

Sparfloxacin の抗菌力と殺菌力に対するヒトアルブミン 及び血漿の影響の検討

西園寺克

順天堂大学医学部臨床病理学*

Sparfloxacin の抗菌力と殺菌力に対するヒトアルブミン及び血漿の影響を液体培地 (Mueller Hinton broth : MHB) を用いて検討した。

標準菌株の *Staphylococcus aureus* FDA 209P JC-1, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 に対する MHB とヒトアルブミン 5 g/dl 添加 MHB における MIC を比較した。

標準菌株を被検菌として、2 MIC, 1 MIC, 1/2 MIC の薬剤を含むヒトアルブミン添加、無添加の MHB 及び新鮮ヒト血漿に、 10^5 CFU/ml の菌量を接種し、37°C の培養で 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h の生菌数を測定し、増殖曲線を作成した。Sparfloxacin の抗菌力と殺菌力に対するヒトアルブミン及び血漿の明らかな影響は認められなかった。

Key words : Sparfloxacin, ヒトアルブミン, 新鮮血漿, 抗菌力, 殺菌力

蛋白結合が血中の抗生物質の抗菌力に影響を及ぼすことが知られている。蛋白結合率が高いために半減期の長い薬剤の一部では総血中濃度は高くても、抗生物質が主に血中で結合するとされているアルブミン添加により、抗菌力が変化することが報告されている¹⁾。

血中蛋白の薬剤の抗菌力に対する影響²⁻⁴⁾を調べる方法としては、血清を添加した液体培地あるいは血清そのものを培地として用いる方法がある。前者の場合は、液体培地中の蛋白濃度は血中の蛋白濃度より低く、後者の場合は、他の血中の因子 (例: γ -globulin, 補体等) の影響についても考慮する必要がある。

Sparfloxacin (SPFX)⁵⁾ は、腸肝循環するために血中の半減期の長い薬剤であり、体内動態は繰り返し投与により血中濃度が一定濃度の範囲内で変化する定常状態を示す薬剤である。

今回、ヒトアルブミン及びヒト血漿の SPFX の抗菌力と殺菌力に及ぼす影響について検討したので報告する。

I. 方 法

1. 試薬・機器

1) ヒトアルブミン・新鮮ヒト血漿

防腐剤添加前のヒトアルブミンを用いた。健康成人から採血後直ちに、血漿分離を行った。

2) 培地

増菌培養と MIC 測定には、Difco 社の Mueller Hinton broth を使用した。生菌数測定には、OXOID 社の CLED medium を使用した。

3) 滅菌フィルター

0.45 μ m のマイレックスフィルター (ミリポア社) を使用した。

4) 薬剤

力価検定済の SPFX, cefaclor (CCL) 及び ofloxacin (OFLX) を使用した。

5) 標準菌株

Staphylococcus aureus FDA 209P JC-1, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 を使用した。

2. MIC 測定

標準菌株を Mueller Hinton broth にて 37°C で一夜培養し、broth を用いて最終濃度が約 10^5 CFU/ml となるように菌液を調製した。

各薬剤ごとにその希釈系列 (1000 μ g/ml より 2 倍希釈) 濃度を含む broth を調製した。

菌液 4.5 ml に薬剤を含む broth 0.5 ml を加え 100 μ g/ml より 2 倍希釈系列の薬剤を含み、菌量約 10^5 CFU/ml の 5 ml の broth を 37°C, 18 時間培養後に完全に発育を阻止した希釈濃度をもって MIC とした。

Mueller Hinton broth 1 l に対して、ヒトアルブミンを 50 g 加え室温溶解後、0.45 μ m のマイレックス

*〒113 東京都文京区本郷 2-1-1

Table 1. The results of minimum inhibitory concentration of three standard strains by broth dilution method with or without human albumin

Antibiotic	Strain	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		b(+)/b(-)	AAI	b(+)/b(-)	AAI	b(+)/b(-)	AAI
Sparfloxacin		0.10/0.10	1	0.05/0.05	1	0.39/0.39	1
Ofloxacin		0.20/0.20	1	0.05/0.10	1/2	0.78/1.56	1/2
Cefaclor		0.39/0.39	1	3.13/1.56	2	>100/>100	—

