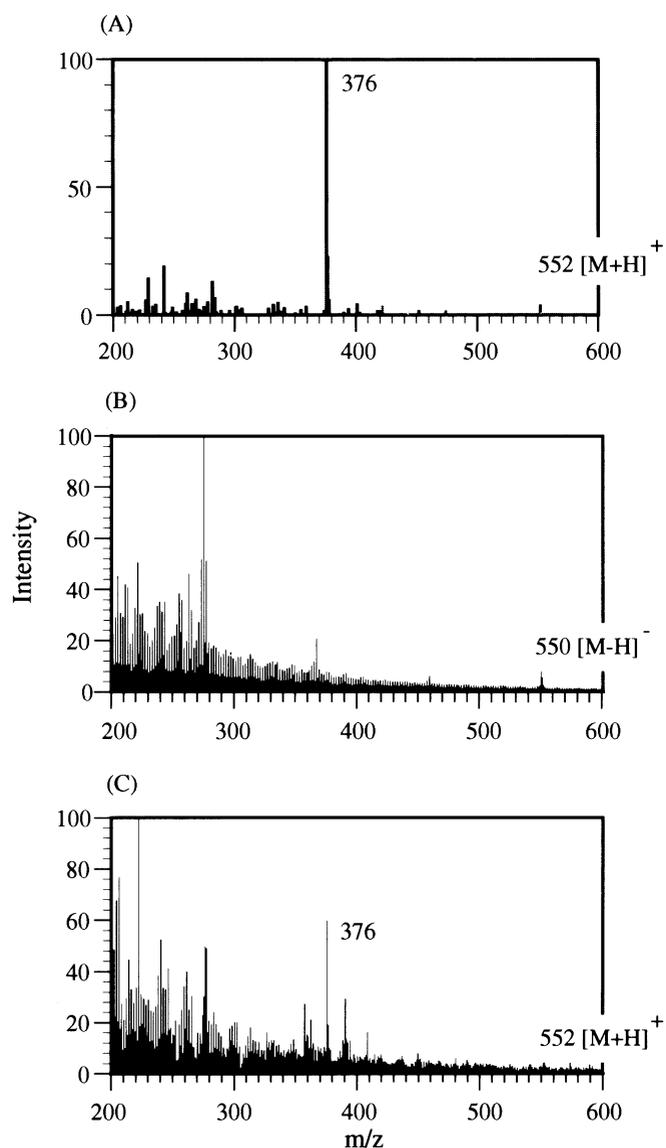


Fig. 3. HPLC-mass, negative and positive secondary ion mass (SIMS) spectra of fraction P-1, separated from rat bile or urine collected for 24 h after oral administration of [^{14}C] gatifloxacin (10 mg/kg).
 (A) LC/MS spectrum of fraction P-1 separated from bile [Solvent 2]
 (B) Negative SIMS spectrum of fraction P-1 separated from urine
 (C) Positive SIMS spectrum of fraction P-1 separated from urine

ルクロン酸抱合を受けた代謝物 (M-1) であると推定した。

3) P-2, P-3

P-2およびP-3について、HPLC分取による粗分画を行った後、LC/MS (条件2) に供した。P-2, P-3それぞれのMSスペクトルをFig. 2 (C) および (E) に、また、エチレンジアミン体および2-メチルエチレンジア

