家兎実験的子宮内感染症におけるFleroxacinの治療効果

高橋まゆみ#・加悦みわ子・岡田　淳
関東逓信病院　総合検査科*
#順天堂大学医学部内科・感染症学講座

相島　博
杏林製薬株式会社　臨床開発1部

新キノロン系抗菌剤fleroxacinの子宮内感染症に対する治療効果について，家兎子宮内感染症モデルを用いて検討した。

今回用いた感染菌*Escherichia coli* KH-8908株及び*Bacteroides fragilis* GAI-0558株に対する本剤のMICは各々0.10 μg/ml及び6.25 μg/mlであった。両菌種を単独あるいは混合感染させた後4日目からfleroxacinの20mg/kgを1日1回5日連続して経口投与した。

単独及び混合感染の各対照群に比較して，薬剤を投与した各治療群での化膿性炎症病変は軽減しており，病態の改善が認められた。

以上の結果よりfleroxacinは子宮内感染症に対して有効な薬剤であることが示唆された。

Key words : 家兎，子宮内感染症，Fleroxacin, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*

Fleroxacinはグラム陽性菌及び陰性菌に対し，幅広い抗菌スペクトルを有する新キノロン系合成抗菌剤で，マウス感染治療実験では同系薬剤に比較して，各種病原菌に対し最も優れた効果が認められ，*in vitro*より*in vivo*での成績が優れていると考えられている。一方，産婦人科領域においては，女性性器組織への移行性が良好で臨床的に産婦人科感染症に対する経口剤として期待が持たれている[1]。

今回，著者らは産婦人科領域感染症において臨床材料からの分離頻度の高いことが知られている[2]*Escherichia coli*及び*Bacteroides fragilis*を感染菌とし，以前に岡田ら[3]が報告した家兎子宮感染モデルを作製して，fleroxacinの治療効果について検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 実験動物

日本白色種雌家兎（体重2.5kg前後）24羽を6群に分け1群4羽で実験に供した。

2. 薬剤

Fleroxacin（杏林製薬）は，用時に0.3% carboxymethylcelluloseに懸濁しゴム製胃ゾンデを用いて経口投与した。

3. 使用菌株と抗菌力測定

E. coli KH-8908株及び*B. fragilis* GAI-0558株を感染菌として用いた。最小発育阻止濃度(MIC)は日本化学療法学会及び嫌気性菌MIC測定検討委員会感受性測定法[4,5]に準じ，両菌種とも10^6/mlを接種量として測定した。

4. 血中及び子宮組織内濃度の測定

初回及び最終投与の30分後に耳静脈より採血し血清を分離した。また子宮組織は最終投与30分後の剖検時に子宮壁全層を採取した。各試料は測定まで-20℃に凍結保存した。薬剤濃度は杏林製薬（株）開発技術センターで高速液体クロマトグラフィー法[6]によって測定した。

5. 子宮内感染症の作製と治療実験

子宮内感染症モデルの作製は前述の方法[3]に従って実施した。実験の概要はFig. 1に示した通りである。即ち，1～2週間予備飼育し馴化した家兎に菌接種の10日前にPMSG（セロトロピン：帝国臓器）50 IUを皮下注射し，次いで8日前にHCG（ゴナドトロピン：帝国臓器）100 IUを静脈内注射して前処置を行った。

Ⅰ群は*E. coli*，Ⅱ群は*B. fragilis*またⅢ群は*E. coli*と*B. fragilis*の両者を混合した感染対照群とした。またⅣ，Ⅴ及びⅥ群は前者のⅠ群からⅢ群のそれぞれにfleroxacinを投与した治療群とした。単独菌感染の場合，片側の子宮の近位部を，また混合感染の場合は子宮頸部の遠位部を結紮した後，約10^8CFU/mlに5%ムチン液で懸濁調製した各菌液1mlを子宮腔に接種した。最終接種菌量は，*E. coli*，*B. fragilis*ともに2×10^8～10^9 CFU/mlであった。各治療群には，接種後4日目よりfleroxacinの20mg/kgを

* 〒141　東京都品川区東五反田5-9-22

1日1回5日連続して経口投与した。

血液検査は，菌接種直前，薬剤初回投与直前，投与後2日目及び剖検時に耳静脈より採血し白血球数及びCRP値を測定した。最終投与の30分後に剖検を実施した。卵巣を含め子宮を摘出し肉眼的に観察した後，子宮内腔液を無菌的に採取して好気及び嫌気培養した。更に子宮組織は10%ホルマリン溶液に固定し，パラフィン包埋による切片を作製した後，ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的に検索した。