Standard strains

S. aureus : FDA 209P JC-1*E. coli* : ATCC 25922*P. aeruginosa* : NCTC 10490

(μg/ml)

b (+) : minimum inhibitory concentration by broth dilution method in Mueller Hinton broth supplemented with 5g human albumin/dl

b (-) : minimum inhibitory concentration by broth dilution method in Mueller Hinton broth

AAI : albumin action index = b(+)/b(-)

フィルターを用いて、濾過滅菌を行い、アルブミンを最終濃度 5 g/dl 含む Mueller Hinton broth を調製した。このアルブミン添加 broth を用いて、菌液の調製と薬剤を含む broth を調製し、同様に MIC 測定を行った。

3. 増殖曲線

標準菌株を Mueller Hinton broth にて、37°C で一夜培養した。Mueller Hinton broth, アルブミン添加 broth 及び新鮮ヒト血漿を用いて、最終濃度約 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml となるように菌液を調製した。

SPFX を 2 MIC \times 10 倍, 1 MIC \times 10 倍, 1/2 MIC \times 10 倍濃度含む Mueller Hinton broth, アルブミン添加 broth 及び新鮮ヒト血漿を調製した。

菌液 9 ml に薬剤を含む broth または血漿 1 ml を加え菌量約 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml で各薬剤を 2 MIC, 1 MIC, 1/2 MIC を含む broth 10 ml を 37°C で静置培養し, 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h における生菌数を測定した。

生菌数の測定は、各時間に broth を 0.1 ml 採取し、0.9% 生理食塩液で 10 倍希釈段階を 6 段階作成し、各々を CLED medium に 0.1 ml ずつ滴下しコンラージ棒を用いて広げ、表面培養で 37°C, 18 時間培養後、コロニー数を数え、希釈倍率を乗じて求めた。

II. 結 果

1. MIC 測定

MIC 測定の結果を Table 1 に示す。アルブミンの添加の MIC に与える影響を示す指標として A. A. I. (Albumin Action Index) = [(アルブミンの添加

broth の MIC)/(broth の MIC)] を用いた。アルブミンの添加による MIC の変化は認められなかった。

2. 増殖曲線

増殖曲線の結果を Fig. 1 ~ 3 に示す。

増殖曲線を以下の pattern に分け、培地の差による増殖曲線を菌別、薬剤別に比較した結果を Table 2 に示す。

㊤増菌的 : 24 時間の判定で 0 時間より生菌数が 10^1 以上増加していた。

㊦静菌的 : 24 時間の判定で 0 時間と比較して生菌数の 10^1 以上の増加及び 10^{-1} 以下の減少は認められなかった。

㊧殺菌的 : 24 時間の判定で生菌数は 0 とはならないが、0 時間と比較して、 10^{-1} 以上の菌数の減少が認められたが、 10^{-3} 以下の減少は認められなかった。