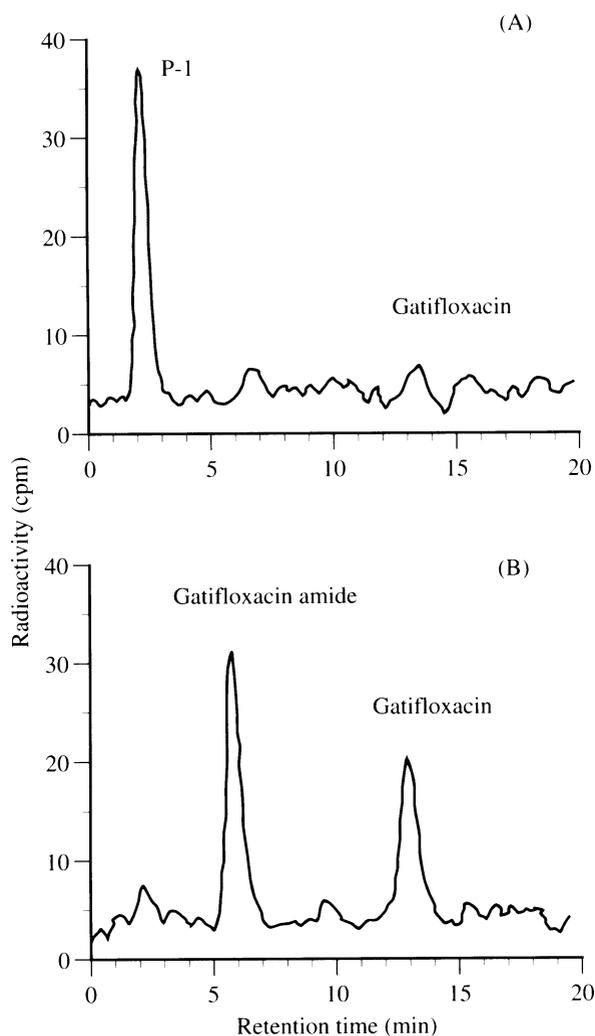


Fig. 4. Radiochromatograms of rat bile collected for 24 h after oral administration of [^{14}C] gatifloxacin (10mg/kg) [Solvent 1]. Elution of radioactivity was detected by radio liquid chromatography detector.
 (A) Untreated bile
 (B) Bile treated with 25% ammonia water

ミン体標品のMSスペクトルをFig. 2 (D) および (F) にそれぞれ示す。P-2およびエチレンジアミン体標品のいずれのMSスペクトルにも、GFLXより40質量数の少ないm/z 336が検出された。また、P-2のHPLCにおける保持時間およびUVスペクトル (Table 1) は、エチレンジアミン体に一致した。これらのことからP-2をGFLXの3-メチルピペラジン環が酸化的開裂したエチレ

ンジアミン体 (M-2) と同定した。

一方、P-3および2-メチルエチレンジアミン体標品のいずれのMSスペクトルにも、P-2と比べて14質量数の多いm/z 350が確認された。また、P-3のHPLCにおける保持時間およびUVスペクトル (Table 1) は、2-メチルエチレンジアミン体に一致した。これらのことからP-3を2-メチルエチレンジアミン体 (M-3) と同定した。

4) P-5

P-5について、HPLC分取による粗分画を行った後LC/MS (条件2) に供した。P-5のMSスペクトルをFig. 2 (G)、アミノ体標品のMSスペクトルをFig. 2 (H) にそれぞれに示す。これらのスペクトルには、いずれもm/z 293が検出された。また、P-5のHPLCにおける保持時間およびUVスペクトル (Table 1) はアミノ体に一致した。これらのことからP-5をアミノ体 (M-4) と同定した。

2. 血清中代謝物

[¹⁴C] GFLXを経口投与したラットから採取した血清をアセトニトリルで抽出、上清を濃縮し、その一部をHPLC (条件3) に注入した。典型的なラジオクロマトグラムをFig. 5に示す。血清抽出物中の放射能は、そのほとんどがGFLX相当の保持時間に溶出した。

3. 尿、糞および胆汁中への放射能の排泄

[¹⁴C] GFLXを経口投与したラット、ウサギおよびイヌにおいて、尿および糞中へ排泄された放射能の投与量

に対する比率をTable 2に示す。投与後24時間までに、ラットで99.9%、ウサギで83.6%、イヌで70.5%の放射能が体外へと排泄された。尿および糞中への放射能の排泄の割合は、ラットで34:66、ウサギで40:60、イヌで69:31であった。

胆管カニューレを施したラットに [¹⁴C] GFLXを経口投与後の尿、胆汁および糞中への放射能の排泄量をTable 3に示す。投与後24時間までに96.1%の放射能が排泄された。尿、胆汁および糞中への放射能の排泄

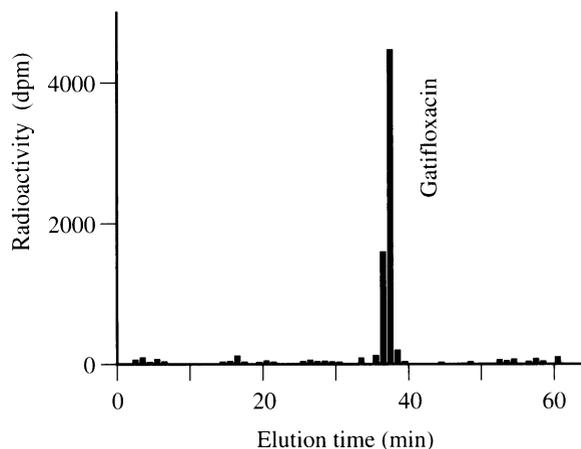


Fig. 5. Radiochromatogram of rat serum 1 h after oral administration of [¹⁴C] gatifloxacin (10 mg/kg) [Solvent 3].

