

## Fleroxacin の細胞レベルにおける前立腺組織内分布の検討

池田 滋・西村 清志・石橋 晃

北里大学医学部泌尿器科\*

岡 村 孝 夫

杏林製薬株式会社中央研究所

(平成3年2月15日受付・平成3年5月9日受理)

Fleroxacin の前立腺内における移行動態を正常および前立腺炎モデルラットによる凍結マイクロオートラジオグラフィ法を用いて検討した。本剤の分布は濾胞内、間質組織いずれも良好で、ことに前立腺モデルラット濾胞内への移行が他と比較して若干顕著である傾向がみられた。これらの結果より本剤の細菌性前立腺炎への有用性が示唆された。

**Key words:** Fleroxacin, 前立腺炎, 組織移行

Fleroxacin は杏林製薬(株)中央研究所で開発されたニューキノロン系の合成抗菌剤で、グラム陽性菌および陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを有し、マウス感染治療実験においても、同系薬剤に比較して優れた効果が認められている<sup>1)</sup>。このことは、ことに近年起因菌が多様化している慢性前立腺炎の治療に関し、有用性が示されている一因に成りうると思われる。一方、いかに抗菌力が優れていても慢性前立腺炎においては、薬剤の移行性、ことに薬剤がacinusを越えて移行するかが重要なポイントとして問われているのも事実である<sup>2)</sup>。

我々は、薬剤分布を細胞レベルで観察する手段として、凍結マイクロオートラジオグラフィを用い、今までにいくつかの薬剤で前立腺組織内分布を報告してきたが、今回、fleroxacinを用い同様の検討を施行し、さらに前立腺炎モデルラットにおける分布状態もあわせて検討したので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用薬剤

使用した薬剤はキノロン系抗菌剤 fleroxacin で、<sup>14</sup>Cにてラベルした放射性標識化合物 <sup>14</sup>C-fleroxacin (放射化学的純度: 98%以上) を用いた (Fig. 1)。

## 2. 使用動物

使用動物は体重 200 g の正常ウイスター系雄性ラットと、感染群では菌接種時体重 80~90 g, オートラジオグラフィ施行時体重 220~230 g のウイスター系雄性ラットを用いた。接種菌液は *Enterococcus faecalis* EF 2-11 を用いた。

## 3. 前立腺炎モデルラットの作製

前立腺組織内の薬剤分布を検討するポイントの一つとして、濾胞内と間質部における薬剤の分布状態の差異を観察することがあげられる。したがって、前立腺炎モデルを作製するにあたっては組織障害が強く、細胞構築が乱れている急性期の標本では銀粒子の分布状況の差異が判定し難く、また濾胞内への細胞浸潤が極度に強い標本では、銀粒子そのものの観察が阻害されるため、今回オートラジオグラフィに先立って、最も適した炎症性変化のみられる時期を検討する上で予備実験を施行した。使用動物は4週齢、体重80~90 gのウイスター系雄性ラットで、エーテル麻酔下にて開腹し、守殿らの報告による方法<sup>3,4)</sup>に準じ、腹部前立腺に直接菌液を接種した。接種菌は *E. faecalis* EF 2-11  $8.4 \times 10^7$  CFU/prostate で trypticase-soy broth 0.1 ml にて懸濁し、ツベルクリン針を用いて接種した。接種後1, 2, 3週目に屠殺し、組織学的観察を施行した結果、今回の実験においては接種から3週間以上の期間をおいた検体が最も適切と判断した。オートラジオグラフィには、*E. faecalis* EF 2-11  $7.1 \times 10^9$

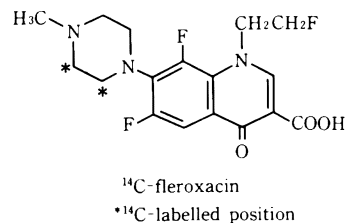


Fig. 1. Chemical structure of <sup>14</sup>C-fleroxacin.