6. 統計学的処理

得られた数値に対する有意差の検定には，Wilcoxonの順位和検定[7]を用いた。

Ⅱ. 結　　果

1. 感染菌のMIC

感染の惹起に使用した菌株に対するfleroxacinのMICは，*E. coli* KH-8908株が0.10 μg/ml，*B. fragilis* GAI-0558株が6.25 μg/mlの値を示した。

2. 血中及び子宮組織内濃度

投与初日及び剖検日の血中濃度は4.12±2.99 μg/mlを，また子宮組織内濃度は4.67±3.34 μg/gを示し，投与後30分におけるfleroxacinの組織内濃度は血中のそれと比較してほぼ同等あるいはそれ以上であった。

3. 治療効果

(1) 細菌学的効果

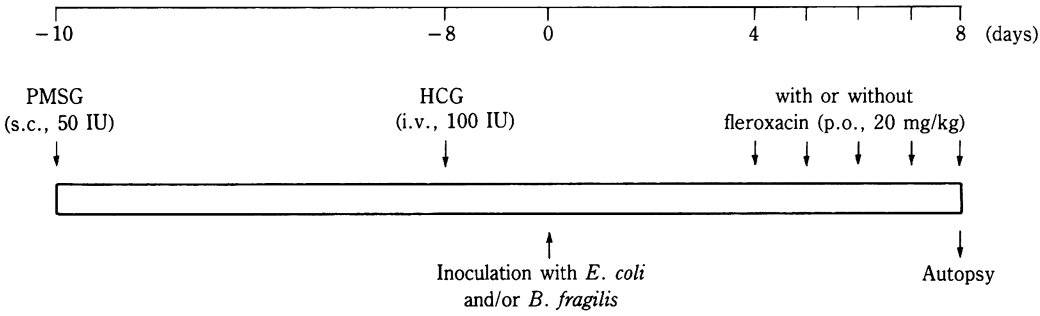
子宮内腔及び内膜面の生菌数の培養結果をTable 1に示した。感染対照群では，治療群に比べて回収された菌量は若干多い傾向にあった。

(2) 血液学的検査

菌接種前，初回投与前，投与期間中及び剖検時の末梢血中の白血球数変動はFig. 2に示した通りである。対照群と治療群との間に一定の傾向は認められなかった。また，CRPは全例ともに陰性であった。

(3) 病理学的検索

剖検所見として代表的なものをFig. 3に示した。典型的な所見として子宮全体が浮腫状に腫大し著明な波動感を有して，子宮内腔には，多量の膿汁の貯留が認められた。これらの変化は特に混合感染のⅢ群に強かった。組織学的には以下に示す評価基準を定め，それに従った鏡検結果をTable 2に要約した。また各群の代表的な組織像をFig. 4に示した。所見にややバラツキがみられたが，



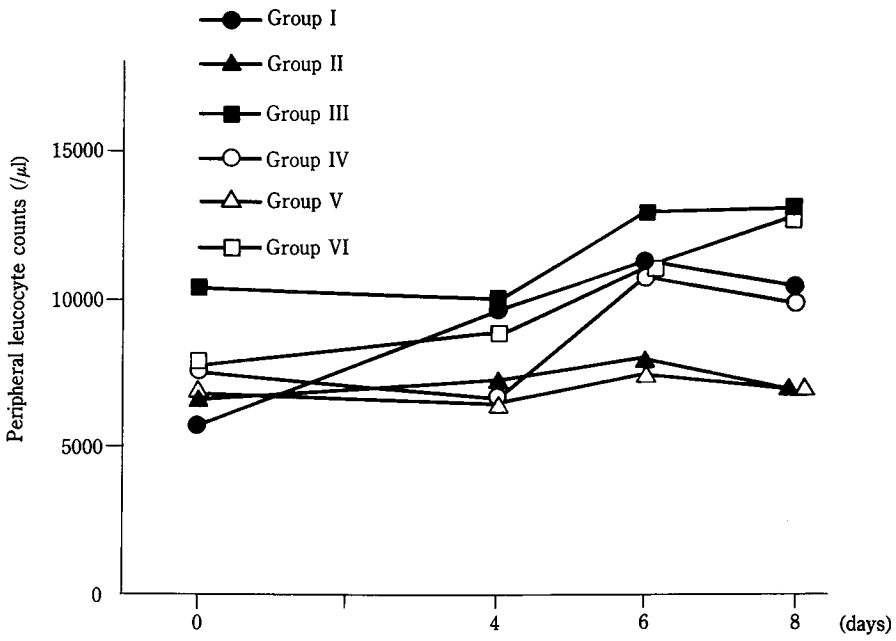
PMSG: pregnant mare serum gonadotropin
HCG: human chorionic gonadotropin

Fig. 1. Diagramatic illustration of the experimental design employed in the present study.