Table 2. Excretion of total radioactivity in urine and feces up to 24 h after oral administration of [¹⁴C] gatifloxacin (10 mg/kg) to laboratory animals

Species	Excretion of radioactivity (% of dose)		
	Urine	Feces	Total
Rat	34.0 ± 11.1	66.0 ± 13.5	99.9 ± 2.5
Rabbit	33.2 ± 6.2	50.4 ± 4.3	83.6 ± 4.1
Dog	48.6 ± 5.8	21.9 ± 5.5	70.5 ± 4.6

Each value represents the mean and SD of three animals.

Table 3. Excretion of total radioactivity in urine, bile and feces up to 24 h after oral administration of [¹⁴C] gatifloxacin (10 mg/kg) to rats

Species	Excretion of radioactivity (% of dose)			
	Urine	Bile	Feces	Total
Rat	39.2 ± 4.6	43.6 ± 5.2	13.2 ± 2.2	96.1 ± 1.6

Each value represents the mean and SD of three animals.

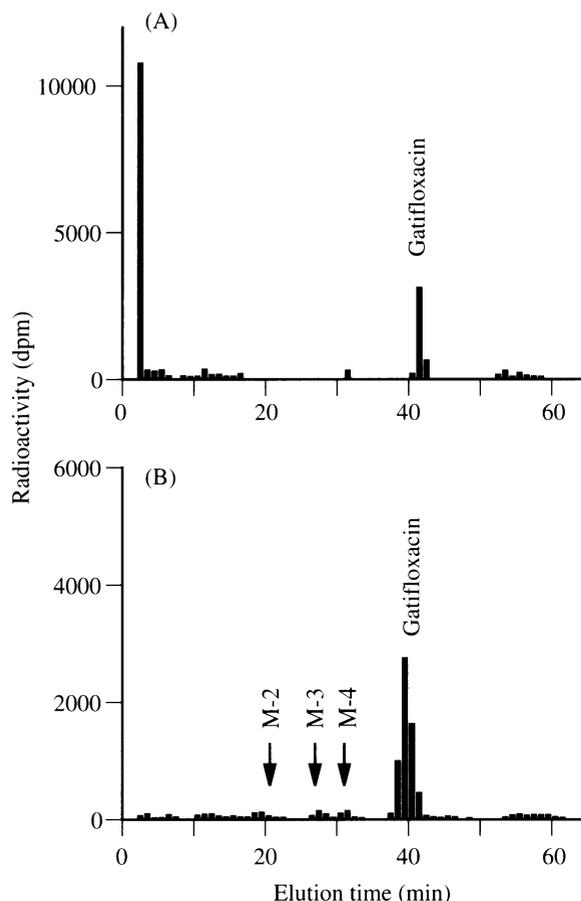


Fig. 6. Radiochromatograms of rat bile collected for 24 h after oral administration of [14 C] gatifloxacin (10 mg/kg) [Solvent 3].
(A) Untreated bile
(B) Bile treated with 1M NaOH

割合は41:45:14であった。

4. 尿、糞および胆汁中代謝物の定量

尿、糞および胆汁中の代謝物の定量はHPLC(条件3)で行った。ラットから採取した胆汁を、直接あるいはアルカリ加水分解処理後にHPLCで分析し、得られたラジオクロマトグラムをFig. 6に示す。加水分解処理した胆汁中にはGFLX, M-2, M-3およびM-4の代謝物標品の保持時間に相当する放射能ピークが認められた。

[14 C] GFLXを経口投与したラット、ウサギおよびイヌから採取した尿をアルカリ加水分解処理した試料ならびに糞の抽出物の典型的なラジオクロマトグラムをFig. 7に示す。尿および糞抽出物中の放射能はそのほとんどがGFLX相当の保持時間に溶出した。

次に、ラット、ウサギおよびイヌの尿ならびに糞抽出物中の放射能をHPLC(条件3)によりGFLX, M-2, M-3およびM-4に分画した。各分画の放射能の投与量に対する割合および各分画の試料中での存在比をTable 4

および5にそれぞれ示す。3種動物の尿中放射能は主としてGFLXとして存在し、尿中へ排泄された放射能の約90%を占めていた。その他にGFLXの抱合体M-1が約3%, M-4が1~2%, M-2およびM-3がそれぞれ約1%検出された。動物種間で、その代謝物の存在割合に大きな差は見られなかった。ラット、ウサギおよびイヌの糞中においてもGFLXが主に存在した。その他に、M-2, M-3およびM-4が糞中へ排泄された放射能のそれぞれ1~2%認められた。