㊨完全殺菌 : 24 時間の判定で 10^{-3} 以上の菌数の減少が認められた場合、または n 時間後に測定感度以下で再上昇しなかった。

S. aureus では、アルブミン添加では、8 時間後と 24 時間後の間で再上昇が認められた。新鮮血漿中では殺菌力は維持された。

E. coli では、1 MIC ではアルブミン添加のほうが殺菌力が大きく、2 MIC では新鮮血漿中のほうが早く殺菌された。

P. aeruginosa では、2 MIC のアルブミン添加のみ殺菌的となった。

血液中のアルブミンの SPFX の抗菌力に与える影響

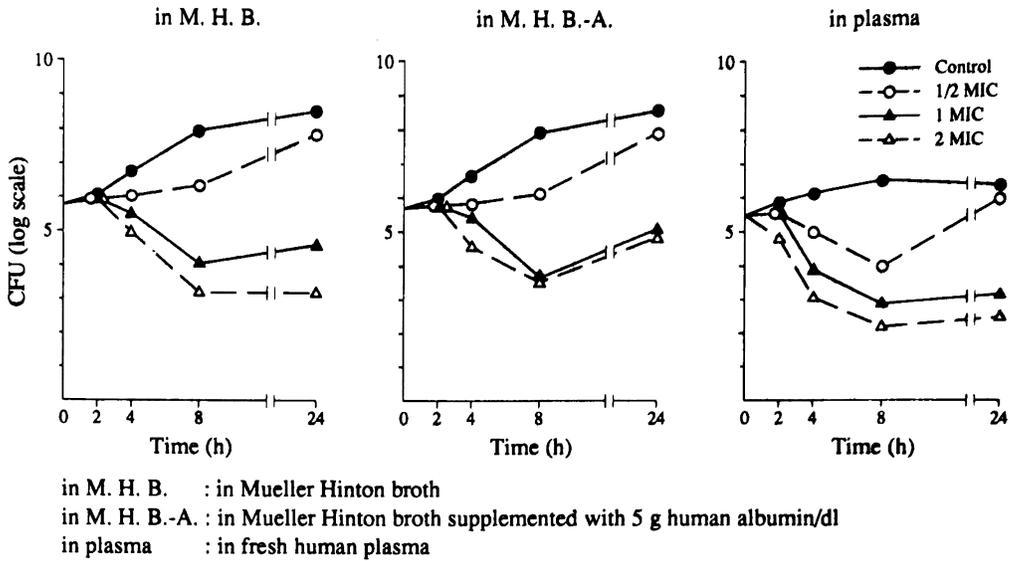


Fig. 1. Comparison of killing curve method of sparflaxacin against *S. aureus* (FDA 209P JC-1) in Mueller Hinton broth, Mueller Hinton broth supplemented with 5 g human albumin/dl and fresh human plasma

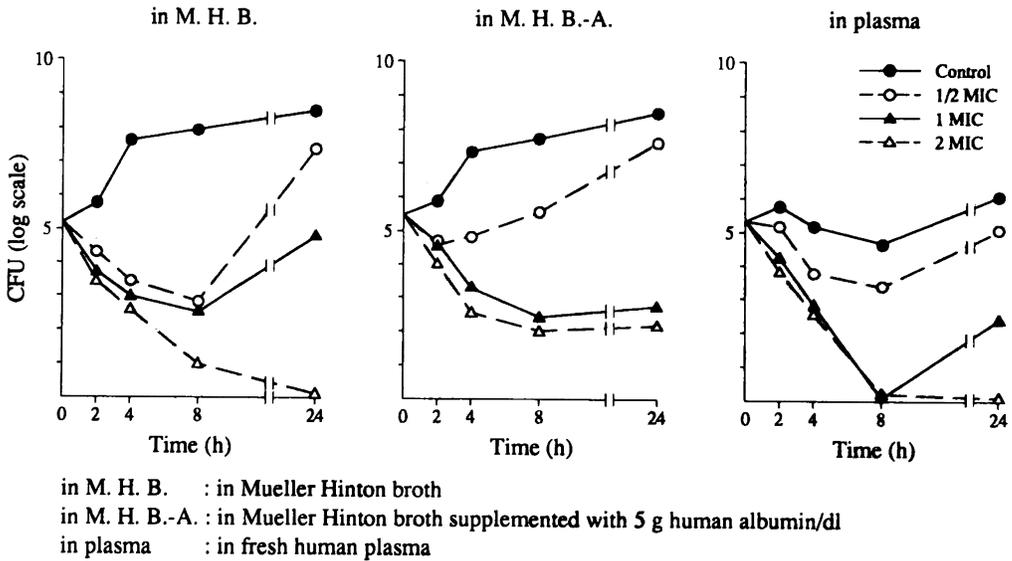
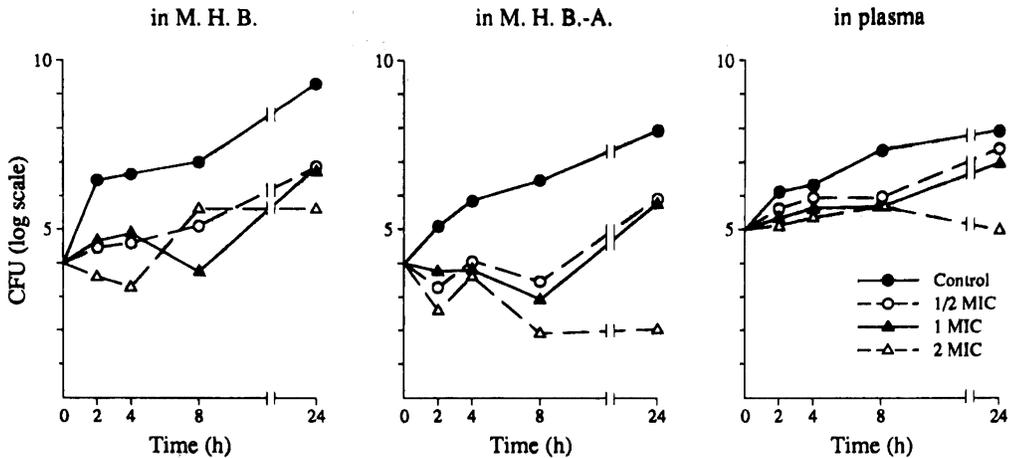


