

In vitro pharmacokinetic model を用いた fleroxacin の殺菌作用の検討

若林 栄二・保坂 雅喜・平井 敬二

杏林製薬㈱中央研究所*

(平成 5 年 10 月 1 日受付・平成 6 年 2 月 23 日受理)

Fleroxacin の殺菌作用を *in vitro* pharmacokinetic model を用いて検討した。Fleroxacin 300 mg 1 日 1 回内服時の血中濃度推移を再現したモデルにおいて *Staphylococcus aureus* および *Escherichia coli* は速やかに殺菌され、24 時間 regrowth は観察されなかった。一方、*Pseudomonas aeruginosa* は薬剤添加後、検出限界以下まで殺菌されたものの、12 時間後より regrowth がみられた。この regrowth は 12 時間後に薬剤を再添加 (1 日 2 回内服) したモデルにおいても抑制されず 1 日 1 回内服モデルと同等の効果であった。この *in vitro* model を用いて、fleroxacin の殺菌作用におよぼす薬動学的パラメーターの影響を検討した結果、fleroxacin 添加後の殺菌力はピーク濃度に、その後の菌増殖抑制効果は薬剤消失速度 (あるいは Time above MIC) に依存していた。

Key words: fleroxacin, 殺菌作用, *in vitro* pharmacokinetic model

キノロン薬は MIC レベル以上の濃度において殺菌作用を示すことが知られている¹⁾。抗菌薬の *in vitro* 殺菌作用の検討では、菌液に一定濃度の薬剤を添加し、ある一定時間作用させた状態での生菌数の変化を観察している場合が多い。しかし、生体内に投与された薬剤の濃度は、それぞれの組織においてその薬剤固有の薬動学的パラメーターにしたがって推移する。

Fleroxacin はヒトにおいて内服後、消化管よりほぼ完全に吸収され、高い血中濃度を示した後、約 10 時間の半減期を示しながら消失することが報告されている²⁾。そこで我々は、fleroxacin のこの薬動学的特徴が殺菌作用にどのように反映するかを検討するため *in vitro* pharmacokinetic model を用いて種々の菌に対する殺菌効果を検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 薬剤

Fleroxacin (FLRX), ciprofloxacin (CPFX), および tosufloracin (TFLX) は杏林製薬株式会社で合成された原末を使用した。

2. 試験菌株

以下の 3 菌株を用いた。

Staphylococcus aureus Smith

(Fleroxacin の MIC, 0.39 µg/ml)

Escherichia coli ML4707

(Fleroxacin の MIC, 0.05 µg/ml)

Pseudomonas aeruginosa IID 1210

(Fleroxacin の MIC, 1.56 µg/ml)

(Tosufloxacin の MIC, 0.39 µg/ml)

(Ciprofloxacin の MIC, 0.39 µg/ml)

3. *In vitro* pharmacokinetic model における殺菌作用の検討

In vitro pharmacokinetic model は Grasso らの方法³⁾に従い、one compartment model として作成した。実験に用いた装置を Fig. 1 に示した。A および B にはそれぞれ薬液、希釈用培地を用意し、gradient mixer および peristaltic pump を用いてそれぞれの流速 F_1 , F_2 (このとき $F_1 + F_2 = F_3$) の割合を調節することにより、各薬剤の kinetics にあわせた薬剤濃度推移を C 内に再現した。すなわち、pump で設定する流速 F_3 は $F_3 = Ke/Vc$ に従って、ヒトにおける薬剤消失速度定数 Ke および C の容量 Vc から算出された値に調節した。吸収相に相当する薬剤濃度の上昇域では吸収速度定数 Ka にあわせた流速 $F_1 = F_3 \cdot e^{-Ka \cdot t}$ で薬液を C に注入した。このような設定のもとに内服後の薬動学的パラメーターにあわせた濃度推移を再現した。なお、B および C の培地には Mueller Hinton broth (Difco) を用いた。各試験菌株は薬剤の添加 1 時間前に、約 10^6 CFU/ml となるよう C 内に接種し、薬剤添加まで攪拌培養した。殺菌効果の検討は、経時的に培地を採取し生菌数を測定す

* 栃木県下都賀郡野木町御手洗 2399-1

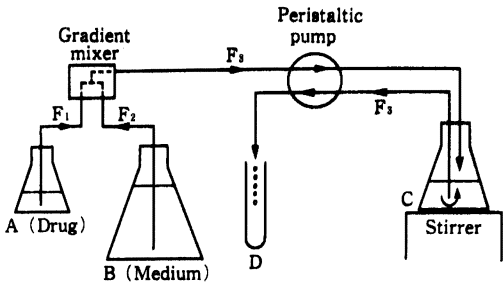


Fig. 1. Apparatus for simulation of serum concentration of drug after oral administration.