胆管カニュレーションを施したラットから採取した尿、胆汁および糞抽出物の各代謝物分画中放射能の投与量に対する割合ならびにその試料中での存在割合をTable 6に示す。ラット胆汁中の放射能は54%がGFLXの抱合体(M-1)であり、ついでGFLXが18%, M-2, M-3およびM-4が非抱合体と抱合体をあわせてそれぞれ約4%存在した。胆汁を採取したラットにおいて、尿中へ排泄された放射能の約95%, 胆汁中へ排泄された放射能の約80%, 糞中へ排泄された放射能の約60%が、GFLX, M-2, M-3, M-4およびそれらの抱合体であった。

5. 代謝物の抗菌活性

GFLXおよびその代謝物の抗菌活性を最小発育阻止濃度(MIC)として、Table 7に示す。M-2, M-3およびM-4にはいずれも抗菌活性が認められたが、多くの菌種に対しGFLXと比較して4~256倍以上劣るものであった。特に*Streptococcus*属に対しては、著しく抗菌活性が劣っていた。

Ⅲ. 考 察

[14 C] GFLXを投与したラット、ウサギおよびイヌの尿ならびにラットの胆汁中のHPLCクロマトグラムには主として5つの分画に放射能が認められた。ラット尿および胆汁について検討したところ、これらはそれぞれ未変化体、GFLXのエステル型グルクロン酸抱合体(M-1)、エチレンジアミン体(M-2)、2-メチルエチレンジアミン体(M-3)およびアミノ体(M-4)であることが明らかとなった(Fig. 8)。主要な代謝経路は3位カルボキシル基の抱合および3-メチルピペラジン環の開裂とその後の酸化的分解であった。

ピペラジン環の代謝は、他のキノロン系抗菌薬でも報告されている。置換基を持たないピペラジニル基を7位に有するnorfloxacin(NFLX)およびciprofloxacin(CPFX)では、ピペラジン環の開裂したエチレンジアミノ基を有する代謝物とともにピペラジン環3位が酸化を受けたオキソ体ならびにピペラジン環がN-アシル化を受けた代謝物が同定されている^{6,7)}。一方、3-メチルピペラジン環を有するキノロン薬であるlomefloxacin(LFLX), temafloxacin(TMFX), grepafloxacin(GPFX)では、N-アシル化を受けた代謝物は確認されていない¹⁰⁾。これらの薬物で

