

キノロン系抗菌剤levofloxacinのヒト好中球内への移行に関する検討

我謝道弘・比嘉 太・山城 哲・仲本 敦・宮良高維・新里 敬
 菅久原 浩・橘川桂三・伊良部勇栄・重野芳輝・斎藤 厚
 琉球大学医学部第一内科*

キノロン系抗菌剤levofloxacin(LVFX, DR-3355)は、ofloxacin(OFLX)の一方の光学活性S(-)体であり、その抗菌力はOFLXのほぼ2倍である。LVFXおよびその他方の光学活性R(+)体であるDR-3354ならびにOFLXのヒト好中球細胞内移行性につき比較検討した。

好中球をLVFX, DR-3354, OFLXを含む培養液中にてそれぞれ培養後、好中球を採取し、これら薬剤の好中球細胞内濃度および培養後の細胞外濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定し、細胞内濃度の細胞外培養濃度に対する比率を算出した。

培養濃度50 μ g/ml, 培養時間30分の条件下でのLVFX, DR-3354およびOFLXの細胞内濃度/細胞外培養濃度比は、それぞれLVFX 8.83 \pm 1.27, DR-3354 9.97 \pm 0.75, OFLX 9.07 \pm 0.72であり、これら薬剤の好中球細胞内移行性に差は認められなかった。

また、培養濃度と好中球内移行率との相関につき、LVFXおよびDR-3354を用い検討したが、培養濃度10, 25, 50, 100 μ g/mlの範囲内では2薬剤の移行率に大きな変化は認められなかった。

ラセミ体であるOFLXを2つの光学異性体に分割しても、ヒト好中球内移行性に関しては光学異性体間に差異はみられず、いずれもOFLXに近似した移行性を示すことが明らかとなった。

Key words : Levofloxacin(LVFX), DR-3355, Isomer of ofloxacin, 好中球内移行, HPLC

キノロン系抗菌剤であるofloxacin(OFLX)は、その構造中に1個の不斉炭素有し、S(-)体およびR(+)体より成るラセミ体である。抗菌活性に関し2つの異性体間には明らかな差異が認められ、S(-)体であるLVFXはOFLXのほぼ2倍の抗菌活性を有するが、R(+)体であるDR-3354の抗菌活性は弱いことが報告されている¹⁻³⁾。

今回我々は、この両光学異性体の細胞内移行性に差異があるのか否か、ヒト多形核好中球を用い、細胞内濃度および細胞外培養濃度をHPLCにて測定し、その比率を算出することにより検討したので、その成績を報告する。

I. 材料および方法

方法は古賀ら⁴⁾の用いた方法に準じた。以下、変更した部分を含め概要を記す。

1. ヒト多形核好中球(Polymorphonuclear neutrophil, 以下PMNと略)の採集

健康成人の末梢静脈血を30mlヘパリン加採血し、6%デキストラン含有生理食塩水およびFicoll-Paque液(Pharmacia LKB Biotechnology Inc.)を使用しPMN

を分離した。血液4容に対し6%デキストラン含有生理食塩水1容を加えよく攪拌後、30分間静置し赤血球を沈降させ、その上清を回収した。Ficoll-Paque液5mlを15ml容の滅菌プラスチックチューブ(Corning)に入れ、その上に回収した上清10mlを重層し500Gにて10分間室温にて遠心した。

得られた沈渣には一部赤血球が含まれるため、0.2%NaCl液で20秒間低張処理を行い、赤血球を溶血させた後、1.6%NaClを等量加え等張に戻し、遠心後上清を捨てる。この操作を2から3回繰り返し赤血球を除去した後、Hanks balanced salt solution(以下HBSSと略)に 5×10^7 cells/mlとなるように得られたPMNを浮遊させた。

2. PMNと抗菌剤の混合培養

1.で得られたPMN浮遊液5mlにHBSSで200, 100, 50, 20 μ g/mlに調整したLVFX, DR-3354, OFLX(いずれも第一製薬株式会社より提供)溶液を等量加え培養した。培養時間はOFLXを用いた予備試験より30分間とした。