Table 1. Bacterial effect of fleroxacin on uterus of rabbits infected with *Escherichia coli* and/or *Bacteroides fragilis*

Group	Inoculation with or without treatment	No. of rabbits	No. of bacteria[a)]			
			−	+	++	+++
I	*E. coli*	4	0	2	1	1
II	*B. fragilis*	4	2	1	1	0
III	*E. coli* + *B. fragilis*	3	1	0	0	2
IV	*E. coli* + fleroxacin	4	3	1	0	0
V	*B. fragilis* + fleroxacin	4	3	1	0	0
VI	*E. coli* + *B. fragilis* + fleroxacin	3	1	2	0	0

a) Number of bacteria: −, no colonies; +, small; ++, medium; +++, large.



Group I: *E. coli* Group II: *B. fragilis* Group III: *E. coli* + *B. fragilis*
Group IV: *E. coli* + fleroxacin Group V: *B. fragilis* + fleroxacin
Group VI: *E. coli* + *B. fragilis* + fleroxacin

Fig. 2. Changes of peripheral leucocyte counts of rabbits inoculated with *Escherichia coli* and/or *Bacteroides fragilis* and followed by oral administration of fleroxacin.

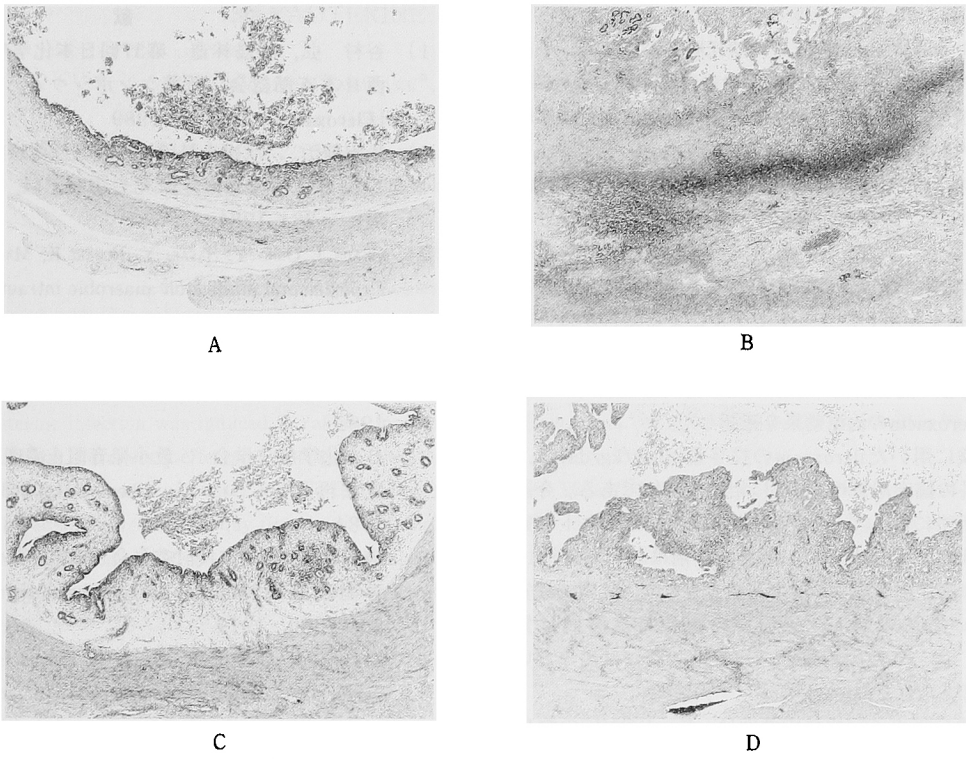
A B

Fig. 3. A and B show the gross findings of rabbit uterus for typical cases from groups III and IV on the 8th day after inoculation with bacteria. A: uterus was enlarged and contained pus in group II. B: slight enlargement in the inoculated side (→) of uterus in group IV.