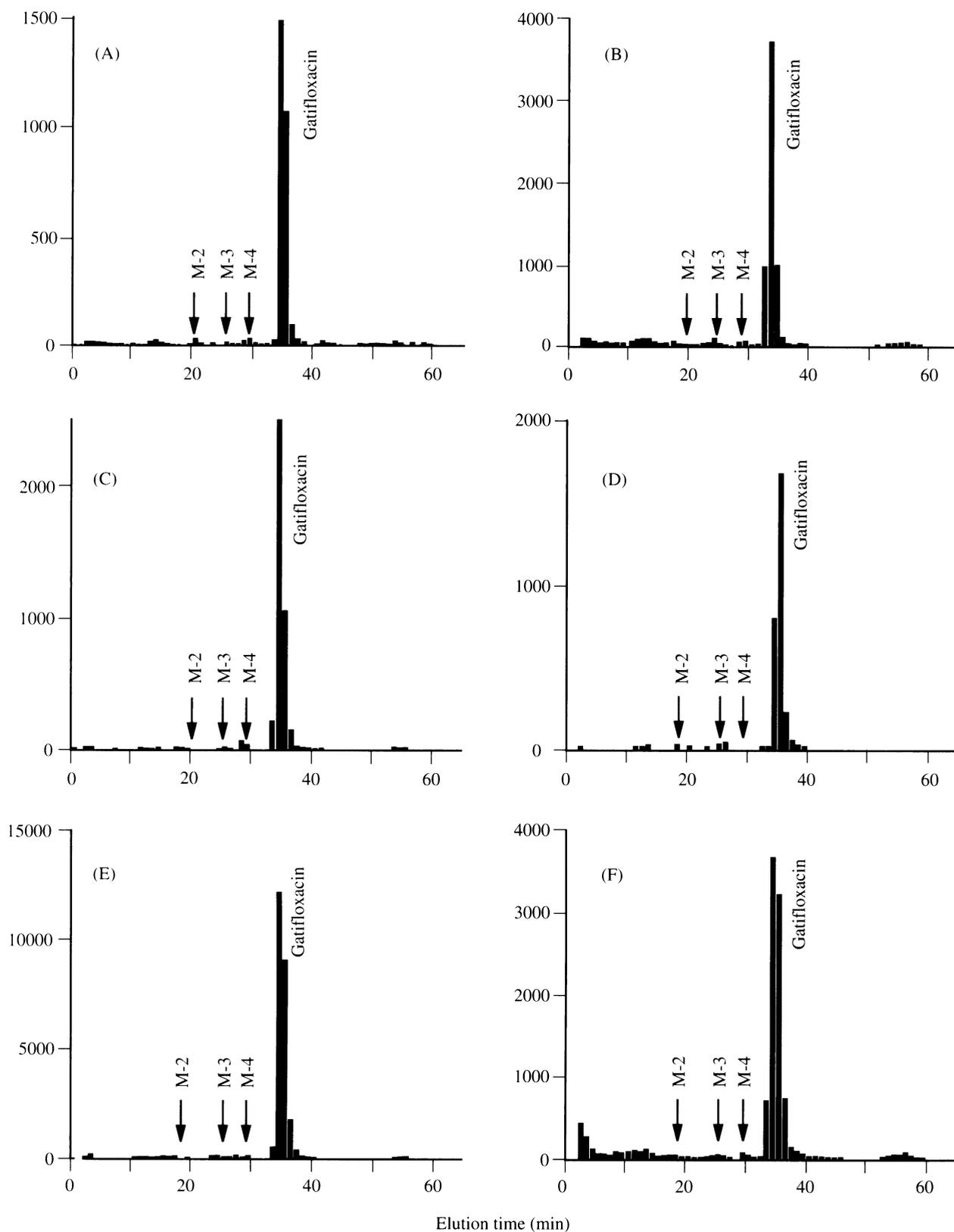


Fig. 7. Typical radiochromatograms of urine and feces collected for 24 h after oral administration of [^{14}C] gatifloxacin (10 mg/kg) to rats, rabbits and dogs [Solvent 3].
 (A) Rat urine treated with 1 M NaOH, (B) untreated rat feces, (C) rabbit urine treated with 1 M NaOH, (D) untreated rabbit feces, (E) dog urine treated with 1 M NaOH, (F) untreated dog feces

Table 4. Excretion of gatifloxacin and its metabolites in urine up to 24 h after oral administration of [¹⁴C] gatifloxacin (10 mg/kg) to laboratory animals

Species	Form	Excretion of radioactivity (% of dose)			
		Gatifloxacin	M-2	M-3	M-4
Rat	Unconjugate	29.4 ± 9.4 (86.7 ± 2.9)	0.1 ± 0.1 (0.3 ± 0.3)	0.3 ± 0.2 (0.8 ± 0.4)	0.3 ± 0.1 (1.0 ± 0.5)
	Conjugate	1.2 ± 2.1 (2.6 ± 4.5)	0.2 ± 0.1 (0.7 ± 0.4)	0.1 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	0.3 ± 0.1 (1.1 ± 0.4)
Rabbit	Unconjugate	29.2 ± 6.1 (87.6 ± 2.2)	0.1 ± 0.1 (0.2 ± 0.1)	0.1 ± 0.0 (0.3 ± 0.2)	0.3 ± 0.1 (1.1 ± 0.2)
	Conjugate	1.0 ± 0.8 (3.2 ± 3.1)	0.1 ± 0.2 (0.4 ± 0.4)	0.2 ± 0.1 (0.6 ± 0.3)	0.4 ± 0.1 (1.2 ± 0.1)
Dog	Unconjugate	43.9 ± 5.4 (90.4 ± 0.3)	0.2 ± 0.1 (0.3 ± 0.1)	0.2 ± 0.1 (0.4 ± 0.3)	0.2 ± 0.1 (0.4 ± 0.2)
	Conjugate	1.6 ± 0.3 (3.3 ± 0.9)	0.1 ± 0.1 (0.3 ± 0.1)	0.4 ± 0.2 (0.7 ± 0.4)	0.4 ± 0.1 (0.8 ± 0.1)

Each value represents the mean and SD of three animals.

Values in parentheses represent the percent of total radioactivity in the samples.

Table 5. Excretion of gatifloxacin and its metabolites in feces up to 24 h after oral administration of [¹⁴C] gatifloxacin (10 mg/kg) to laboratory animals

Species	Excretion of radioactivity ¹⁾ (% of dose)			
	Gatifloxacin	M-2	M-3	M-4
Rat	51.0 ± 12.9 (76.8 ± 4.4)	1.0 ± 0.1 (1.6 ± 0.3)	1.5 ± 0.2 (2.3 ± 0.5)	0.9 ± 0.4 (1.4 ± 0.3)
Rabbit	45.8 ± 5.3 (90.8 ± 2.8)	0.5 ± 0.0 (0.9 ± 0.1)	0.9 ± 0.5 (1.7 ± 0.8)	0.2 ± 0.2 (0.3 ± 0.3)
Dog	17.2 ± 3.8 (78.8 ± 3.4)	0.2 ± 0.1 (0.7 ± 0.4)	0.2 ± 0.1 (1.1 ± 0.2)	0.2 ± 0.1 (1.0 ± 0.2)

Each value represents the mean and SD of three animals.

