

新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin のラットにおける吸収特性

草嶋久生*・石田了三・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) のラット消化管からの吸収特性について、*in situ* ループ法により検討した。

1. GFLXは十二指腸、空腸、回腸及び結腸から良好に吸収されたが、胃からの吸収は少なかった。
2. GFLXは空腸及び回腸から速やかに吸収され、組織中における蓄積は少なかった。
3. 種々の新キノロン薬の空腸ループからの吸収率は、脂溶性の高いものほど高値を示した。GFLXは fleroxacin, ofloxacin, sparfloxacin と同様にほぼ完全に吸収された。
4. GFLXの空腸ループからの吸収は、高濃度のアミノ酸及びペプチドによる阻害を受けなかった。一方、小腸においてジペプチドに特異的な担体により輸送を受けるとされる cephalexin の吸収は、glycine により阻害されなかったが、glycylglycine により阻害された。このことから GFLX の小腸における吸収には、アミノ酸またはペプチド輸送担体を介する能動輸送系は関与しないものと考えられた。

Key words : gatifloxacin, 吸収, ラット, ループ法

Gatifloxacin (GFLX) は、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対し、強い活性と幅広いスペクトルを有する新規のフルオロメトキシキノロン抗菌薬である¹⁾。同系薬の消化管における膜透過には、受動輸送に加え、アミノ酸またはジペプチド輸送担体を介する能動輸送系も一部関与し^{2,3)}、これにより各種新キノロン薬間でみられる経口吸収性の相違を説明することができるとの報告⁴⁾がなされている。一方、新規の同系薬である GFLX は、ヒト及び各種の実験動物において良好に吸収されることが知られている^{5,7)}。そこで本薬物の吸収特性を明らかにし、良好な吸収性の原因を解明することを目的として、消化管からの吸収部位、吸収速度、類薬との吸収性比較、並びに吸収機序について、ラットを用い *in situ* ループ法により検討した。

1. 材料及び方法

1. 被験薬物及び試薬

GFLX (1/2 水和物: Lot No. G065321 及び G955320) は杏林製薬(株)で合成した。対照薬とした norfloxacin (NFLX), ciprofloxacin (CPFX), enoxacin (ENX), fleroxacin (FLRX), ofloxacin (OFLX) 及び sparfloxacin (SPFX), 並びに分析時の内標準として用いた pipemidic acid (PPA), AM-1587 [1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methoxy-7-(cis-3,

5-dimethyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid] 及び AM-1202 [(±)-1-cyclopropyl-7-(3-ethylaminomethyl-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid] は、杏林製薬で合成または市販の製剤から抽出、精製したものを使用した。同じく対照薬とした cephalexin (CEX) は Sigma Chemical Co. から購入した。吸収阻害薬として用いた、glycine (Gly) 及び L-phenylalanine (L-Phe) は日本理化学薬品(株)から、glycylglycine (GlyGly) は Sigma Chemical Co. から、L-phenylalanylglycine (L-PheGly) はフナコシ(株)から、glycylglycylglycine (GlyGlyGly) は関東化学(株)からそれぞれ購入した。アセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用のものを、その他の試薬は全て市販の特級品を使用した。使用した等張クエン酸緩衝液 (pH 2.0) は、0.263M クエン酸水溶液と 0.123M Na₂HPO₄ 水溶液を、また等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) は 0.163M NaH₂PO₄ 水溶液と 0.123M Na₂HPO₄ 水溶液を、それぞれ適当に混合して調製した。

2. 実験動物

Wistar 系雄性ラットを(株)日本医科学動物資材研究所から購入し、1週間以上の予備飼育後に試験に供した。これら実験動物は試験前24時間を絶食としたが、飲料水

は自由に与えた。試験時において、動物は7~9週齢、その体重は164~282gであった。

3. 胃腸管ループを用いる *in situ* 吸収実験

1) 吸収部位

ラットをペントバルビタール・ナトリウム (30~40mg/kg, ip) 麻酔下、腹部正中線にそって開腹し、総胆管を結紮した。次に胃腸管に約5cmのループを作製した。胃は噴門部から幽門部までの全部を、十二指腸は胃末端から5cmまでの部分を、空腸はTreitzの靱帯から10~15cmの部分を、回腸は回盲接合部から10~15cmの部分を、結腸は同じく5~10cmの部分をそれぞれ結紮した。GFLXを1.5mMの濃度で、胃ループへは等張クエン酸緩衝液 (pH 2.0) に溶解し、それ以外のループへは等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、それぞれ0.2mLをラット各4例のループ内に注入した。1時間後に、胃腸管ループ内の薬物を水、ついで0.01M塩酸で洗浄し、全量を50mLとした。また、洗浄後のループを採取した。