Table 2. Histopathological findings of rabbit uterus infected with *Escherichia coli* and/or *Bacteroides fragilis* and followed by oral administration with fleroxacin

Group	Inoculation with or without treatment	No. of rabbits	No. of rabbits with scored[a)]				
			±	+	++	+++	++++
I	*E. coli*	4	1	0	1	2	0
II	*B. fragilis*	4	2	0	0	2	0
III	*E. coli* + *B. fragilis*	4	0	1	1	0	2
IV	*E. coli* + fleroxacin	4	2	2	0	0	0
V	*B. fragilis* + fleroxacin	4	2	0	1	1	0
VI	*E. coli* + *B. fragilis* + fleroxacin	4	1	1	0	2	0

a) The scores of pathological findings: ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; ++++, very severe.



A B C D

Fig. 4. A to D show the microscopic findings of rabbit uterus for typical cases from groups I, III, IV and VI on the 8th day after inoculation with bacteria. All specimens were stained with hematoxylin and eosin (× 20).
A: severe change in group I. B: very severe change in group III. C: slight change in group IV.
D: moderate change in group V.

炎症性病変の程度は，その出現頻度からⅢ群が最も強く，次いで，Ⅰ，Ⅱ及びⅥ群が同等で更にⅤ群の順で，Ⅳ群が最も軽度な変化であった。また統計学的に，各感染対照群とそれぞれに対応した治療群との間で病変の出現頻度を比較してみると，いずれの場合も有意差($P<0.05$)は認められなかったが，Ⅰ群vsⅣ群：$P\fallingdotseq0.071$，Ⅲ群vsⅥ群：$P\fallingdotseq0.068$またⅠ・Ⅱ・Ⅲ群vsⅣ・Ⅴ・Ⅵ群：$P\fallingdotseq0.068$と有意水準のそれに極めて近い値が得られた。

＜病理組織学的評価基準＞

－（正常）：特筆すべき変化を認めない。

±（極めて軽度）：僅かな内膜の水腫と細胞浸潤のみられるもの。

＋（軽度）：上記変化がやや強く，限局性に軽度な粘膜上皮の変性を伴うもの。

＋＋（中等度）：粘膜上皮の壊死脱落が目立ち，子宮内腔あるいは腺管内に好中球浸潤を伴うもの。

＋＋＋（高度）：上記変化が広範囲に亘って強く，筋層内まで細胞浸潤の波及しているもの。

＋＋＋＋（極めて高度）：筋層及び外膜も変性あるいは壊死に陥っているもの。

Ⅲ．考　　察

子宮感染症モデルを用いた抗菌剤の薬効評価は，感染菌に*E. coli*を使用したラットモデルによる報告がほとんどである[8-11]。今回，著者らは*E. coli*の他，*B. fragilis*あるいは両者の混合接種による家兎子宮内感染症モデルを用いてfleroxacinの治療効果を確認した。

本実験に用いたfleroxacinの投与量20mg/kg/dayは，産婦人科の臨床用量の約5倍に相当する値である。今回は臨床用法に従って，1日1回の投与としたがヒトと家兎では代謝に差異がある。即ち，本剤はヒトでは約10時間と非常に長い生物学的半減期を有して，代謝的に安定しているのに対し，家兎での血中持続時間は短い[6,12,13]。従って臨床用量との比較は一概には出来ないものと考えられる。

投与30分後の子宮組織内濃度は，*E. coli*のMICの約47倍，*B. fragilis*のそれの約0.7倍の値を示した。子宮内細菌数の変動と同様に病理組織学的にもそれらを反映した結果が得られた。感受性の高かった*E. coli*の単独感染対照のⅠ群に対し，治療を施したⅣ群の炎症性病変の程度は軽く，十分改善されていた。一方，*B. fragilis*と*E. coli*の混合感染の場合，対照のⅢ群では極めて高度な変化が2例出現したのに対し，治療を施したⅥ群では，それより若干軽度な変化にとどまっていた。しかし，*B. fragilis*単独感染のⅡ群とⅤ群の間に明瞭な差は認められなかった。これは用いた動物の例数が少なかったことによるもの，あるいは他の要因によるものかは不明であった。しかし，少なくとも*E. coli*に対する効果は十分期待できる結果と思われた。また少数例のため統計学的検定は必ずしも適当ではないと思われるが，Ⅱ群とⅤ群間を除くと，有意水準値($P<0.05$)に極めて近似であったことは，統計学的にも本剤投与による治療効果の傾向があるものと考えられた。