\* 相模原市北里 1-15-1

Table 1. Methods of microautoradiography

1. Administration	$^{14}\text{C}$ -labelled fleroxacin (4.1 mg/3.7 MBq/100 g)
2. Sample	Ventral prostate and coagulating gland of rat (30 min and 6 h after administration)
3. Freezing	Acetone with solid $\text{CO}_2$
4. Preparation of sections	4~5 $\mu\text{m}$ thickness
5. Lyophilizing	in cryostat ( $-20^\circ\text{C}$ ~ $-30^\circ\text{C}$ )
6. Film emulsion	NR-M2, Konica
7. Exposure	3~4 weeks ( $-20^\circ\text{C}$ )
8. Developing and fixation	KONICA DOLX AND FUJIFIX
9. Staining	Hematoxylin and eosine

CFU/prostate 接種後 4 週間のものを使用した。

#### 4. 凍結マイクロオートラジオグラフィ (Table 1)

$^{14}\text{C}$ -fleroxacin 4.1 mg/3.7 MBq/100 g を CMC に懸濁した液を経口投与し、30 分後にラットを開腹、腹部前立腺を摘出、ただちにアセトン・ドライアイス ( $-76^\circ\text{C}$ ) にて急速凍結を行った。一定時間凍結保存した後、サクラ精機社製クライオスタットにて 5  $\mu\text{m}$  の厚さで切片を作製した。一方、乳剤 (NR-M2, Konica) はディッピング法にてスライドガラスに塗布し、シリカゲル入りの暗箱中でコンタクトまで保存した。コンタクト操作は thaw-mount-method にて行ったため、切片作製操作中は室内を暗室化し、安全光のもとで操作をすすめた。露出は暗箱内  $5^\circ\text{C}$  の環境下で 3~4 週間行い、コニドール液にて現像、コニフィックス液にて定着操作を施行した。得られた検体はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

## II. 結 果

### 1. 予備実験

*E. faecalis* 感染 1 週目では間質、濾胞内ともに好中球浸潤がきわめて強くみられ、2 週目になると炎症性変化は中程度となるが epithelial cell の脱落性変化も認められる。3 週目になると間質部の細胞浸潤は著明に減少し、オートラジオグラフィを施行してもほぼ問題ない時期とも思われるが、epithelial cell の脱落性変化がまだ認められるため、さらに 1 週間おいた後にオートラジオグラフィを行うこととした (Figs. 2~4)。

### 2. 正常ラットマイクロオートラジオグラム

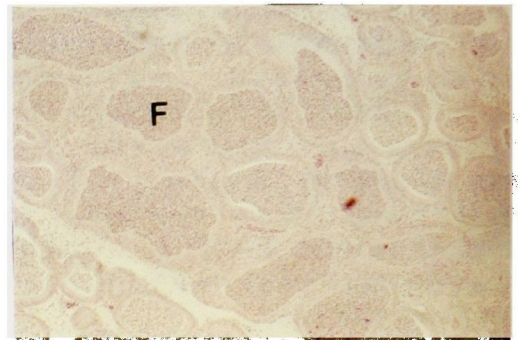


Fig. 2. Histopathological findings of rat prostate, 1 week after inoculation with *Enterococcus faecalis* ( $\times 100$ ). F: folliculi

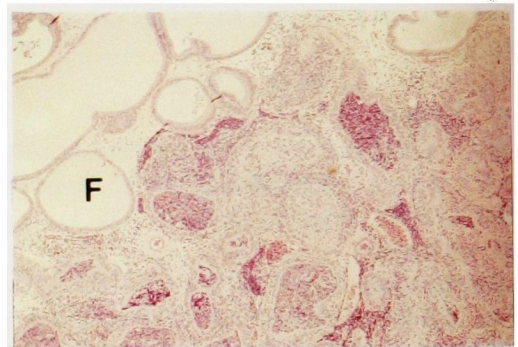


Fig. 3. Histopathological findings of rat prostate, 2 weeks after inoculation with *Enterococcus faecalis* ( $\times 100$ ). F: folliculi

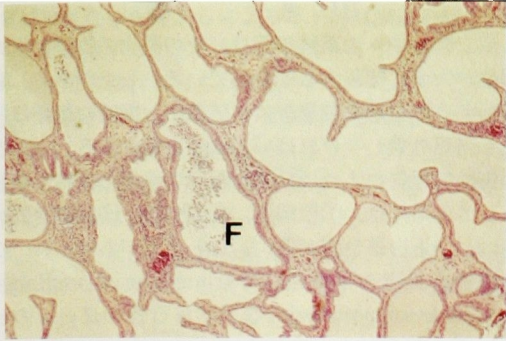


Fig. 4. Histopathological findings of rat prostate, 3 weeks after inoculation with *Enterococcus faecalis* (x100). F: folliculi