培養後、再度PMNの細胞数を計測し、300Gで10分

*〒903-01 沖縄県中頭郡西原町字上原207

間遠心後、上清を1ml残して捨て、その上清1ml中にPMNを再浮遊させた。

3. PMNの培養液からの分離

PMNと培養液との分離はシリコン油による濃度勾配遠心分離法を用いた。

1.5mlのmicrocentrifugation tubeにシリコン油(トーレ・シリコン株式会社. SH550:SH556=6:5に混合)を0.5ml入れ、その上にPMN浮遊液を0.5ml重層し、12,000G, 4℃にて3分間遠心した。その後、-70℃で完全に凍結させた後、上清とシリコン油、シリコン油とPMN層の間をメスで切断した。上清は溶解しそのまま細胞外培養濃度(E)測定用検体とした。

PMN層は1mlの蒸留水に再浮遊させ、凍結・融解を2回繰り返す、PMNを完全に破壊後、0.22 μ mの低吸着性のmembrane filter (MILL EX-GV, Milipore Co.Ltd.)にて濾過し、細胞膜等の残骸を除去した後、細胞内濃度(I)測定用検体とした。

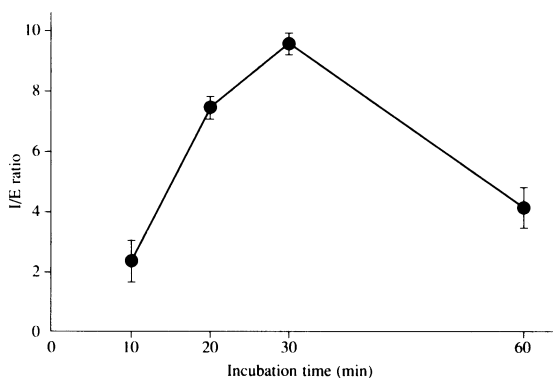
4. HPLCによる薬剤濃度の測定

HPLCによる測定は、以下に示す条件で行った。

pump; TRIROTAR-V, injector; VL-614, detector; UVIDEC-100-V (日本分光株式会社), column; Nucleosil-5, C18(センシュエ科学株式会社), 移動相; 0.2%テトラエチルアンモニウムリン酸緩衝液(pH 1.85)/アセトニトリル(85:15), 流速; 1.5ml/min.

上記条件で各薬剤につき検量線を作成し、各検体の薬剤濃度を求めた。

真崎らの報告⁵⁾に従い、PMNの容積を 1×10^7 cellsあたり2.15 μ lとして細胞内の薬剤濃度を算出し、細胞外培養濃度に対する比率(I/E)を求めた。



Mean ± S. D., n=3. Extracellular concentration of incubation: 50 μ g/ml

Fig. 1. The relationship of I/E ratio to incubation time. There is statistical difference between the mean ratio at 30 minute and other time points.

II. 結 果

1. 培養時間の検討

OFLXを10, 20, 30, 60分間培養した場合のI/E比をFig.1に示す。

それぞれの培養時間でのI/E比は10分で 2.42 ± 0.72 , 20分で 7.48 ± 0.33 , 30分で 9.57 ± 0.35 , 60分で $4.18 \pm 0.67 \mu$ g/mlであった。培養時間30分のI/E比と、その他の培養時間のI/E比との間に、1%の危険率で有意差(t-検定)を認めたので、以後の検討は培養時間30分で行うこととした。

2. LVFXおよびDR-3354のPMN内への移行性

培養濃度を変えて測定したLVFXおよびDR-3354のI/E比をFig.2に示す。

培養濃度10 μ g/mlの場合, LVFX 7.01, DR-3354 7.63, 25 μ g/mlではLVFX 9.63, DR-3354 9.47, 50 μ g/mlではLVFX 8.93, DR-3354 9.97, 100 μ g/mlではLVFX 8.02, DR-3354 7.10であった。両薬剤とも培養濃度の変化によりI/E比に変化は認められず、また、両薬剤のI/E比は各濃度においてほぼ同じ値であった。