ることによって判定した。また、各薬剤のヒトにおける薬動力学的パラメーターは第1相臨床試験^{2,4,5)}の結果から算出された値を用いた。

II. 結 果

1. ヒトの血中濃度推移下での殺菌効果の検討

Fleroxacinを200 mgあるいは300 mg内服したときのヒト血中濃度に simulate させた *in vitro* model を用いて、*S. aureus* Smith, *E. coli* ML 4707, および *P. aeruginosa* IID 1210 に対する fleroxacin の殺菌効果を検討した。*in vitro* pharmacokinetic model における薬剤の濃度推移を Fig. 2 に、各菌株の生菌数の変動を Fig. 3~5 に示した。

S. aureus に対しては、200 mg および 300 mg 内服のモデルにおいて薬剤濃度の上昇とともに速やかな殺菌作用が観察された。300 mg 内服のモデルでは24時間後まで菌の regrowth は見られず生菌数は検出限界以下であったが、200 mg 内服のモデルでは24時間後にわずかながら菌数の上昇がみられた。

E. coli は両モデルにおいて薬剤添加2時間以内に

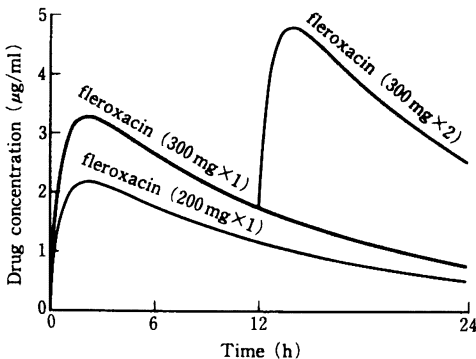


Fig. 2. Time-concentration curves simulating the serum level of fleroxacin after the oral administration of 200 and 300 mg.

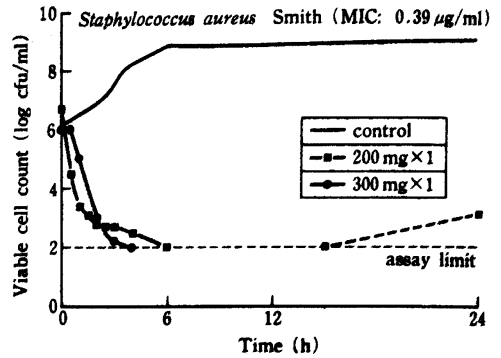


Fig. 3. Bactericidal activity of fleroxacin against *Staphylococcus aureus* in *in vitro* pharmacokinetic model.

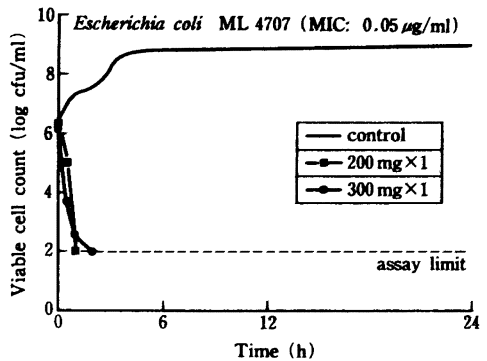


Fig. 4. Bactericidal activity of fleroxacin against *Escherichia coli* in *in vitro* pharmacokinetic model.

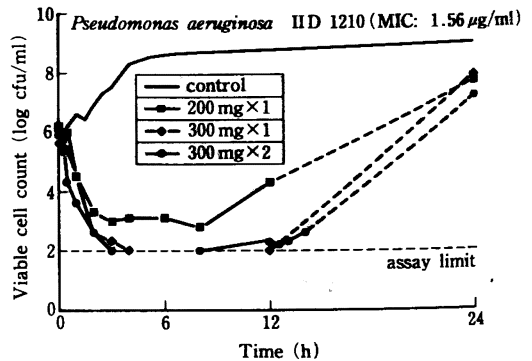


Fig. 5. Bactericidal activity of fleroxacin against *Pseudomonas aeruginosa* in *in vitro* pharmacokinetic model.