Values in parentheses represent the percent of total radioactivity in the samples.

¹⁾ Unconjugate forms of gatifloxacin and its metabolites

はピペラジン環のオキソ体タイプの代謝物も認められず、ピペラジン環の開裂と、酸化的分解の進行したエチレンジアミノ基、2-メチルエチレンジアミノ基およびアミノ基を有するタイプの代謝物のみが認められている⁸⁻¹⁰⁾。これは3位メチル基による立体障害によりピペラジン環のN-アシル化が制限され、また酸化開裂部位が限定されることによるものと思われる。さらに、ピペラジン環の3および5位にメチル基を導入した sparfloxacin (SPFX) ではピペラジン環の開環したタイプの代謝物は認められず、ピペラジン環の安定性にその置換基の存在が大きく寄与

すると考えられている¹¹⁾。3-メチルピペラジン環を有する GFLX で今回認められた M-2、M-3 および M-4 の構造は、LFLX⁸⁾、TMFX⁹⁾、GPFX¹⁰⁾ で同定された代謝物と同じタイプのものであり、これらは共通の代謝過程を経るものと考えられた。¹⁴C GFLX を経口投与した実験動物の尿および糞中へ排泄された放射能の中で、これらピペラジン環が代謝をうけた代謝物 (M-2、M-3 および M-4) が占める割合は、ラットで4.7%、ウサギで3.3%、イヌで3.0%であった。このことから GFLX の代謝排泄過程において、ピペラジン環の代謝反応が占める割合は

Table 6. Excretion of gatifloxacin and its metabolites in urine, bile and feces up to 24 h after oral administration of [¹⁴C] gatifloxacin (10 mg/kg) to rats

Sample	Form	Excretion of radioactivity (% of dose)			
		Gatifloxacin	M-2	M-3	M-4
Urine	Unconjugate	29.7 ± 4.5 (76.1 ± 10.0)	0.3 ± 0.1 (0.7 ± 0.2)	0.5 ± 0.1 (1.3 ± 0.3)	0.2 ± 0.1 (0.5 ± 0.2)
	Conjugate	4.8 ± 3.2 (12.3 ± 7.6)	0.3 ± 0.3 (0.7 ± 0.7)	0.6 ± 0.3 (1.5 ± 0.5)	0.5 ± 0.2 (1.2 ± 0.4)
Bile	Unconjugate	7.7 ± 2.4 (17.6 ± 4.9)	0.2 ± 0.2 (0.5 ± 0.5)	0.7 ± 0.2 (1.7 ± 0.1)	0.0 ± 0.0 (0.0 ± 0.0)
	Conjugate	23.6 ± 4.5 (53.8 ± 3.7)	1.7 ± 0.6 (3.8 ± 1.3)	0.7 ± 0.2 (1.6 ± 0.6)	1.7 ± 0.3 (4.0 ± 0.6)
Feces	Unconjugate	6.9 ± 2.3 (50.7 ± 9.7)	0.4 ± 0.0 (3.4 ± 0.6)	0.5 ± 0.1 (4.0 ± 0.6)	0.2 ± 0.1 (1.2 ± 0.3)

Each value represents the mean and SD of three animals.

Values in parentheses represent the percent of total radioactivity in the samples.

Table 7. Antibacterial activity of gatifloxacin and its metabolites

Organisms	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Gatifloxacin	M-2	M-3	M-4
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0.05	1.56	1.56	3.13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IID 866	0.10	1.56	1.56	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> IID 552	0.39	6.25	12.5	> 100
<i>Streptococcus pyogenes</i> IID 692	0.39	12.5	12.5	> 100
<i>Enterococcus faecalis</i> IID 682	0.39	6.25	12.5	> 100
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	≤ 0.0063	0.20	0.39	0.20
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3167	0.0125	0.20	0.20	0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> IID 977	0.05	0.78	1.56	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	1.56	6.25	25	100
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GIFU 2491	0.20	25	25	12.5

僅かと考えられた。

ピペラジン環の開裂に伴う他の代謝物として、LFLXでは7位にカルボキシエチル・エチレンジアミノ基またはカルボキシメチル・プロパンジアミノ基を持つ化合物が同定されている⁶。GFLXの代謝物として、同様の置換基を有する代謝物の存在の有無を検討するため、合成代謝物標品と未同定放射能分画のHPLC保持時間を比較した。^{[14}C] GFLXを経口投与したラット、ウサギ、イヌの尿および糞抽出物ならびにラットから採取した胆汁のラジオクロマトグラム(条件3)上、相当する保持時間に微量の放射能分画が認められたが、その量は他の放射能分画と比較して僅かであり、構造を推定するには至らなかった。

