

フルオロキノロン剤の光毒性に関する新たな構造—毒性相関と光安定性について

林 則博

**New Findings on the Structure-Phototoxicity Relationship
and Photostability of Fluoroquinolones**

Norihiro HAYASHI

New Lead Pharmacology Laboratory, Institute for Medical Research, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., 1624 Shimokotachi, Koda-cho, Akitakata City 739-1195, Japan

(Received December 2, 2004)

The present study examined the phototoxicities of a series of 7-(3-aminopyrrolidinyl) quinolones containing various substituents at position 1 by use of a mouse model. For the 7-(3-aminopyrrolidinyl) quinolones with a halogen atom at position 8, well-known substituent groups such as a cyclopropyl, an ethyl, or a difluorophenyl at position 1 were found to be responsible for severe phototoxicity. However, when an aminodifluorophenyl or an isoxazolyl group was placed at position 1, even 8-halogeno quinolones were found to be mildly phototoxic. This is the first report of 8-halogeno quinolones that are not severely phototoxic. Two structurally similar 8-chloro quinolones (the 1-aminodifluorophenyl 8-chloro quinolone and the 1-difluorophenyl 8-chloro quinolone) were investigated further. The former was mildly phototoxic; the latter was severely phototoxic. We demonstrate that these two 8-chloro quinolones have practically the same areas under the concentration-time curves from 0 to 4 h in auricular tissue, suggesting that the mild phototoxicity is not due to pharmacokinetic instability. The rates of UV photodegradation of these compounds were also measured. We found that these two quinolones photodegrade at similar rates, suggesting that the mild phototoxicity is not attained through increased photostability. In conclusion, the phototoxic potentials of fluoroquinolones are influenced not only by the substituent at position 8 but also by that at position 1. We also discovered a mildly phototoxic 8-chloro quinolone which did not have increased photostability.

Key words—phototoxicity; photostability; fluoroquinolone**1. はじめに**

フルオロキノロン剤は、グラム陽性菌やグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを有する優れた抗菌剤であり、作用標的酵素は DNA gyrase 及び topoisomerase IV であることが明らかになっている。また、フルオロキノロン剤は、良好な経口吸収性と組織移行性により呼吸器、尿路、眼科領域、皮膚組織など全身部位での細菌感染症に使用できる抗菌剤として、 β ラクタム剤やアミノ配糖体と並び広く使用されている。本剤に関しては、現在まで構造—活性相関について多くの報告があり、^{1,2)} 1位にシクロプロピル基、7位に3-アミノピロリジニル基

で8位にフッ素や塩素のようなハロゲン原子が導入された化合物が、最も強い抗菌活性を有することが確認されている。特に、8位へのハロゲン原子の導入は抗菌活性の上昇、抗菌スペクトルの拡大に寄与し、さらに体内動態を改善することより *in vivo* 抗菌活性の亢進も見られる。

フルオロキノロン剤は、優れた感染症治療薬としての臨床的価値が高まり、使用頻度も上昇しているが、その一方で、いくつかの副作用が明らかになってきた (Table 1)。光毒性は薬剤性光線過敏症の1つであり、原因となる薬剤は種々報告されている。フルオロキノロン剤はその中の代表的な薬剤で、浮腫、発赤、水疱などの重篤な臨床像を示す場合があり、そのため、開発中止あるいは市販後の撤退や縮小を余儀なくされた薬剤も少なくない。したがって、現在では光毒性を発現しない、より安全性に優れた薬剤の開発が望まれている。

湧永製薬株式会社創薬研究所探索薬理研究室 (〒739-1195 安芸高田市甲田町下甲立 1624)

e-mail: hayashi_n@wakunaga.co.jp

本総説は、平成16年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Table 1. The Most Common Side Effects Associated with Fluoroquinolones

Photosensitivity, CNS effects, QT prolongation, Tendon disorders, Rhabdomyolysis, Hypoglycemia, Drug interaction (theophylline etc.)

