

In vitro pharmacokinetic system を用いた sparfloxacin の抗菌活性の検討

後藤 元・後藤美江子・岡 慎一
浦山京子・木村 哲・島田 馨
東京大学医科学研究所感染症研究部*

Sparfloxacin は 16 時間に及ぶ長い半減期を有するため、1 日 1 回投与による治療の可能性が期待される。そこで computer-programmed *in vitro* pharmacokinetic system を用い、300 mg 1 日 1 回投与モデルの抗菌力を、150 mg 1 日 2 回投与モデルと比較した。

1. *Haemophilus influenzae* および *Escherichia coli* の生菌数は、いずれの投与モデルにおいても、sparfloxacin の添加により、3 時間後に検出限界以下に減少した。

2. *Streptococcus pneumoniae* と *Staphylococcus aureus* においても、300 mg 1 回モデル、150 mg 2 回モデルの双方で、生菌数は 6 時間迄に、2 log 以上減少し、24 時間迄再増殖は抑制された。

3. *Pseudomonas aeruginosa* においては、300 mg 1 回モデルで、生菌数は検出限界以下に減少し、かつ 7 時間迄再増殖が抑制され、この成績は 150 mg 2 回モデルより優れていた。

以上のように今回用いた *in vitro* pharmacokinetic system による検討では、sparfloxacin 300 mg 1 日 1 回用法は、150 mg 1 日 2 回用法に比し、同等ないしは、より優れた抗菌力を示した。

Key words : *In vitro* pharmacokinetic system, Sparfloxacin, *In vitro* 抗菌力, 1 日 1 回用法

Sparfloxacin は、オキソキノリン骨格の 5 位にアミノ基、6 位と 8 位にフッ素、7 位に 3, 5-ジメチルピペラジニル基を配した新キノロン系抗菌薬であり、既存の同系薬剤の中では、最も強い部類に属する抗菌力を持つ¹⁾。その抗菌スペクトルは、肺炎球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌、緑膿菌、セラチアを含むグラム陰性菌、ブドウ糖非発酵菌、嫌気性菌、レジオネラ、マイコプラズマ、クラミジア、結核菌ならびに非定型抗酸菌等、広い範囲にわたっており、特に従来のキノロン系薬剤には低感受性であった肺炎球菌、クラミジア、マイコプラズマ等に対する強い抗菌力は、本剤のひとつの特徴を成している²⁾。

Sparfloxacin の消化管からの吸収は良好で、長時間にわたり血中濃度が持続し、その半減期は 16 時間に及ぶことが報告されている³⁾。したがって、従来本系統薬剤に用いられてきた 1 日 3 回の内服用法に代えて、sparfloxacin では、1 日 1 回の用法により、上記のような優れた抗菌活性を発揮させる可能性がある。

以上のような背景のもとに本研究では、sparfloxacin 1 日 1 回内服用法の有用性を、コンピューター制御によ

る *in vitro* pharmacokinetic system を用いた simulation により検討した。

I. 材料・方法

(1) *In vitro* pharmacokinetic system

本研究に用いた *in vitro* pharmacokinetic system は Grasso ら⁴⁾、Nishida ら⁵⁾ のモデルを応用した dilution type である⁶⁾ (Fig. 1)。One-compartment

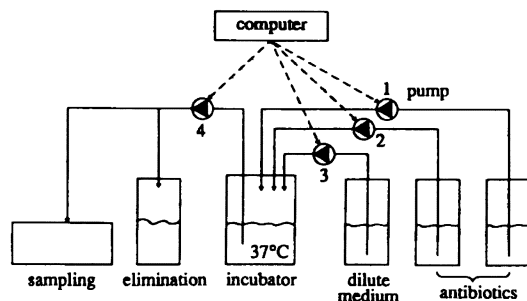


Fig. 1. A diagram of the *in vitro* computer-programmed pharmacokinetic system

open model に基づき、コンピューター制御により作動するポンプ 1、ポンプ 3 によって incubator 内の sparfloxacin および培地の添加量を連続的に調整し、incubator 内に、臨床第 I 相試験で得られた sparfloxacin の血中濃度曲線を再現した。スターラーを回転させつつ 37°C に保った incubator からコンピューター制御のポンプ 4 により、一定時間毎に sampling を行った。採取した検体は、生菌数測定時迄 4°C で冷却保存した。生菌数は、10 倍希釈法により平板接種 24 時間後のコロニー数より求めた。培地は、*Streptococcus pneumoniae* に対しては、Todd Hewitt broth, *Haemophilus influenzae* に対しては Fildes 加 Mueller-Hinton broth, それ以外の菌種に対しては、Mueller-Hinton broth を用いた。