以上のことからfleroxacinは，子宮内感染症に対して有用性の高い薬剤であると推察された。

謝　　辞

稿を終えるにあたり，実験にご協力をいただいた当院動物室の佐々木勇三氏ならびに杏林製薬（株）開発技術センターの横山博和，成田達夫の両氏に御礼申し上げます。

文　　献

1) 谷村　弘，副島林造：第37回日本化学療法学会西日本支部総会，新薬シンポジウム。AM-833(Fleroxacin)，和歌山，1989

2) 松田静治：産婦人科領域の嫌気性菌感染症，第11回嫌気性菌感染症研究会講演記録，(特別講演)，p.234，1981

3) Okada J, Ohno Y, Sasaki Y, Nozaki K, Matsuda S: Experimental studies on anaerobic intrauterine infection. Proceedings of the 2nd International Symposium on Anaerobes. P.178-189, Japanese Association for Anaerobic Infection Research, Tokyo, 1985

4) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改定について。Chemotherapy 32：142，1984

5) 嫌気性菌MIC測定検討委員会：嫌気性菌の最小発育阻止濃度(MIC)測定法。Chemotherapy 27：559～560，1979

6) Kusajima H, Ooie T, Kawahara F, Uchida H: High-performance liquid chromatographic determination of 6,8-difluoro-1-(2-fluoroethyl)1,4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid and its metabolites in laboratory animals. J Chromatogr 381：137～148，1986

7) E.L.レーマン：ノンパラメトリックス．(鍋谷清治，刈谷武昭，三浦良造訳) p.5～14 森北出版，東京，1978

8) 館野政也，西田亨子，黒津幸雄，保田　隆，才川　勇：実験的子宮内感染症ラットの作製とセファロスポリン系薬剤による治療効果について。Chemotherapy 29：68～75，1981

9) 笠井一弘，宮本政樹，高瀬善次郎：実験的子宮内感染症モデルの作製とCTXによる治療効果（第1報）。Chemotherapy 30 : 1278～1285, 1982
10) 藺守龍雄，鎌田洋一：ウサギ子宮内感染症モデルにおけるCefmenoximeの治療効果について。Chemotherapy 31 : 947～951, 1983
11) 笠井一弘，宮本政樹，高瀬善次郎：実験的子宮内感染症モデルの作製とCTXによる治療効果（第2報）。Chemotherapy 31 : 988～991, 1983
12) Nakashima M, Kanamaru M, Uematsu T, Takiguchi A, Mizuno A, Itaya T, Kawahara F, Ooie T, Saito S, Uchida H, Masuzawa K : Clinical pharmacokinetics and tolerance of fleroxacin in healthy male volunteers. J. Antimicrob Chemother 22(S-D) : 133～144, 1988
13) Kusajima H, Ishikawa N, Machida M, Uchida H, Irikura T Pharmacokinetics of a new quinolone, AM-833, in mice, rats, rabbits, dogs and monkeys Antimicrob Agents Chemother 30 304～309, 1986

THERAPEUTIC EFFICACY OF FLEROXACIN IN EXPERIMENTAL INTRAUTERINE INFECTION IN RABBITS

Mayumi Takahashi#, Miwako Kaetsu and Jun Okada
Department of Central Laboratory, Kanto Teishin Hospital,
5-9-22 Higashigotanda, Sinagawa-ku, Tokyo 141, Japan
#Department of Internal Medicine, Juntendo University, School of Medicine

Hiroshi Aijima
Clinical Research & Development (Dept) I, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Fleroxacin, a new quinolone derivative, was synthesized by Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd. It is characterized by a broad antibacterial spectrum and a potent antibacterial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Intrauterine infection was induced in rabbits inoculated with *Escherichia coli* KH-8908 and/or *Bacteroides fragilis* GAI-0558, and the therapeutic effects of fleroxacin were assessed.

The MICs of fleroxacin against *E. coli* and *B. fragilis* strains were 0.10 μg/ml and 6.25 μg/ml. Twenty mg/kg of fleroxacin was orally administered once a day five times from the 4th day after mono-infection or mixed infection with both bacteria.

Inflammatory changes of the uterus in the therapeutic groups were milder than those of either infected control group.

These findings suggest that fleroxacin is a useful compound for the treatment of intrauterine infections in obstetrics and gynecology.