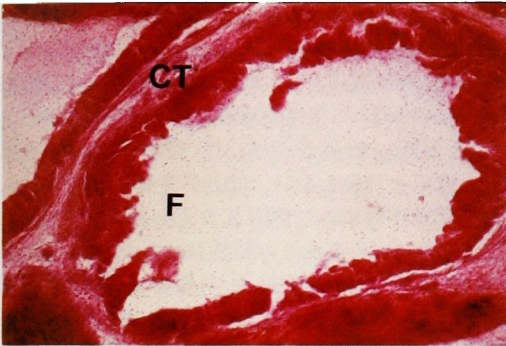


Fig. 5. Microautoradiogram of rat prostate following administration of <sup>14</sup>C-fleroxacin. Good accumulation of silver grains is seen in prostatic tissue (x200). F: folliculi CT: connective tissue

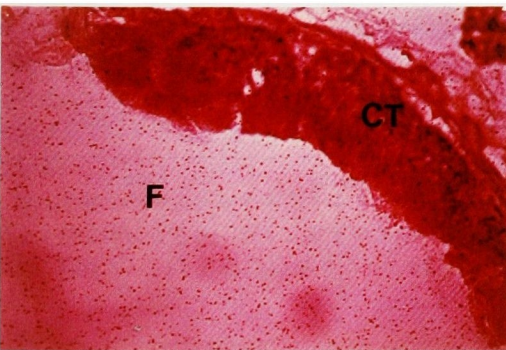


Fig. 6. Many silver grains are seen not only in connective tissue but also in folliculi of rat prostate (x400). F: folliculi CT: connective tissue

前立腺濾胞内および間質組織ともに <sup>14</sup>C-fleroxacin の存在を示す銀粒子の良好な集積が見られた。濾胞内、間質部における分布状態の明かな差異はみられなかった (Figs. 5, 6)。

3. 前立腺炎ラットマイクロオートラジオグラム

正常ラットと比較すると濾胞内における銀粒子の集積が顕著で間質部の分布は比較的少なかった。今回のモデル実験は、銀粒子の存在をよりはっきりあらしめ、かつ正確な分布状態を把握するためにできるだけ腺上皮の構築を乱さない程度の比較的軽度の炎症を作製したので、濾胞内、間質部ともに細胞浸潤は顕著ではないが、濾胞内において、リンパ球ないしは多核球の認められる部位の周囲には比較的著明な銀粒子の集積が認められた (Figs. 7~10)。

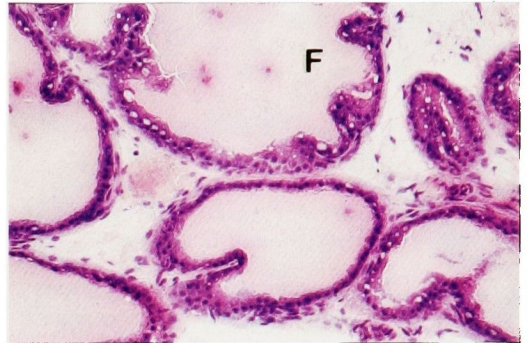


Fig. 7. Microautoradiogram of prostatic rat prostate following administration of <sup>14</sup>C-fleroxacin. Good accumulation of <sup>14</sup>C-fleroxacin is seen in prostatic tissue (x200). F: folliculi



Fig. 8. Magnified view of Fig. 7. High distribution of silver grains is noted within folliculi (x400). F: folliculi CT: connective tissue

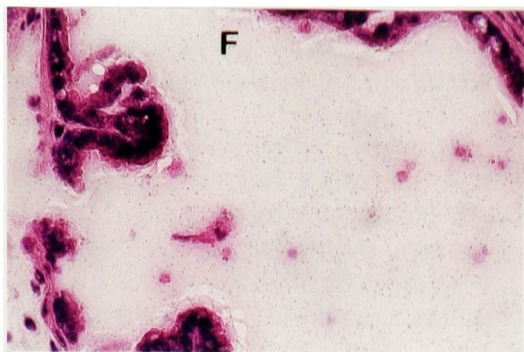


Fig. 9. Relatively high accumulation of silver grains is seen around inflammatory cells ( $\times 400$ ).  
F: folliculi