薬剤による光毒性の発症機序は十分に解明されていないが、一般的には皮膚内に吸収された薬剤が光エネルギーによって光化学反応を起こし活性化された結果、毒性を獲得して組織を傷害すると考えられている。³⁾ 今までに開発された大部分のフルオロキノロン剤は、程度の差はあるが光毒性を誘発することが報告されている。^{1,2,4-8)} 特に、8位にハロゲン原子を有する誘導体は非常に強い光毒性を示し、ロメフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシン、クリナフロキサシンなどがこのグループに属している。また、これらの薬剤はUVA照射に対し不安定であることも報告されている。⁹⁻¹¹⁾ 一方、シプロフロキサシンやノルフロキサシンのように8位が無置換のフルオロキノロン剤の光毒性は弱い。^{1,2,6,12,13)} さらに、ガチフロキサシンやモキシフロキサシンなど8位にメトキシ基が導入されたフルオロキノロン剤は、その他の8位構造を有する薬剤に比べ光照射に対し安定であり光毒性も弱いことが証明された。^{6,12,14)} そのため、メトキシ基は光毒性を回避するために有効な置換基であると考えられるようになり、最近開発されているフルオロキノロン剤の多くは8位に本置換基を有している。したがって、フルオロキノロン剤の光毒性は8位置換基のみに依存し、その光安定性と相関していると考えられてきた。

2. フルオロキノロン剤の光毒性に対する1位及び8位置換基の影響

上述の光毒性に及ぼす置換基の影響や光安定性との相関で検討されているフルオロキノロンの大部分は、1位がシクロプロピル基又はエチル基に限定されており、その他の1位置換基に関する系統的な知見はほとんど報告されていない。また筆者らは、新規フルオロキノロン剤の探索過程において、1位にアミノジフルオロフェニル基、7位にアミノアゼチジン環を有する化合物は8位がハロゲン原子であっても、光毒性を全く発現しない、あるいは非常に弱いことを見出した。^{15,16)} すなわち、フルオロキノロ

ン剤の光毒性は8位の置換基のみに依存しているのではなく、光毒性発現については、1位置換基と8位置換基との組み合わせを考察すべきであると考えた。これらのことを確認するため、3種類の1位新規置換基（アミノジフルオロフェニル基、イソキサゾイル基、オキセタニル基）及び3種類の既知置換基（シクロプロピル基、エチル基、ジフルオロフェニル基）を用い、8位置換基（水素、フッ素、塩素）との組み合わせによる光毒性発現について検討を開始した。なお、今回の検討では1位と8位の影響のみを評価するため、7位はアミノピロリジン環に固定した。

光毒性試験はMarutaniらの方法¹⁷⁾及びWagaiらの方法^{18,19)}を参考にして実施した。すなわち、ICR系マウスの尾静脈より被験化合物を投与しUVAを4時間照射したのち、経時的に(0-168時間)各動物の耳の肉眼的観察を行い、その変化をスコア化した(0-3)。また、光毒性の程度の異なる化合物を同時に評価する際の最適な投与用量と観察時間を明らかにすることを目的とした予備検討を行った結果、投与量は40 mg/kgで評価可能であり、また、光毒性反応が経時的に増悪するのか、又は回復するのかはUVA照射直後と48時間後の観察で十分に把握することが可能であることが示された。

まず、本試験法を用いて既存フルオロキノロン剤の光毒性を測定した(Fig. 1, Table 2)。8位が水素のシプロフロキサシン、ノルフロキサシン及び1-8架橋構造のレボフロキサシンは、照射直後のみ軽度の光毒性が観察されたが、48時間後には完全に回復した。また、8位がメトキシ基のガチフロキサシンとモキシフロキサシンの場合では、耳の肉眼的変化は全く見られなかった。一方、8位にハロゲン原子を有する場合(ロメフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシン、クリナフロキサシン)では、他の薬剤と比較し非常に強い光毒性を示し、また、経時的に増悪しかつ不可逆的であった。いずれの薬剤も照射直後から中等度又は重度の紅斑を示し、照射48時間後で全例がスコア3になった。したがって、既存フルオロキノロン剤に関しては、8位へのハロゲン原子導入による光毒性増強作用と8位へのメトキシ基導入による光毒性低減作用が確認され、従来の構造-光毒性相関を裏付ける結果であった。