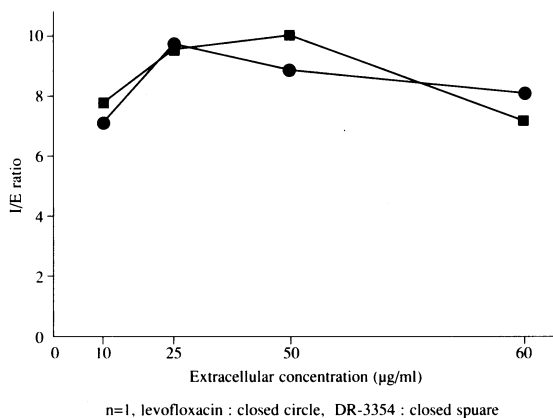
3. LVFX, DR-3354およびOFLXのI/E比の比較

培養濃度50 μ g/ml, 培養時間30分の条件下でのLVFX, DR-3354, OFLXのI/E比をFig.3に示す。

I/E比はLVFX 8.83 ± 1.27 , DR-3354 9.97 ± 0.75 , OFLX 9.07 ± 0.72 であり、3薬剤間のI/E比に統計学的な有意差(t-検定)は認められなかった。

III. 考 察

LVFXはOFLXの一方の光学異性体S(-)体であり、OFLXの2倍の抗菌力を有し、OFLXの活性本体と考え



n=1, levofloxacin: closed circle, DR-3354: closed square

Fig. 2. The penetration of I/E ratio to extracellular concentration.

られている。DR-3354は他方の光学異性体R-(+)体であり、LVFXの1/8~1/128の弱い抗菌力しか有しておらず、両異性体間には明らかな抗菌力の差異が認められている¹⁾。

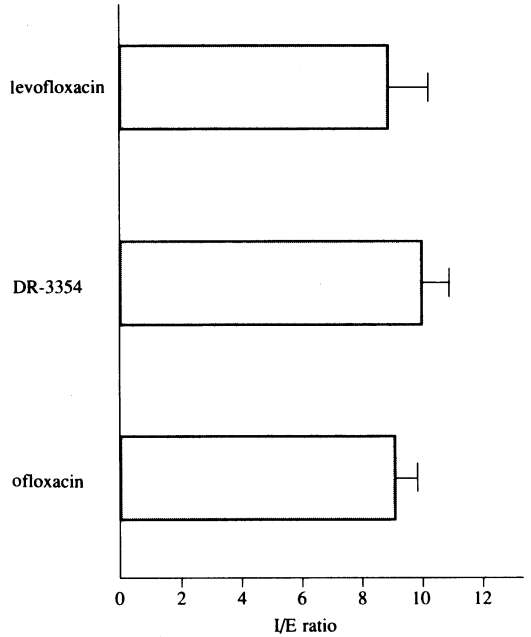
細菌の中には、好中球やマクロファージ等食細胞に貪食されてもその細胞内で生存、増殖し、そのために感染を難治化させる細胞内寄生性病原体と呼ばれる菌種が存在する。これら細菌による感染症を治療する場合は、使用する抗菌剤は、当該細菌に対し抗菌力を有することは勿論のことであるが、さらに宿主細胞内へ良好に移行することが要求される⁶⁻¹⁰⁾。

古賀らはOFLXのヒト多形核好中球内への移行性につき検討し、OFLXの細胞外培養濃度に対する細胞内濃度比は8.10であり、良好な移行が認められたことを報告している⁴⁾。今回我々は、OFLXおよび2つの光学異性体のヒト多形核好中球内への移行性の差異を、それぞれの薬剤につき細胞内濃度および培養後の細胞外濃度をHPLCにて測定し、その比率を算出することにより比較検討した。