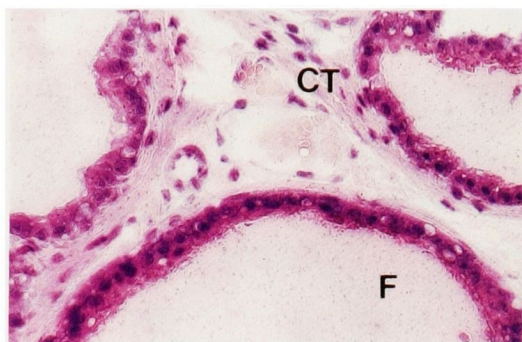


Fig. 10. High accumulation of silver grains is noted in folliculi and low accumulation in connective tissue ( $\times 400$ ).  
F: folliculi  
CT: connective tissue

### III. 考 察

前立腺液中への薬物移行は、その薬物の物理化学的特性が大きく関与するとされている。したがって、細菌性前立腺炎の薬剤選択には抗菌力と同時に組織移行性も当然考慮しなければいけない事柄である。今までの実験的報告によれば、前立腺液中移行の優れた薬剤としての条件は、①脂溶性、②塩基性、③解離定数が高い、④蛋白結合率が低い、ことなどがあげられ、この条件に見合う薬剤として trimethoprim, sulfamethoxazole-trimethoprim などが移行性の良いものとされている<sup>5,6)</sup>。

しかしこの成績は pH 6.4 前後の正常イヌを用いたものであり、塩基性に傾く前立腺炎の状態における薬剤移行を論ずる上においてはさらに検討を要する面が見られる<sup>7)</sup>。以上の点を踏まえた上で feroxacin の物理化学的特性を見ると、① ofloxacin (OFLX) よりやや脂溶性が高く、tosufloxacin tosilate (TFLX) よりも低い。② 二相性の解離定数を示し、その一方は 8.65 と高い数値を示す。③ 蛋白結合はヒトで 32% と高いとは思えない。以上を他剤と比較すると、同系では全体的にみて OFLX に近い物理化学的特性を示している<sup>1)</sup>。またこの特性は、 $\beta$ -lactam 剤との比較では明らかに移行性の良さを示している (Table 2)。次に正常ラットオートラジオグラムの分布状態は濾胞内および間質ともに銀粒子の集積がみられ、これより feroxacin の前立腺液中移行の良さは示唆されるが、全体の集積数を見ると OFLX<sup>8)</sup> TFLX<sup>9)</sup> のそれよりは少ない。これは実験時における比放射能量や乳剤などの諸条件の差異もあるため一概

Table 2. Physicochemical properties

	Ofloxacin (quinolone)	Cefmetazole (cephamycin)	Tosufloxacin tosilate (quinolone)	Fleroxacin (quinolone)
Formula	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	$C_{15}H_{16}N_7O_5S_2Na$	$C_{18}H_{18}F_3N_4O_3$ $\cdot C_7H_8O_3S \cdot H_2O$	$C_{17}H_{18}F_3N_3O_3$
Molecular weight	361.37	493.50	594.56	369.34
Solubility				
Water	$\Delta$	$\circ$	$\times$	$\Delta$
Methanol	$\Delta$	$\circ$	$\Delta$	$\Delta$
Acetone	$\Delta$	$\circ$	$\times$	$\Delta$
pH	7.16	4.2~6.2	—	—
Protein binding (%)	6.3	84.8	37.4	32.0
pKa	5.54 7.90	2.34	5.8 8.7	5.03 8.65

にはいえないが鈴木らによるヒト前立腺液中移行のデータと一致する<sup>10)</sup>。しかし元来オートラジオグラフィは定量的検討としては確立されているものではないため今回の結果のみからの比較は問題があると思われる。むしろ定性的に細胞レベルにおける分布パターンが cefmetazole の分布状態と異なり<sup>11)</sup>、他のキノロン剤に類似する点からみて、オートラジオグラフィ所見上では、前立腺上皮を越え、濾胞内へ容易に移行し易し薬剤の一つとみなすことができる。一方前立腺炎ラットオートラジオグラムでは正常に比べさらに濾胞内への分布が高く、逆に間質部への集積は明らかに低くなる傾向がみられた。前述したように、今回の炎症モデル作製の点で最も考慮したのは、できるだけ腺上皮の配列を乱さずにかつ組織的に炎症変化を現すことであった。すなわち、組織所見上強度の炎症変化がみられる状態、つまり臨床的には急性前立腺炎に値する状態では、一般に薬剤は容易に acinus を越えて濾胞内へ移動し易いため、今実験の主たる目的である薬物の物理化学的特性による移行の差異を検討する上で適さぬことになるからである。今回作製した炎症モデルにおいては、このような要因からくる分布上の変化は、少なくとも標本にみられる細胞配列の状態からは考えられないと思われるので、間質の分布が減少し、濾胞内分布が増加した背景には、炎症に伴う組織透過性の亢進や濾胞内の pH の変化などが関与しているのではないかとと思われる。実験の性格上オートラジオグラフィに用いた組織自体の pH は測定できないが、予備実験にて作製した炎症前立腺をホモジネートした溶液の pH は弱アルカリであったことを付け加えておく。