2) 吸収速度

GFLXを1.5mMの濃度で等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、上記同様に作製したラット各4例の空腸及び回腸ループ内にそれぞれ0.2mLを注入した。次いで、0.25, 0.5及び1時間後にループ洗浄液及びループ組織を採取した。

3) 類薬との吸収性比較

類薬として、NFLX, CPF, ENX, FLRX, OFLX及びSPFXを用いた。これらをそれぞれ等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) に1.5mMの濃度で溶解し、上記同様に作製したラット各4例の空腸ループ内に0.2mLを注入した後、1時間でループ洗浄液を採取した。

4. 空腸ループを用いる *in situ* 吸収阻害実験

ラット (1群4~10例) の空腸ループを上記同様に作製した。GFLX及びCEXそれぞれのコントロール群では、薬物を0.5mMの濃度で等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、その0.2mLをループ内に注入した。薬物の吸収に対する各種阻害薬の影響を検討するため、GFLX投与群については薬液中にさらに50または125mMのアミノ酸 (Gly, L-Phe), ジペプチド (GlyGly, L-PheGly), またはトリペプチド (GlyGlyGly) を、CEX投与群については125mMのGlyまたはGlyGlyをそれぞれ添加し、これらを同様に注入した。30分後に、空腸ループ内をGFLX投与群では水、ついで0.01M塩酸で、またCEX投与群では生理食塩水でそれぞれ洗浄し、全量を50mLとした。また、洗浄後のループを採取した。

5. 分析方法

採取した試料は分析時まで-20℃以下で保存した。

1) ループ洗浄液中GFLX及び類薬濃度

ループ洗浄液各0.1mLに内標準溶液 (GFLXにはAM-1587, SPFXにはGFLX, その他の薬物にはPPA, い

ずれも6nmol/mL) 0.1mLを加え混合した後、その一部 (50 μ L) をオートインジェクターによりHPLCシステム (島津 LC-6AまたはLC-10AS) に注入した。分析カラムとしてはTSKgel ODS-80T_v (粒子径5 μ m, 内径4.6 mm \times 150mm, 東ソー) を用い、これに同じゲル (粒子径10 μ m) を充填したガードカラム (内径4.0mm \times 10mm) を装着した。分析中、カラムはカラムオープンにより40℃に保持した。移動相はアセトニトリルと0.01Mリン酸の混合液を用い、その組成比はGFLX及びSPFXでは18:82, その他の薬物では15:85 (いずれも容積比) として、流速1.0mL/分で送液した。検出は波長を各薬物の極大UV吸収波長 (270~298nm) に設定したUVモニターにより行い、その出力をクロマトデータ処理装置により記録した。検量線は、同様に処理した標準検体の薬物濃度とクロマトグラム上における薬物の内標準に対するピーク高さ比から最小二乗法により求めた。試験検体中の薬物濃度は、そのピーク高さ比を検量線に代入することにより算出した。

2) ループ組織中GFLX濃度

ループ組織に1/15Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 5または10mLを加えてホモジナイズした後、その遠心上清について既報のカラムスイッチングHPLC法⁶に準じて分析した。内標準にはAM-1202を用い、蛍光モニターを装備したHPLCシステム (島津LC-6A) を使用した。

3) ループ洗浄液及び組織中CEX濃度

ループ洗浄液は100 μ Lをそのまま、ループ組織は、上記同様に処理した組織ホモジネート上清に同量のメタノールを加え除蛋白した上清20 μ Lを、それぞれHPLCシステム (島津LC-10ASまたは日立655A) に注入した。分析カラム及びガードカラムは、先のGFLXの分析で使用したのと同じものを使用した。分析は室温で行い、移動相としてアセトニトリル/0.01M酢酸アンモニウム (10:90, 容積比) を用い、これを1.0mL/分で送液した。検出波長は254nmとした。検量線は、試験検体と同様に処理した、標準検体の薬物濃度とクロマトグラム上における薬物のピーク面積から最小二乗法により求めた。これに各試験検体のピーク面積を代入することによりその濃度を算出した。