Fig. 2. Comparison of killing curve method of sparflaxacin against *E. coli* (ATCC 25922) in Mueller Hinton broth, Mueller Hinton broth supplemented with 5 g human albumin/dl and fresh human plasma

は少なく、また血漿中でも抗菌力は維持された。

Ⅲ. 考 察

抗菌薬の抗菌力の検討方法として、寒天平板培地による MIC_{50} 、 MIC_{90} 、及び液体培地による MBC 及び増殖曲線が一般に実施されている。体液に近い培地を用いた



in M. H. B. : in Mueller Hinton broth
 in M. H. B.-A. : in Mueller Hinton broth supplemented with 5 g human albumin/dl
 in plasma : in fresh human plasma

Fig. 3. Comparison of killing curve method of sparfloxacin against *P. aeruginosa* (NCTC 10490) in Mueller Hinton broth, Mueller Hinton broth supplemented with 5 g human albumin/dl and fresh human plasma

Table 2. Comparison of killing curve

Strain	Medium	MIC	Control	1/2MIC	MIC	2 MIC
<i>S. aureus</i> FDA 209 P JC-1	MHB	0.10	NO	NO	CIDAL	CIDAL
	+albumin	0.10	NO	NO	STATIC	STATIC
	plasma	—	STATIC	STATIC	CIDAL	CIDAL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MHB	0.05	NO	NO	STATIC	24h
	+albumin	0.05	NO	NO	CIDAL	COMPLETE
	plasma	—	STATIC	STATIC	CIDAL	8 h
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	MHB	0.39	NO	NO	NO	NO
	+albumin	0.39	NO	NO	NO	CIDAL
	plasma	—	NO	NO	NO	STATIC

MHB : Mueller Hinton broth
 +albumin : Mueller Hinton broth supplemented with 5 g human albumin/dl
 plasma : fresh human plasma
 NO [no growth inhibition] : $10^1 \leq$ change between CFU at 0 h and CFU at 24h
 STATIC [bacteriostatic] : $10^{-1} <$ change between CFU at 0 h and CFU at 24h $< 10^1$
 CIDAL [bactericidal] : $10^{-3} <$ change between CFU at 0 h and CFU at 24h $\leq 10^{-1}$
 COMPLETE [complete killing] : change between CFU at 0 h and CFU at 24h $\leq 10^{-3}$
 nh : under detection limit after n hours without regrowth

抗菌力の測定結果は、*in vivo* の成績をより反映すると考えられる。一方、液体培地に全血を添加した系では、蛋白結合、補体系、好中球と単球の貪食能と抗菌薬の相

互作用をみることになる。今回は、蛋白結合の影響について検討した。

Rolinson^{6, 7)}, Kunin⁸⁻¹⁰⁾ 等は, protein binding

と antibacterial activity の関係について、蛋白と結合していない遊離薬剤のみが抗菌力を持ち、蛋白の共存によって遊離薬剤濃度が減少し、抗菌力は蛋白結合率に応じて低下すると述べている。Craig¹¹⁾等は、蛋白結合率80%以上の薬剤では、蛋白結合が *in vivo* の抗菌力に影響する可能性があるとして述べている。蛋白結合の new-quinolone の抗菌力及び殺菌力に及ぼす影響を詳しく検討した報告は、されていない。

Walter¹²⁾は、ヒト脱フィブリン全血を加えた液体培地中で nalidixic acid 及び enoxacin の抗菌力について報告している。蛋白結合についてはなく、好中球と DNA gyrase inhibitor の相互作用について考察している。

Pascal¹³⁾, Pruul¹⁴⁾等は、DNA gyrase inhibitor は好中球中での殺菌能を高めると報告している。Opsonization のために新鮮ヒト血清を添加しているが、濃度は最高でも15%程度である。

SPFX の蛋白結合率は50%⁵⁾程度であるが、血中半減期の長い薬剤に属する。蛋白結合率が高いために血中半減期が長い cefpiramide や cefotetan では¹⁾、培養液中の蛋白により、抗菌力が明らかに低下し、*in vitro* の成績と *in vivo* の成績が乖離する可能性がある。