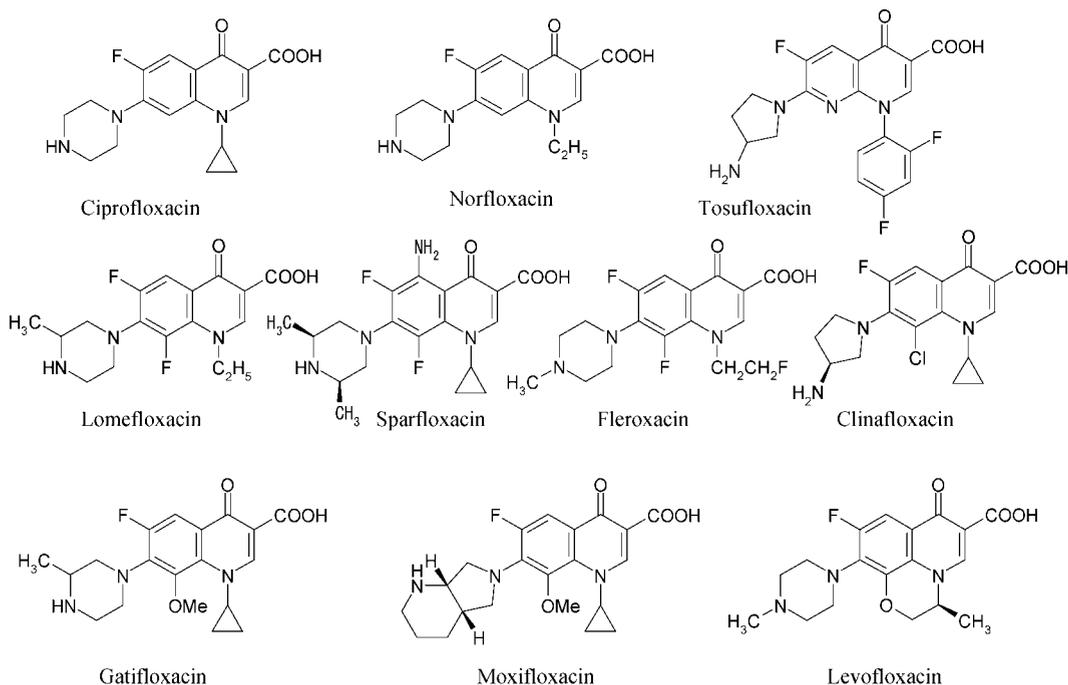


Fig. 1. Chemical Structures of Reference Quinolones

Table 2. The Phototoxicity in Mice Receiving Intravenous Administration of the Reference Fluoroquinolones

Compound ^{a)}	R8	No. of animals with the indicated score ^{b)} at:										
		0 h			48 h							
		0	1	2	3	0	1	2	3			
Vehicle		6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	Hydrogen	4	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Norfloxacin		4	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Tosufloxacin	(Naphthyridone)	0	0	6	0	4	2	0	0	0	0	0
Lomefloxacin	Halogen	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6
Sparfloxacin		0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	6
Fleroxacin		0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	6
Clinafloxacin		0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Gatifloxacin	Methoxy	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Moxifloxacin		6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Levofloxacin	1,8-bridge	5	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0

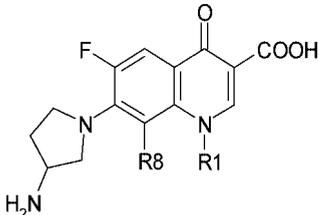
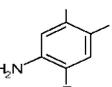
a) Each compound was administered at a dose of 40 mg/kg to six mice.

b) The ear redness of each mouse was scored as 0 for no erythema, 1 for mild erythema, 2 for moderate erythema, and 3 for severe erythema with edema.