6. 見かけの分配係数の測定

GFLX及び類薬 (NFLX, CPF, ENX, FLRX, OFLX, SPFX) の脂溶性の指標として、クロロホルムと等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) との間で見かけの分配係数を測定した。各薬物を0.1mMの濃度で等張リン酸緩衝液に溶解し、その5または10mLにクロロホルム 2または10mLを加え、37℃で2時間振盪した (80ストローク/分)。クロロホルム及び緩衝液はあらかじめ他方の相で飽和させたものを使用した。振盪終了後、水相の一部をとり、これに0.1M塩酸を加えて5倍希釈した。次に、各

薬物のUV吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度を分光光度計により測定し、水相中薬物濃度を求めた。振盪前後の水相中濃度をそれぞれ C_i 及び C_w とし、緩衝液及びクロロホルムの容量をそれぞれ V_w 及び V_o として、見かけの分配係数 $\log P'$ を次式により算出した。なお、 $0.1 < (C_i - C_w) / C_w < 10$ となるように V_w / V_o を調整した。

$$\log P' = \log \left[\frac{C_i - C_w}{C_w} \cdot \frac{V_w}{V_o} \right]$$

7. 解析方法

結果は平均値±標準偏差として示した。薬物の投与量とループ内残存量の差をループからの吸収量、ループからの吸収量と組織中残存量の差を血中移行量とした。

GFLX及びCEXの空腸ループからの吸収率に対する阻害薬の影響について統計学的解析を行った。すなわち、コントロール群と各阻害薬添加群の薬物吸収率、組織中残存率及び血中移行率について、まず一元配置分散分析による検定を行い、さらにDunnett法により多重比較を行った。有意水準は5%とした。

II. 結果及び考察

1. 吸収部位

GFLXを投与後1時間における、ラット胃腸管ループからの吸収率及びループ組織中残存率をFig. 1に示す。胃、十二指腸、空腸、回腸及び結腸ループからの吸収率はそれぞれ、6.9, 89.1, 92.2, 62.9, 42.9%であった。組織中残存率は1.8~6.2%と少なく、血中移行率はそれぞれ3.7, 87.3, 88.8, 58.8, 36.6%であった。このことから、本薬物は十二指腸、空腸、回腸及び結腸から良好

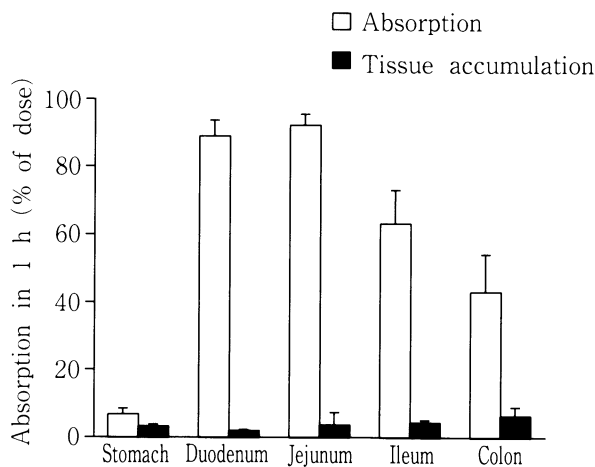


Fig. 1. Absorption of gatifloxacin in rats with gastrointestinal loops.
Concentration of gatifloxacin: 1.5 mM
Mean ± SD (n=4)

に吸収されるが、胃からの吸収は少ないものと考えられた。

2. 吸収速度

GFLX投与後1時間までの、ラット空腸及び回腸ループからの吸収率及びループ組織中残存率をFig. 2に示す。GFLXの空腸及び回腸からの吸収率は、時間の経過と共に増加し、1時間後にはその大部分が吸収された。また、組織中残存率は少なかった。

3. 類薬との吸収性比較

GFLX及び6種類の類薬を投与後1時間における、ラット空腸ループからの吸収率と脂溶性($\log P'$)との関係をFig. 3に示す。GFLX, NFLX, CPFX, ENX, FLRX, OFLX及びSPFXの吸収率は、それぞれ92.2, 20.5, 43.2, 72.6, 99.4, 92.1, 98.8%であった。種々の新キノロン薬の吸収率は、脂溶性の高いものほど高値であった。NFLX, CPFX, ENXの吸収は不完全であったのに対し、GFLXの吸収率はFLRX, OFLX, SPFXと同様に、90%以上を示した。このことはキノロン薬の吸収にはその脂溶性が重要であること、並びにGFLXの良好な吸収は適度の脂溶性によるものであることを示すものであった。