今回の検討では、体液に近い培地として、ヒトアルブミン添加 MHB 及び新鮮ヒト血漿を使用した。SPFX は、MHB 中と同様の抗菌力を持つことが確認された。このことは MHB で得られた抗菌力の測定結果は、*in vivo* の血中での抗菌力を反映することを示唆している。今後の検討課題として、血漿にさらに好中球を加えたより生体内に近い測定系での検討が重要と考えられる。

文 献

- 1) 西園寺克：人アルブミンのセフェム系、モノバクタム系抗生物質の抗菌力と殺菌力に及ぼす影響の検討。Jap J Antibiotics 41 : 1390~1406, 1988
- 2) Peterson L R, Schierl E A and Hall W H : Effect of protein concentration and binding on antibiotics assays. Antimicrob Agents Chemother 7 : 540~542, 1975
- 3) Reimer L B, Stratton C W and Reller L B : Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. Antimicrob Agents Chemother 19 : 1050~1055, 1981
- 4) Lorian V (Ed.) : Chapter 13 : Protein binding and the antimicrobial effects : methods for the determination of protein binding. Antibiotics in Laboratory Medicine (2nd edition), P.477~508, Williams & Wilkins, 1986
- 5) 上野一恵, 原 耕平, 河田幸道 : 第38回日本化学療法学会西日本支部総会。新薬シンポジウム(2), Sparfloxacin (AT-4140), 岐阜, 1990
- 6) Rolinson G N and Sutherland R : The binding of antibiotics to serum proteins. Brit J Pharmacol 25 : 638~650, 1965
- 7) Rolinson G N : The significance of protein binding of antibiotics in antibacterial chemotherapy. J Antimicrob Chemother 6 : 311~317, 1980
- 8) Kunin C M : Clinical pharmacology of the new penicillin ; The importance of serum protein binding in determining antimicrobial activity and concentration in serum. Clin Pharmacol Ther 7 : 166~188, 1966
- 9) Kunin C M : Clinical significance of protein binding of the penicillins. Ann N Y Acad Sci 145 : 282~290, 1967
- 10) Kunin C M, Craig W A, Kornguth M and Monson R : Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. Ann N Y Acad Sci 226 : 214~224, 1973
- 11) Craig W A and Welling P G : Protein binding of antimicrobials : Clinical pharmacokinetics and therapeutic implications. Clin Pharmacokinet 2 : 252~268, 1977
- 12) Traub W H : Intraphagocytic bacterial activity of bacterial DNA gyrase inhibition against *Serratia marcescens*. Chemotherapy 30 : 379~386, 1984
- 13) Pascal A, Martinez L and Perea E J : Effect of ciprofloxacin and ofloxacin on human polymorphonuclear leukocyte activity against Staphylococci. Chemotherapy 35 : 17~22, 1989
- 14) Pruul H and McDonald P J : Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of Gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils. J Antimicrob Chemother 25 : 91~101, 1990

INFLUENCE OF HUMAN ALBUMIN OR FRESH PLASMA ON BACTERICIDAL OR ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF SPARFLOXACIN

Katsu Saionji

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Juntendo University
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Influence of human albumin and fresh plasma on bactericidal or antibacterial activities of sparfloxacin were examined.

The macro-broth-dilution method was used to determine antibacterial activities. Bactericidal activities were determined using the killing curve method. Used in the broth-dilution method were two media, Mueller Hinton broth (MHB) and the same medium supplemented with 5 g human albumin/dl (MHB-A). The first experiment was to compare minimum inhibitory concentrations (MICs) determined in MHB with those in MHB-A, of sparfloxacin against *Staphylococcus aureus* FDA 209 P JC-1, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* NCTC10490. MICs using MHB-A were equal to MICs using MHB.

In the second experiment, killing curves were determined in the three media, MHB, MHB-A and fresh plasma against three standard strains. The concentrations of the antibiotics used were $1/2 \times \text{MIC}$, $1 \times \text{MIC}$ and $2 \times \text{MIC}$. MICs determined in the first experiment were used here. Killing curves determined in MHB-A and fresh plasma reflected killing curves determined in MHB.

Human albumin did not influence antibacterial and bactericidal activities of sparfloxacin. Sparfloxacin retained bactericidal activities in fresh plasma.