ついで、7位をアミノピロリジン環に固定して種々の1位、8位置換基を導入した化合物の光毒性の結果をTable 3に示す。1位がシクロプロピル基及びエチル基の化合物は、8位にハロゲン原子が導入されると非常に強い光毒性を示し、照射直後から全例がスコア3であった(compound 1, 2, 4, 5)。ま

た、観察終了時には、耳や顔面の浮腫及び全身的な脱毛も見られた。さらに、8位が水素の場合でも照射直後から中等度の光毒性を示し、48時間後で全例がスコア3になった(compound 3, 6)。1位がイソキサゾイル基の場合、8位にハロゲン原子が導入されても照射直後にごく軽度の光毒性が観察されたのみで、48時間後には完全に回復した(compound 7)。一方、1位がオキセタニル基の場合、8位にハロゲン原子が導入されると照射直後から中等度の光毒性を示し経時的に増強したが(compound 9)、8位が水素では逆に経時的な光毒性の低減が観察された(compound 10)。1位がジフルオロフェニル基の場合ではオキセタニル基と同様に、8位にハロゲン原子が導入されると照射直後から中等度の光毒性を示し経時的に増強したが(compound 11, 12)、8位が水素では逆に光毒性の低減が観察された(compound 13)。これに対し、ジフルオロフェニル基にアミノ基を1つ導入したアミノジフルオロフェニル基を1位に有する化合物では、8位がハロゲン原子の場合でも光毒性は非常に弱く、照射直後に1/6例で軽度の耳の紅斑が観察されたのみであった(compound 14, 15)。このような変化も48時間後には完全に回復し、構造が類似しているジフルオロフェニル基の場合とは明らかに異なる挙動を示した。

Table 3. Phototoxicity of a Series of 7-(3-Aminopyrrolidinyl) Quinolones in Mice Receiving the Drugs Intravenously^{a)}

Basic structure	Compound No.	R1	R8	No. of animals	No. of animals with the indicated score ^{b)} at:							
					0 h				48 h			
					0	1	2	3	0	1	2	3
		Vehicle		6	6	0	0	0	6	0	0	0
	1		Cl	6	0	0	0	6	0	0	0	6
	2	CH ₃ CH ₂ -	F	6	0	0	0	6	0	0	0	6
	3		H	6	0	0	6	0	0	0	0	6
	4		Cl	6	0	0	0	6	0	0	0	6
	5		F	6	0	0	0	6	0	0	0	6
	6		H	6	0	0	6	0	0	0	0	6
	7		F	5	4	1	0	0	5	0	0	0
	8		H	6	5	1	0	0	6	0	0	0
	9		F	6	0	1	5	0	0	0	5	1
	10		H	6	1	4	1	0	2	3	1	0
	11		Cl	6	0	2	4	0	0	0	1	5
	12		F	6	0	0	6	0	0	0	0	6
	13		H	4	0	1	3	0	2	2	0	0
	14		Cl	6	5	1	0	0	6	0	0	0
	15		F	6	5	1	0	0	6	0	0	0
	16		H	4	3	1	0	0	4	0	0	0

^{a)} Each compound was administered at a dose of 40 mg/kg. ^{b)} The ear redness of each mouse was scored as 0 for no erythema, 1 for mild erythema, 2 for moderate erythema, and 3 for severe erythema with edema.