(2) Sparfloxacin の薬動学的パラメーター

本研究では、sparfloxacin 300 mg 1 日 1 回内服時、および 150 mg 1 日 2 回内服時の 2 つの場合につき simulation 実験を行った。前者は Fig. 2 に後者は Fig. 3 に示す。この時使用した sparfloxacin の薬動学的パラメーターは、吸収速度定数 (K_a , (h^{-1})): 0.58, 排泄速度定数 (K_e , (h^{-1})): 0.0506, および分布容積 (V_d (l)): 247 であった。

(3) 使用菌株

グラム陽性球菌として、*S. pneumoniae* (IID553), *Staphylococcus aureus* (209P), グラム陰性桿菌として *Escherichia coli* (NIHJ), *Pseudomonas aeruginosa* (IFO3445), *H. influenzae* (IID984) の 5 菌種を用いた。それぞれの菌株の sparfloxacin に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は、化学療法学会標準法で、各々 0.78 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.025 μ g/ml であった。

II. 成績

(1) *S. pneumoniae*

Fig. 4 に示すように、sparfloxacin を添加しない場合、incubator 中の *S. pneumoniae* の生菌数は、時間 0 における log 5.10 (以下菌数は log にて表示) から 24 時間後 9.60 へと緩やかな増加を示した。Sparfloxacin を添加した場合は、300 mg 1 日 1 回モデル、150 mg 1 日 2 回モデルのいずれにおいても、生菌数は極めて類似した減少を示し、24 時間後には、各々 2.60, 2.50 となった。

このように *S. pneumoniae* については、1 日 1 回および 2 回のいずれの用法においても sparfloxacin の抗菌力は優れており、かつ 24 時間迄菌の再増殖を認めな

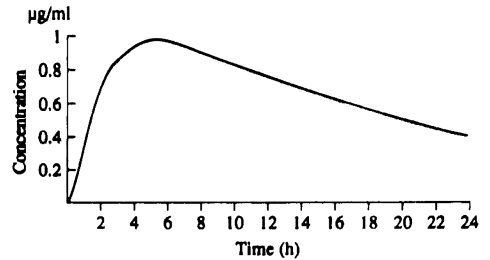


Fig. 2. A kinetics-curve simulating a sparfloxacin-concentration after the oral administration of 300 mg once a day

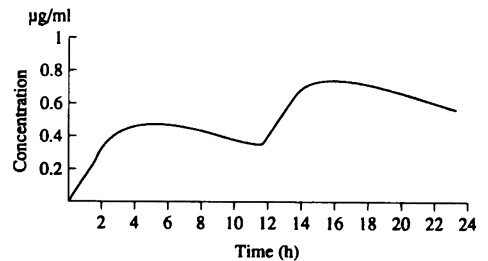


Fig. 3. A kinetics-curve simulating a sparfloxacin-concentration after the oral administration of 150 mg twice a day