^{[14}C] GFLXを経口投与したラットから採取した胆汁中の放射能は、その54%がGFLXのエステル型グルクロン酸抱合体として存在した。グルクロン酸抱合体の生成は、enoxacin⁴⁾, NFLX⁶⁾, LFLX⁸⁾, TMFX⁹⁾, GPFX¹⁰⁾, SPFX¹¹⁾, OFLX¹²⁾ およびtosufloxacin¹³⁾ など多くのキノロン系抗菌薬で報告されており、共通の代謝経路といえる。胆汁中のGFLXのグルクロン酸抱合体は β -glucuronidase処理で容易に加水分解を受けたこと、さらに、ラット糞中に抱合体相当の代謝物分画が認められなかったことから、胆汁中に存在する抱合体は腸内細菌叢により腸管内で加水分解を受けてGFLXを生成し、これが腸肝循環するものと考えられた。

ラット、ウサギおよびイヌの尿中の放射能は、そのほ

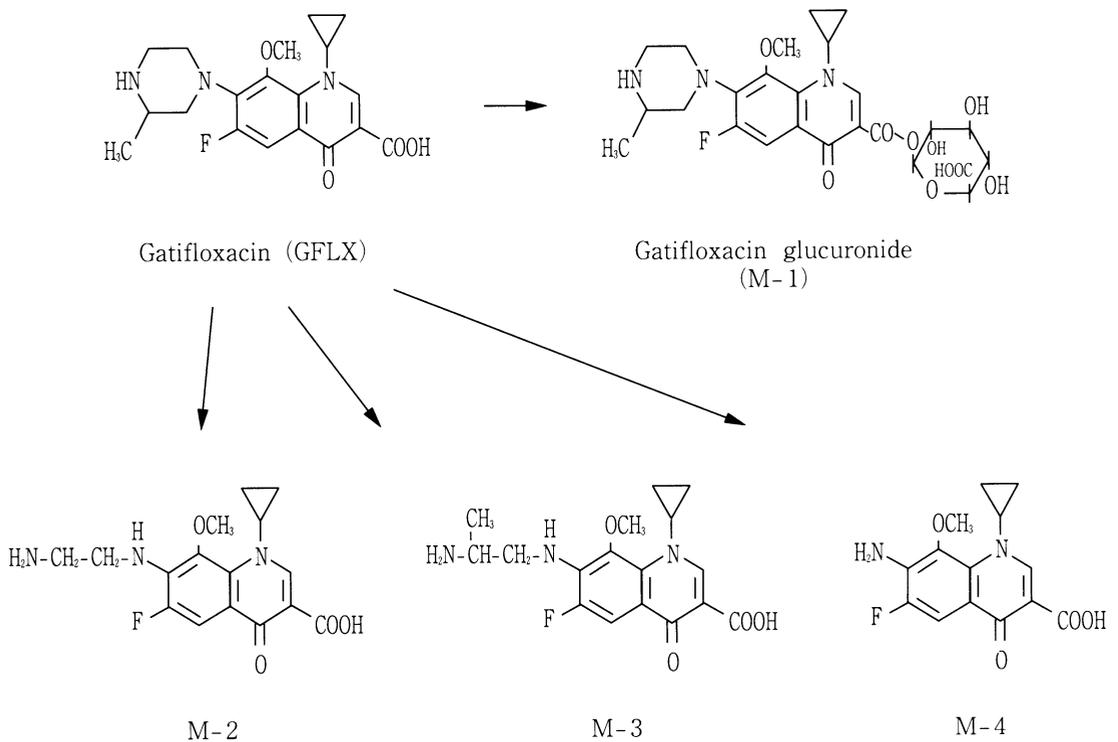


Fig. 8. Identified metabolites of gatifloxacin in rats, rabbits and dogs.

とんどがGFLXとして存在し、次にM-1が多く存在した。尿中に存在するM-1のGFLXに対する割合は、いずれの種においても3~4%であり、胆汁と比較すると極く少量であった。一方、GFLXと同じく3-メチルピペラジン環を側鎖に有するTMFXおよびGPFXでは微量のN-sulfateが主として胆汁中から同定されている^{9,10}。さらに、GPFXではヒトおよびサル尿中から、ピペラジン環4位の窒素が抱合をうけたN-glucuronideの存在が報告されている¹⁰。しかし、GFLXではこれらに相当する代謝物を見出すことはできなかった。