しかし、1位にジフルオロフェニル基又はアミノジフルオロフェニル基を有する化合物のこのような光毒性の顕著な差には、両化合物の耳組織への移行性が関与している可能性が考えられた。そこで、各1位置換基を有する化合物 (compound 11, 14) を用い、ICR系マウス静脈内に光毒性試験と同じ投与量である40 mg/kgを投与し、血清中及び耳組織中の濃度を経時的にHPLCを用いて測定した (Fig. 2)。しかし、両化合物のAUC_{0-4h}を比較すると、血清中が22.5 µg · h/ml, 26.3 µg · h/ml, 耳組織中が18.2 µg · h/g, 16.7 µg · h/gであった。したがって、両化合物の光毒性の結果は、耳組織中への移行性の違いに起因しているのではないことが示唆された。

以上の結果から、フルオロキノロン剤の光毒性は8位置換基のみではなく、1位置換基によっても大きな影響を受けていることが明らかになった。さらに、今までの構造—光毒性相関とは異なり、8位がハロゲン原子の場合でも光毒性が非常に弱いフルオロキノロン剤が存在することを初めて系統的に見出

すことができた。フルオロキノロン剤の8位ハロゲン原子は抗菌スペクトルの拡大や体内動態の改善に寄与していることが知られている。しかし、ハロゲン原子により強い光毒性が誘発されることが明らかにされたためドラッグデザインは大きく制限され、最近開発されたフルオロキノロン剤で8位にハロゲン原子を有するものはない。また、光毒性の発現を回避する置換基としてメトキシ基が見出されたが、本置換基が導入されたフルオロキノロン剤には、いくつかの問題点が指摘されている。^{20,21)} 今回の検討において、1位がアミノジフルオロフェニル基又はイソキサゾイル基の化合物は、8位にハロゲン原子が導入されても、臨床で最も安全性が高いと報告されているレボフロキサシンと同程度の光毒性であった。さらに、これらの置換基を有する化合物の抗菌活性は非常に強いことも確認されている。したがって、アミノジフルオロフェニル基やイソキサゾイル基のような1位置換基の発見は、8位がハロゲン原子で優れた抗菌活性を持ち、かつ光毒性の弱い、新しいタイプのフルオロキノロン剤のデザインに寄与

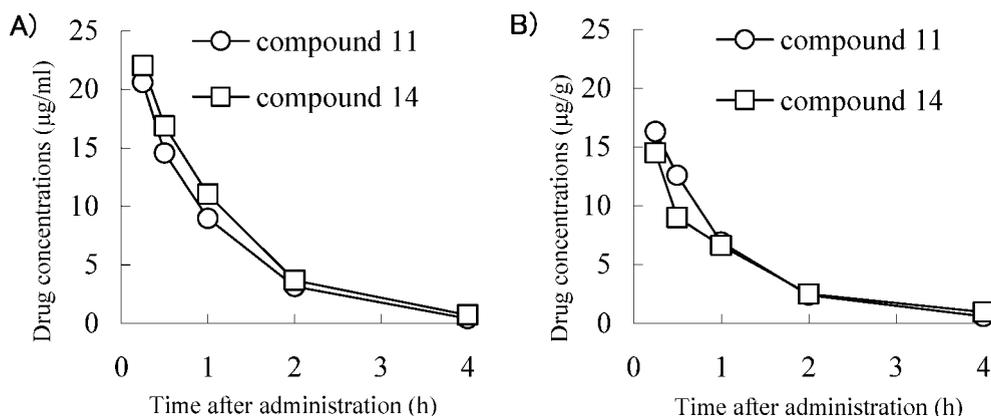


Fig. 2. Pharmacokinetics of the 1-Difluorophenyl 8-Chloro Quinolone (Compound 11) and the 1-Aminodifluorophenyl 8-Chloro Quinolone (Compound 14) in the Sera (A) and Ears (B) of Mice to which FQs were Administered Intravenously (40 mg/kg)