S. pneumoniae (IID553) (MIC: 0.78 μ g/ml)

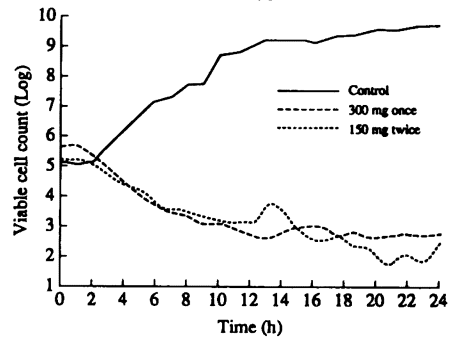
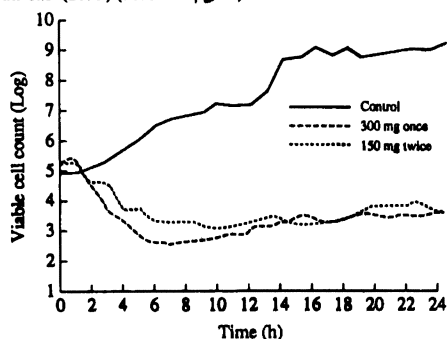
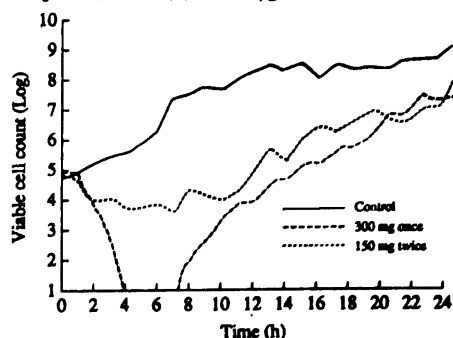
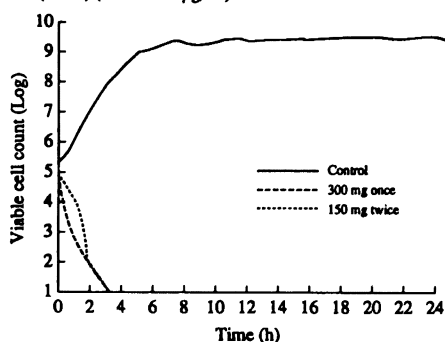
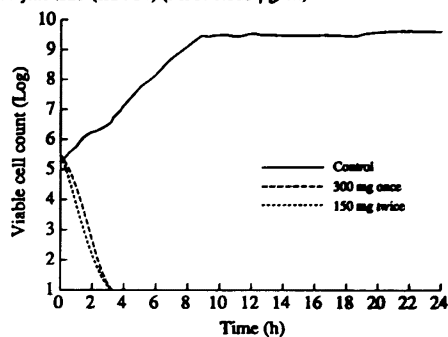


Fig. 4. Viable cell counts of *S. pneumoniae* after the administration of sparfloxacin

かった。

(2) *S. aureus*

S. aureus における成績を Fig. 5 に示す。コントロールにおいて 4.90 から 9.20 に達する *S. aureus* の増殖は、sparfloxacin の添加により、300 mg 1 日 1 回モデルでは 5.20 から 2.60 へと、明らかに抑制されるが、その後僅かな増加傾向を認め、24 時間後の生菌数

S. aureus (209P) (MIC: 0.1 µg/ml)Fig. 5. Viable cell counts of *S. aureus* after the administration of sparfloxacin*P. aeruginosa* (IFO3445) (MIC: 0.2 µg/ml)Fig. 7. Viable cell counts of *P. aeruginosa* after the administration of sparfloxacin*E. coli* (NIHJ) (MIC: 0.05 µg/ml)Fig. 6. Viable cell counts of *E. coli* after the administration of sparfloxacin*H. influenzae* (IID984) (MIC: 0.025 µg/ml)Fig. 8. Viable cell counts of *H. influenzae* after the administration of sparfloxacin

は、3.60であった。150 mg 1日2回モデルにおける生菌数も同様に3.10へ減少した後やや増加し、24時間後には3.60であった。

(3) *E. coli*

コントロール実験では *E. coli* は5.10から6時間後には9.00に増加し、24時間後では9.20であった (Fig. 6)。

Sparfloxacin は、*E. coli* の増殖を極めて強力に阻止し、添加3時間以降、生菌数は全て1.0以下に留まった。300 mg 1回および150 mg 2回の2つの用法間に抗菌力の差異は認められなかった。

(4) *P. aeruginosa*

P. aeruginosa は Fig. 7 のように incubator 内で4.60から8.90へと緩やかに増殖した。

Sparfloxacin 300 mg 1回モデルでは生菌数は、薬剤添加4時間後に1.0以下となり、7時間迄この抑制は続いた。8時間以後 *P. aeruginosa* の再増殖が観察さ