各種動物で、経口投与後24時間までに尿および糞中へ排泄された放射能(総排泄量)の内、GFLXおよびM-1の占める割合は、ラットで82%、ウサギで91%、イヌで89%を示した。また¹⁴C GFLXを投与したラット血清中では、その放射能のほとんどが未変化体として存在したことを考慮すると、これらの動物種においてGFLXは主に未変化体として体内に存在していることが示唆された。代謝物のM-2、M-3およびM-4の抗菌活性は、多くの菌種でGFLXの1/4から1/256以下であり、これら微量の代謝物が*in vivo*抗菌活性に関与する可能性は低いと思われる。

以上、GFLXは各種動物において代謝を受けにくく、その強い抗菌活性¹⁾とあわせて、化学療法剤としての有用性を示唆するものであった。

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) 出澤 彰, 伊澤 成, 小関 望, 他: [¹⁴C] Gatifloxacinのラットにおける単回経口投与時の吸収, 分布, 排泄。日化療会誌 47 (S-2): 131~140, 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. 各種動物における体内動態。日化療会誌 47 (S-2): 112~123, 1999
- 4) 関根 豊, 山口俊和, 宮本美枝, 他: 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
- 5) MIC測定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 6) 永津芳雄, 遠藤恭平, 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
- 7) Gau W, Kurz J, Petersen U, et al.: Isolation

- and structural elucidation of urinary metabolites of ciprofloxacin. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 36: 1545~1549, 1986
- 8) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 他: 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。 *Chemotherapy* 36 (S-2): 174~187, 1988
- 9) 河野通弘, 児玉裕彦, 遠藤美香, 他: [^{14}C] Temafloxacinのラットにおける代謝物の単離, 同定および定量。 *Chemotherapy* 41 (S-5): 164~176, 1993
- 10) 秋山 仁, 小池正己, 急式和代, 他: Grepafloxacinの体内動態 (IV), ラット, サルおよびヒトにおける代謝。 *日化療会誌* 43 (S-1): 131~149, 1995
- 11) 山口俊和, 横川真喜子, 坂下素子, 他: Sparfloxacinのラット, イヌ, サル, ヒトにおける代謝。 *薬物動態* 6: 21~32, 1991
- 12) Sudo K, Okazaki O, Tsumura M, et al.: Isolation and identification of metabolites of ofloxacin in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica*, 16: 725~732, 1986
- 13) 田井 賢, 小西義憲, 杉本由美子, 他: 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* 42: 868~875, 1989

Structural elucidation and quantification of metabolites of gatifloxacin a new quinolone, in rats, rabbits, and dogs

Tsuyoshi Ooie, Hideo Hashimoto, Youko Tsurumaki,
Masakatsu Komuro, Fukutaro Taga and Hideo Ohkubo

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun,

Tochigi 329-0114, Japan

We investigated the metabolism of gatifloxacin (GFLX), a new quinolone, in rats, rabbits, and dogs. The results were as follows:

1. We identified an unchanged drug, an ester-type glucuronide of GFLX (M-1) and three metabolites possessing cleaved 3-methylpiperazinyl moiety, -ethylenediamine (M-2), 2-methylethylenediamine (M-3) and amino (M-4) forms, in rat bile and urine collected after oral administration of GFLX.

2. The radioactivity excreted from the body amounted to 99.9%, 83.6% and 70.5% of the dose up to 24 h following oral administration of ^{14}C -labelled GFLX (^{14}C GFLX) in rats, rabbits, and dogs, respectively. The respective urine-to-feces excretion ratios of radioactivity were 34:66, 40:60, and 69:31.

3. GFLX accounted for about 90% of the total radioactive excreta in urine of rats, rabbits, and dogs. In addition, 3% of M-1, 1% to 2% of M-4, and 1% each of M-2 and M-3 were also detected. No marked species differences were found in the metabolic profiles of GFLX in urine. Furthermore, most of the radioactivity in feces of these animals was unchanged GFLX. One to two percent each of the total fecal radioactivity was also excreted as M-2, M-3, and M-4.

4. In bile-duct-cannulated rats, 96.1% of the total radioactivity was excreted from the body up to 24 h following oral administration of ^{14}C GFLX. The excretion ratios of radioactivity in urine, bile and feces were 41:45:14, respectively. In rat bile, 54% of M-1, 18% of GFLX, and also small amounts of M-2, M-3 and M-4 were quantitated.

5. GFLX and M-1 accounted for 82%, 91% and 89% of the total radioactivity in 24 h urine and feces following oral administration of ^{14}C GFLX in rats, rabbits, and dogs, respectively.

6. Radioactivity in serum existed mostly as an unchanged form following oral administration of ^{14}C GFLX in rats.

7. The *in vitro* antibacterial activity of M-2, M-3 and M-4 against a number of reference strains were 4 to 256 times less active than that of GFLX.