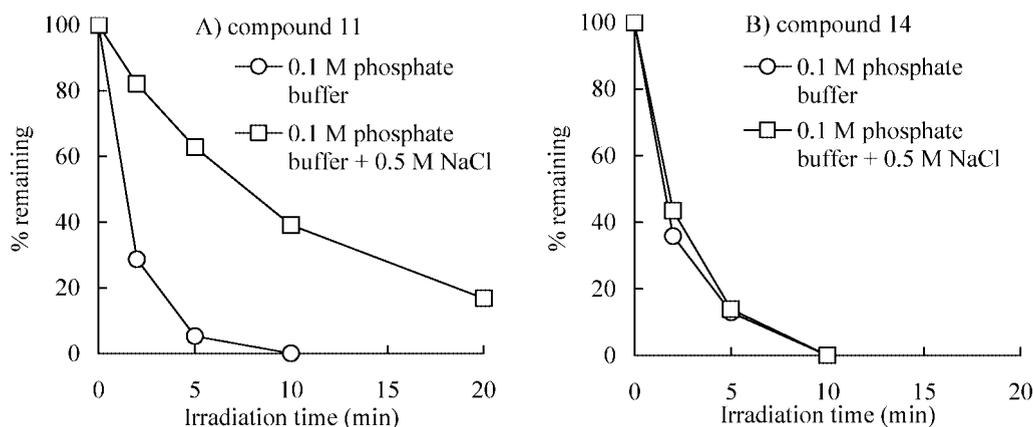


Fig. 3. Photodegradation of the 1-Difluorophenyl 8-Chloro Quinolone (Compound 11, A) and the 1-Aminodifluorophenyl 8-Chloro Quinolone (Compound 14, B) in 0.1 M Phosphate Buffer in the Presence or Absence of Excess Chloride Ions

するものと考えられる。

3. フルオロキノロン剤の光毒性と光安定性との相関

前述のように、フルオロキノロン剤の光毒性は、UVA に対する光安定性と相関があることが報告されている。そこで、1 位にジフルオロフェニル基又はアミノジフルオロフェニル基を有する化合物（8 位塩素）（compound 11, 14）を用いて、水溶液状態における両化合物の UVA 照射に対する経時的な残存率の変化について検討した。Figure 3 に示すように、両化合物とも UVA 照射により迅速に分解され、そのパターンは同様であった。また、照射 10 分後に両化合物とも原体の消失を確認した。したがって、光毒性の強弱は UVA 安定性とは相関しないことが示唆された。Araki らは 8 位塩素のキノロンを用い、UVA 照射により C-Cl 結合が解離するこ

とで 8 位に carbon centered radical ($\cdot C$) が形成されること、その際溶液中に過剰量の塩化物イオンが存在すると、8 位の $\cdot C$ と Cl イオンが直ちに反応することを報告した。²²⁾ その結果、再度 C-Cl 結合が生じ、見かけ上の光安定性は向上する。そこで、1 位にジフルオロフェニル基又はアミノジフルオロフェニル基を有する化合物（8 位塩素）を用い、溶液中に過剰量の塩化物イオン（0.5 M NaCl）を加えた条件下における光分解性を調べた。1 位にジフルオロフェニル基が導入されたキノロンの場合（compound 11）、溶液中に過剰量の塩化物イオンが存在すると、UVA 照射に対する分解は非存在下と比較明らかに抑制されていた。これに対し 1 位にアミノジフルオロフェニル基が導入された場合（compound 14）では、光分解に対する塩化物イオンの影響は全く見られなかった。したがって、両化

化合物の塩化物イオン存在下及び非存在下における光分解パターンの違いが、光毒性の強弱に反映していることが示唆された。また、1位にアミノジフルオロフェニル基が導入された化合物の場合、UVA照射により8位に形成された・Cは過剰量の塩化物イオンよりも1位のアミノジフルオロフェニル基と優先的に結合しているのではないかと考えている。8位に形成された・Cは最終的には生体に対し傷害となる、すなわち炎症を惹起するいくつかの反応を誘導すると推測される。つまり、本化合物では分子内でのスカベンジャー作用により迅速に・Cを消去することで、光毒性に対する防御機構を発揮しているのではないかと考えられる。1位がイソキサゾイル基の化合物に関してはこのような検討を行っていないが、恐らく同様のメカニズムにより光毒性が低減しているのではないかと予想される。