4. 吸収機序

GFLX及びCEXのラット空腸ループからの吸収に及ぼす、アミノ酸、ジペプチド及びトリペプチドの影響をTable 1に示す。コントロール群において、GFLX投与後30分までの吸収率及び組織中残存率はそれぞれ63.2, 5.4%であった。これらの値は、高濃度(50及び125mM)のアミノ酸(Gly, L-Phe)、ジペプチド(GlyGly, L-PheGly)、またはトリペプチド(GlyGlyGly)の添加により、いずれも変化しなかった。一方、今回対照薬とし

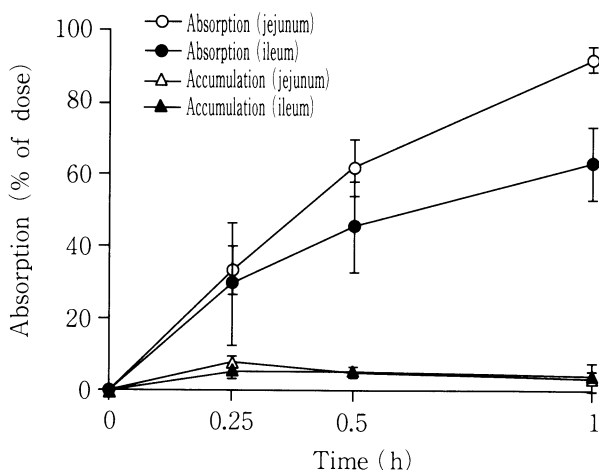


Fig. 2. Time course of intestinal absorption and tissue accumulation of gatifloxacin in rats with jejunum or ileum loops.
Concentration of gatifloxacin: 1.5 mM
Mean ± SD (n=4)

て用いたCEXは、小腸においてジペプチドに特異的な担体により輸送を受けるとされる。CEXの吸収率及び組織中残存率はコントロール群でそれぞれ80.6, 45.0%であり、文献値⁹⁾に一致した。これらの値は、125mM Glyの添加により変化しなかったが、125mM GlyGlyにより有意に減少し(それぞれ $P < 0.01$ 及び 0.05)、血中移行率にも減少傾向がみられた。アミノ酸及びペプチドによるGFLXの吸収阻害がみられなかったことから、その小腸における吸収には、これら輸送担体を介する能動輸送系は関与しないものと考えられた。

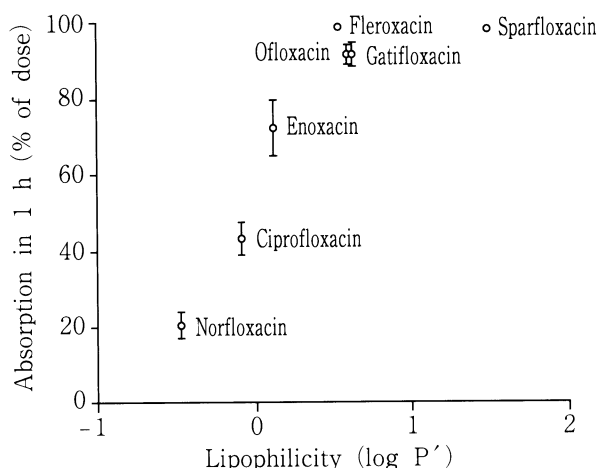


Fig. 3. Plot of intestinal absorption of gatifloxacin and six other quinolones in rats with jejunum loops against lipophilicity.