れ、15時間後に実験開始時の生菌数に迄回復し、さらに24時間後には生菌数は7.20となった。

一方150 mg 2回モデルでの生菌数はこれとは異なり、150 mg 1回目添加後生菌数は減少するものの、その減少幅は、ほぼ1 log に留まり、300 mg モデルに劣っていた。本モデルでは、12時間での2回目の sparfloxacin 150 mg 添加にも拘らず、菌は再増殖を続け、24時間後の生菌数は7.90に達した。

(5) *H. influenzae*

H. influenzae に対する sparfloxacin の抗菌力は、*E. coli* に対する場合と同様極めて優れていた (Fig. 8)。

コントロールにおいて生菌数は、5.30から9.40へ増加したが、sparfloxacin 添加モデルでは300 mg, 150 mg モデルのいずれにおいても、3時間以後24時間迄生菌数は全て1.0以下に抑制された。

考 察

従来、抗菌薬の *in vitro* における抗菌力は、菌液に一定濃度の薬剤を添加し、その場合の生菌数から評価されてきた。しかしヒト体内において、抗菌薬の濃度は一定ではなく、例えば sparfloxacin については、内服後4ないし6時間で、血漿中濃度は最高値約 $1 \mu\text{g/ml}$ (C_{max}) に達した後、半減期 ($T_{1/2}$) およそ16時間で緩やかに減少し、24時間後には、ほぼ $0.5 \mu\text{g/ml}$ へ減少するという動態を示す²⁾。したがって sparfloxacin についてその抗菌力をより正確に評価しようとする場合、こうした sparfloxacin の血中濃度を *in vitro* で再現し、その条件下での被検菌の生菌数変化を測定する方法がより優れていると考えられる⁴⁻⁶⁾。

本研究に用いたコンピューター制御による *in vitro* pharmacokinetic system は、こうした解析を可能とし、sparfloxacin の抗菌力についても、幾つかの興味ある所見を提供した。

その第1は、*S. pneumoniae* においてみられた所見である。本研究に用いた *S. pneumoniae* の MIC は $0.78 \mu\text{g/ml}$ であり、したがって 300 mg モデルでは2時間から10時間にかけてこの MIC を上回る薬剤濃度が得られているが、一方 150 mg モデルでは、少なくとも12時間迄は薬剤濃度は、常に MIC に達してはいない。しかし Fig. 4 に示すように *S. pneumoniae* の生菌数の減少は、以上の2つのモデル間で差異はなく、したがって上記の MIC 値と薬剤濃度間の関係は、必ずしも正確に生菌数減少度と関係しないことが示された。

第2点は、*S. aureus* でみられた所見である。この場合の MIC は $0.1 \mu\text{g/ml}$ であり、300 mg 1回、150 mg 2回のいずれのモデルにおいても24時間迄、常に MIC を上回る薬剤濃度が得られており、特に後者においては、12時間後に薬剤の再添加がなされているにも拘らず、再添加後の生菌数は24時間にかけて、僅かではあるが漸増傾向を示していた。このように *S. aureus* についても MIC 値は、必ずしも生菌数減少度で測られる抗菌力の評価とは平行しない場合があることを示した。

同様な成績は、*P. aeruginosa* の場合においても示された。すなわちこの場合 300 mg 1回モデルでは sparfloxacin 添加後生菌数は 1.0 以下に減少したが、8時間以降未だ4ないし5 MIC の sparfloxacin の存在下で菌の再増殖が認められ、また一方 150 mg モデルでは1回目の添加後認められた 1 log の生菌数減少は12時間後の同量の sparfloxacin 添加時には消失していた。

実際の生体内においては、宿主の防御機能が大きく損なわれていない限り、sparfloxacin の添加により減少

した生菌は、宿主の液性、細胞性防御機構の存在により、その時点で処理されてしまい、以後の再増殖は実際には起こり得ないことは十分に予測され、上記のような *in vitro* の成績で必ずしも抗菌力の全てを説明し得ない可能性はある。しかしこうした *in vitro* の simulation 実験の成績は従来のいわば static な *in vitro* 試験の成績に多くの新たな知見を加え得るものと考えられる⁷⁾。