4. おわりに

本研究にて、フルオロキノロン剤の光毒性は8位置換基のみではなく、1位置換基との組み合わせによって影響を受けていることが明らかになった。特に、新規1位置換基であるアミノジフルオロフェニル基及びイソキサゾイル基の発見により、8位がハロゲン原子でありながら光毒性が弱い新しいタイプのフルオロキノロン剤のデザインが可能になった。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、有益なご討論とご支援をいただきました湧永製薬創薬研究所 矢崎 明所長、橋本 健主席研究員（退職）並びに当研究所の皆様方に深く感謝いたします。また本研究に際し、終始ご指導、ご助言並びに多大なご尽力をいただきました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 仲田義啓教授に感謝と敬意を表します。最後にこの研究を行うにあたり多大なるご支援とご協力を賜りました湧永製薬株式会社 草井由博社長並びに不破亨副社長に対して心より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Domagala J. M., *J. Antimicrob. Chemother.*, **33**, 685-706 (1994).
- 2) Sanchez J. P., Gogliotii R. D., Domagala J. M., Gracheck S. J., Huband M. D., Sennie J. A., Cohen M. A., Shapiro M. A., *J. Med. Chem.*, **38**, 4478-4487 (1995).

- 3) Klaassen C. D., "The Pharmacological Basis of Therapeutics," 10th ed. McGraw-Hill., 2001, pp. 67-80.
- 4) Arata J., Horio T., Soejima R., Ohara K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 3141-3145 (1998).
- 5) Blondeau J. M., *Clin. Therapeutics*, **21**, 3-40 (1999).
- 6) Ferguson J., *Photochem. Photobiol.*, **62**, 954-958 (1995).
- 7) Horio T., Miyauchi H., Asada Y., Aoki Y., Harada M., *J. Dermatol. Sci.*, **7**, 130-135 (1994).
- 8) Oliveira H. S., Goncalo M., Figueiredo A. C., *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16**, 116-120 (2000).
- 9) Martinez L. J., Li G., Chignell C. F., *Photochem. Photobiol.*, **65**, 599-602 (1997).
- 10) Matsumoto M., Kojima K., Nagano H., Matsubara S., Yokota T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 1715-1719 (1992).
- 11) Morimura T., Ohno T., Matsukura H., Nobuhara Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1000-1004 (1995).
- 12) Ferguson J., Johnson B. E., *Br. J. Dermatol.*, **123**, 9-20 (1990).
- 13) Vousden M., Ferguson J., Richards J., Bird N., Allen A., *Chemotherapy*, **45**, 512-520 (1999).
- 14) Iwamoto Y., Kurita A., Shimizu T., Masuzawa T., Uno K., Yagi M., Kitagawa T., Oku T., Yanagihara Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 654-657 (1994).
- 15) Hayashi N., Amano H., Ohshita Y., Niino Y., Yoshida J., Yazaki A., 36th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. F051, New Orleans, 1996.
- 16) Kuramoto Y., Ohshita Y., Yoshida J., Yazaki A., Shiro M., Koike T., *J. Med. Chem.*, **46**, 1905-1917 (2003).
- 17) Marutani K., Matsumoto M., Otabe Y., Nagamuta M., Tanaka K., Miyoshi A., Hasegawa T., Nagano H., Matsubara S., Kamide R., Yokota T., Matsumoto F., Ueda Y., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2217-2223 (1993).
- 18) Wagai N., Yamaguchi F., Sekiguchi M., Tawara K., *Toxicol. Lett.*, **54**, 299-308 (1990).

-
- 19) Wagai N., Tawara K., *Toxicol. Lett.*, **58**, 215–223 (1991).
- 20) Fass R. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2348–2357 (1993).
- 21) Fass R. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1818–1824 (1997).
- 22) Araki T., Kawai I., Ohta I., Kitaoka H., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 229–234 (2002).