ヒト多形核好中球内への移行性に関し、ラセミ体であるOFLXの光学異性体LVFXおよびDR-3354間に差異は認められず、いずれもOFLX同様良好であった。LVFXの細胞内移行性はOFLXと同等であり、その抗菌力はOFLXの約2倍であることを考慮すると、LVFXは上記細胞内寄生性細菌による感染症に対しても、同量の投与量ではOFLXに比しより高い効果が期待でき、また、OFLXの半分の投与量でも同等の効果が期待でき、投与量を減じ得ることにより副作用の発現をより軽減できることが示唆された。

文 献

- 1) Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, Imamura M, Sakano K, and Furukawa M: Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 163~164, 1986
- 2) Tanaka M, Otsuki M, Une T, and Nisino T: *In vitro* and *in vivo* activity of DR-3355, an optically active isomer of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 26: 659~666, 1990
- 3) Fujimoto T and Mitsuhashi S: *In vitro* antibacterial activity of DR-3355, the S-(-)-isomer of ofloxacin. *Chemotherapy (Switzerland)* 36: 268~276, 1990
- 4) 古賀宏延, 他: 各種抗生剤のヒト多形核好中球内への移行に関する研究. *Chemotherapy* 33: 688~695, 1985
- 5) 真崎美矢子, 他: マクロライド系抗生剤のヒト好中球内への移行に関する研究. *Chemotherapy* 35: 709~713, 1987
- 6) Mackaness G B: The action of drugs on intracellular tubercle bacilli. *J Pathol Bacteriol* 64: 429~446, 1952
- 7) Showacre J L, Hopps H E, Du Buy H G, and Smadel J E: Effect of antibiotics on intracellular *Salmonella typhosa*. I. Demonstration by phase microscopy of prompt inhibition of intracellular multiplication. *J Immunol* 87: 153~161, 1961
- 8) Eason C S F: The effect of antibiotics on the intracellular survival of *Staphylococcus aureus in vitro*. *Br J Exp Pathol* 60: 24~28, 1979
- 9) Horwitz M A and Silverstein S C: Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 66: 441~450, 1980
- 10) Kitsukawa K, Hara J, and Saito A: Inhibition of *Legionella pneumoniae* in guinea pig peri-



Mean±S. D., n=3, There was no significant difference between each drug.
Incubation time : 30 minutes
Extracellular concentration of incubation : 50 µg/ml

Fig. 3. Penetration of the drugs into human PMN.

toneal macrophages by new quinolone, macro-
lide and other antimicrobial agents. J Antimic-

rob Chemother 27: 343 ~353, 1991

PENETRATION OF LEVOFLOXACIN, A NEW QUINOLONE ANTIBACTERIAL AGENT, INTO HUMAN NEUTROPHILS

Michihiro Gaja, Futoshi Higa, Tetsu Yamashiro, Atsushi Nakamoto, Takayuki Miyara,
Takashi Shinzato, Hiroshi Fukuhara, Keizou Kitsukawa, Yuei Irabu, Yoshiteru Shigeno
and Atsushi Saito

The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of the Ryukyus,
207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa, 903-01, Japan

Levofloxacin (LVFX, DR-3355), a new quinolone antibacterial agent, is the *S*-(-) isomer of ofloxacin (OFLX). The antibacterial activity of LVFX is twice as potent as OFLX. In this study, human neutrophil penetration by LVFX was studied and compared with that of DR-3354, the other isomer, and OFLX.

Human neutrophils were incubated in medium containing LVFX, DR-3354 or OFLX. After isolation of the cells, the intracellular drug concentration was measured by HPLC and compared with the extracellular drug concentration.

When the cells were incubated at a drug concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, the ratios of intracellular/extracellular drug concentrations after 30 minutes of incubation were: LVFX 8.83 ± 1.27 , DR-3354 9.97 ± 0.75 and OFLX 9.07 ± 0.72 . No significant difference in neutrophil penetration was thus found among the three agents.

In the next experiment, the effect of the extracellular concentration on the penetration was examined using LVFX and DR-3354. No differences were observed in the penetration rates of the two agents at extracellular concentrations of 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$.

These study results indicate that there is no difference in neutrophil penetration among OFLX and its two optical isomers.