Sparfloxacin については、上述のごとく、その大きな特徴は、既存の新キノロン剤にはない、16時間に及ぶ長い半減期を有する点にあり²⁾、したがって1日1回内服という新たな用法により、十分な効果を期待し得る可能性がある。

本実験では 300 mg 1日1回用法モデルの成績は、今回検討した5菌種の全てについて 150 mg 1日2回用法モデルと同等か、あるいは特に *P. aeruginosa* においては、より優れていた。この両者間の差異については、 C_{max} 、area under the curve (AUC) 等、幾つかの因子が関与することが考えられ、かつ MIC とこれらのパラメーターとの関係についても特に *P. aeruginosa* の場合のように必ずしも単純ではないが⁷⁾、従来法に比し、より正確なヒト体内動態を simulate した系により得られたこの成績は、sparfloxacin 1日1回内服用法の有有用性についての *in vitro* 系によるひとつの根拠となりうるものと考えられる。

実際マウスを用いた *in vivo* 実験においても、sparfloxacin は1日1回用法により、常に1日2回用法を上回る抗菌力を示すことが報告されており²⁾、この成績は、逆に我々の用いた *in vitro* pharmacokinetic system による simulation 実験の成績が、*in vivo* の成績とよく相関することを示唆しているものと考えられ興味深い。

文 献

- 1) Miyamoto T, et al.: Synthesis and structure-activity relationships of 5-substituted 6,8-difluoroquinolones, including sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent with improved potency. *J Med Chem* 33: 1645~1656, 1990
- 2) Nakamura S, et al.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AT-4140, a new broad-spectrum quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1167~1173, 1989
- 3) Nakamura S, Kurobe N, Ohue T, Hashimoto M and Shimizu M: Pharmacokinetics

- of a novel quinolone, AT-4140, in animals. *Antimicrob Agents Chemother* 34 : 89~93, 1990
- 4) Grasso S, Meinardi G, Decarneri I and Tamassia V : New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 13 : 570~576, 1978
- 5) Nishida M, Murakawa T, Kamimura T and Okada N : Bacterial activity of cephalosporins in an *in vitro* model simulating serum levels. *Antimicrob Agents Chemother* 14 : 6~12, 1978
- 6) 島田 馨, 稲松孝思, 浦山京子, 岡 慎一 : Cefuroxime axetil (CXM-AX) の薬動学的モデルを用いた基礎的ならびに臨床的研究. *Chemotherapy* 34 (S-5) : 485~491, 1986
- 7) 後藤 元, 後藤美江子, 岡 慎一, 浦山京子, 木村 哲, 島田 馨, 稲松孝思 : *In vitro* 効果と *in vivo* 効果の差異の解析-体内動態を中心に-. *Ther Res* 11 : 3639~3644, 1990

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SPARFLOXACIN USING *IN-VITRO* PHARMACOKINETIC SYSTEM

Hajime Goto, Mieko Goto, Shinichi Oka, Kyoko Urayama,
Satoshi Kimura and Kaoru Shimada

Department of Infectious Diseases, Institute of Medical Science,
University of Tokyo

4-6-1 Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Sparfloxacin is characterized by its long half-life ($T_{1/2}$; 16 hours). Based on this feature, its availability as a "once a day" treatment was assessed in an *in vitro* computer-programmed pharmacokinetic system using a one-compartment open model.

Viable cell counts of *Haemophilus influenzae* as well as *Escherichia coli* decreased to undetectable levels at 3 hours after the administration of sparfloxacin in both the "300 mg once a day" and "150 mg twice a day" simulation models. In *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, sparfloxacin treatments of 300 mg once or 150 mg twice depressed the cells to more than 2 log levels without marked regrowth until 24 hours. The cell counts of *Pseudomonas aeruginosa* treated once with 300 mg of sparfloxacin were lower than those with 150 mg twice. In the former, no detectable cells were found until 7 hours.

Thus, sparfloxacin showed a sufficient antibacterial activity in a model simulating "once a day" administration.