一方、臨床試験の報告に見られる前立腺液中濃度は、投与後1時間値におけるデータでは TFLX よりは若干高いものの OFLX と比較すると低い数値が示されているが、血中濃度のピークである投与後2時間におけるデータでは 1.86  $\mu\text{g/ml}$  と良好な移行を示している。

以上を総合的にまとめて考察すると、fleroxacin はラット前立腺によるオートラジオグラフィの成績からは、OFLX, TFLX 等の同系キノロン剤と同様の

分布を示し、物理化学的特性からも前立腺液中への移行性の良さが示唆される薬剤の一つと考えられ、炎症存在下ではこの傾向はさらに顕著に見られるものと考えられる。したがって臨床上からも細菌性慢性前立腺炎を含めた前立腺における細菌感染症に対し、きわめて有用な薬剤であることが推察される。

#### 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) Winningham D G, Nemoy N J, Stamey T A: Diffusion of antibiotics from plasma into prostatic fluid. *Nature* 219: 139~142, 1968
- 3) 守殿貞夫, 藤井 明, 原田益善, 梅津敬一, 片岡陳正, 荒川創一, 石神襄次: 細菌性前立腺炎に関する実験的研究, 第 1 報 各種臨床分離菌の病原性について. *西日泌尿* 47: 1083~1088, 1985
- 4) 守殿貞夫, 藤井 明, 原田益善, 梅津敬一, 片岡陳正, 荒川創一, 石神襄次: 細菌性前立腺炎に関する実験的研究, 第 2 報 薬剤治療効果について. *西日泌尿* 47: 1089~1095, 1985
- 5) Stamey T A, Meares E M, Winningham D G: Chronic bacterial prostatitis and the diffusion of drugs into prostatic fluid. *J. Urol* 103: 187~194, 1970
- 6) Meares E M, Stamey T A: Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol* 5: 492~518, 1968
- 7) 村中幸二, 鈴木裕志, 中村直博, 河原 優, 米田尚生, 岡野 学, 秋野裕信, 磯松幸成, 河田幸道: 慢性細菌性前立腺炎に対する治療薬剤の再検討, 第 1 報 抗菌力に及ぼす pH の影響. *Chemotherapy* 35: 824~832, 1987
- 8) Ikeda S, Nishimura K, Ishibashi A: Distribution of ofloxacin in the prostatic tissue. *Prog. Antimicrob Chemother* 145, 1988
- 9) 池田 滋, 西村清志, 石橋 晃: T-3262 (tosufloxacin tosilate) の前立腺組織内分布の検討. *Chemotherapy* 37: 1149~1153, 1989
- 10) 鈴木恵三, 長田恵弘, 名出頼男, 堀場優樹, 高梨勝男: 各種抗菌剤のヒト前立腺液 (PF) への移行濃度, 前立腺炎シンポジウム. 東京, 1989
- 11) 池田 滋, 岩村症嗣, 西村清志, 荒川 孝, 石橋 晃: 化学療法剤の前立腺組織内分布の検討. *Chemotherapy* 34: 1116~1119, 1986

MICROSCOPIC STUDY ON DISTRIBUTION OF FLEROXACIN  
IN PROSTATIC TISSUE

Shigeru Ikeda, Kiyoshi Nishimura and Akira Ishibashi  
Department of Urology, School of Medicine, Kitasato University,  
1-15-1 Kitasato, Sagamihara City, Kanagawa, Japan

Takao Okamura  
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

The distribution of fleroxacin in rat prostate was studied by microautoradiography.  $^{14}\text{C}$ -floxacin distributed well in interstitial tissue and folliculi even in untreated and prostatitic rats. Greater penetration into folliculi was found in prostatitic rats. Good penetration into folliculi through interstitial tissue and prostatic epithelium was demonstrated. The results suggest good clinical improvement using fleroxacin against bacterial prostatitis.