Concentration of drugs: 1.5 mM
log P': apparent partition coefficient between chloroform and isotonic phosphate buffer, pH 6.5, at 37 °C
Mean \pm SD (n=4)

以上、GFLXの高い消化管吸収性は、その適度な脂溶性に関連するもので、吸収は受動吸収によるものと推察された。

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) Yamaguchi T, Yokogawa M, Sekine Y, et al: Intestinal absorption behavior of quinolone antibacterial agents. Abstracts of 5th Japanese-American Conference on Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, abstract no P-42, Tokyo, 1990
- 3) 山口俊和, 横川真喜子, 関根豊, 他: Sparfloxacinの腸管吸収. *薬物動態* 6: 53~59, 1991
- 4) Aoki H, Tanaka M, Kurata T, et al: The absorption mechanism of levofloxacin (LVFX) in rat intestine. Program and Abstracts of 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstract no 664, Anaheim, 1992
- 5) Iseki K, Hirano T, Fukushi Y, et al: The pH dependent uptake of enoxacin by rat intestinal brush-border membrane vesicles. *J Pharm Pharmacol* 44: 722~726, 1992
- 6) Nakashima M, Uematsu T, Kosuge K, et al: Single- and multiple-dose pharmacokinetics

Table 1. Effects of amino acids, and di- and tri-peptides on intestinal absorption of gatifloxacin and cephalexin in rats with jejunum loops

Drug	Inhibitor	Concentration of inhibitor (mM)	n	Absorption from loop (% of dose)	Accumulation in tissue (% of dose)	Transport in blood (% of dose)	
Gatifloxacin	Control	—	10	63.2 \pm 9.2	5.4 \pm 0.7	57.8 \pm 9.7	
	Gly	50	5	66.1 \pm 8.8	4.2 \pm 0.4	61.9 \pm 8.8	
		125	5	61.5 \pm 4.9	5.9 \pm 0.6	55.6 \pm 4.4	
		125	5	63.6 \pm 7.7	5.4 \pm 0.8	58.2 \pm 8.1	
	GlyGly	50	5	72.0 \pm 7.4	4.6 \pm 0.6	67.4 \pm 7.8	
		125	5	66.0 \pm 10.0	5.7 \pm 0.4	60.3 \pm 10.3	
		125	5	70.7 \pm 5.9	5.8 \pm 1.7	64.9 \pm 5.8	
	GlyGlyGly	125	5	68.5 \pm 7.4	6.5 \pm 0.8	62.0 \pm 7.2	
Cephalexin		Control	—	5	80.6 \pm 5.4	45.0 \pm 5.3	35.6 \pm 9.3
		Gly	125	4	83.6 \pm 5.4	43.1 \pm 3.1	40.5 \pm 4.9
	GlyGly	125	4	63.0 \pm 7.5**	36.0 \pm 3.8*	27.0 \pm 4.0	

Concentration of drugs: 0.5 mM
Mean \pm SD

* Statistically different from the control group ($P < 0.05$)

** Statistically different from the control group ($P < 0.01$)

Abbreviations: Gly, glycine; L-Phe, L-phenylalanine, GlyGly, glycylglycine; L-PheGly, L-phenylalanyl-glycine; GlyGlyGly, glycylglycylglycine

- of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2635~2640, 1995
- 7) 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。日治療会誌 47 (S-2): 112~123, 1999
- 8) 草嶋久生, 草川 元, 石田了三, 他: 新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin の高速液体クロマトグラフィーによる体液内濃度測定法。日治療会誌 47 (S-2): 104~111, 1999
- 9) 椿 秀美, 駒井 亨: ¹²⁵I-標識セファトリジンをを用いたアミノセファロスポリンの腸管吸収機序の研究。薬物動態 2: 497~507, 1987

Absorption characteristics of gatifloxacin, a new quinolone, in rats

Hisao Kusajima, Ryoza Ishida, and Hideo Ohkubo

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

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

Tochigi 329-0114, Japan

The intestinal absorption characteristics of gatifloxacin (GFLX), a new fluoro-methoxy-quinolone, were investigated in rats using the *in situ* ligated loop method.

1. GFLX was absorbed well from duodenum, jejunum, ileum, and colon, but not from the stomach.
2. This drug was rapidly absorbed from jejunum and ileum, and tissue accumulation was minimal.
3. The absorption of quinolones from jejunum loops increased with the increase of lipophilicity. GFLX was completely absorbed in the same manner as fleroxacin, ofloxacin, and sparfloxacin.
4. The high concentrations of amino acids and peptides did not inhibit the absorption of GFLX from jejunum loops. On the other hand, the absorption of cephalixin, which was transferred by a dipeptide carrier-mediated system in the small intestine, was found to be inhibited by glycylglycine but not by glycine. This fact suggests that the common amino acid- or peptide-mediated active transport system dose contribute to the absorption of GFLX in the small intestine.