検出限界以下まで殺菌され以後 24 時間後まで regrowth は見られなかった。

P. aeruginosa に対しては 300 mg 内服のモデルにおいて薬剤添加 4 時間後までに検出限界以下まで殺菌したものの、12 時間後より regrowth が見られ、24 時間後には無処理群と同程度まで菌数は増殖していた。さらに、12 時間後に薬剤を再添加した場合でも再増殖はわずかに抑制されたのみであった。

次に、*P. aeruginosa* に対する fleroxacin 300 mg 1 日 1 回内服モデルにおける殺菌効果を、ciprofloxacin および tosufloxacin の通常臨床用量でえられる血中濃度推移に simulate したモデルにおける効果と比較した。すなわち、ciprofloxacin は 200 mg 1 日 2 回 (12 時間毎)、tosufloxacin は 150 mg 1 日 2 回 (12 時間毎) 内服のモデルを組み立て、*P. aeruginosa* に対する殺菌効果を測定した。各薬剤の血中濃度推移を Fig. 6 に、そのときの菌数変動を Fig. 7 に示した。Fleroxacin は *in vitro* モデルにおいて tosufloxacin より強い殺菌効果を示した。Ciprofloxacin は最初の薬剤添加後に検出限界以下まで菌を殺菌したものの、6 時間後より regrowth がみられ、12 時間後の 2 回目の薬剤添加によっても fleroxacin の場合と同様、菌はわずかに減少したのみであった。

2. Fleroxacin の殺菌作用におよぼす薬動学的パラメーターの影響

Fleroxacin のヒトにおける薬動学的特徴の殺菌作用におよぼす影響を検討するため、薬剤の消失半減期 ($T_{1/2}$)、ピーク濃度 (C_{max}) を変化させた *in vitro* model を設定し、ヒトの pharmacokinetic model における殺菌効果と比較した。

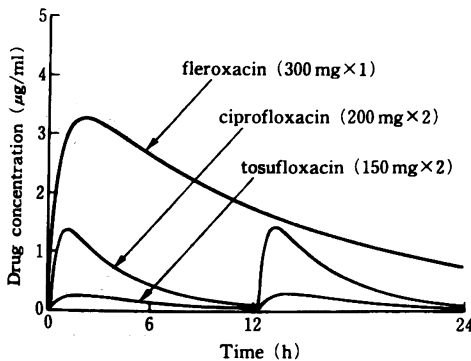


Fig. 6. Time-concentration curves simulating the serum levels of fleroxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin after the respective clinical dosings.

(1) 薬剤消失半減期の影響

Fleroxacin 300 mg 1 回内服時の薬剤消失半減期 (10 h) をもとに、半減期をその 1/10 (1 h) および 1/2.5 (4 h) に設定し、*S. aureus* および *P. aeruginosa* に対する殺菌効果を検討した。In vitro model における薬剤濃度推移を Fig. 8 に、*S. aureus* および *P. aeruginosa* に対する殺菌効果をそれぞれ Fig. 9 および 10 に示した。なお、各モデルにおける最高血清中濃度は一定とした。

S. aureus に対する作用では、各モデル間で初期の殺菌効果にいくらか違いがみられたが、その後の regrowth は Time above MIC にほぼ依存しておこっていた。すなわち、Model 1 では薬剤濃度が MIC

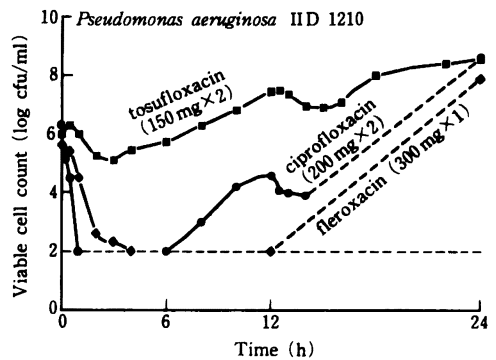


Fig. 7. Comparison of bactericidal activity of fleroxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* in *in vitro* pharmacokinetic models.

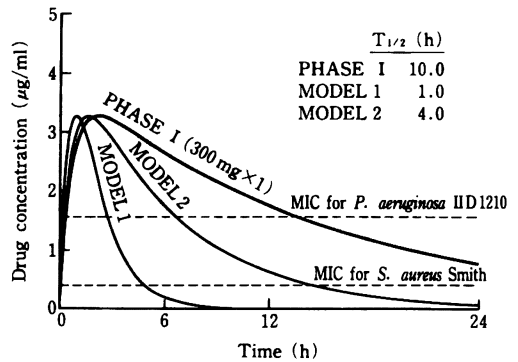


Fig. 8. Time-concentration curves of fleroxacin in *in vitro* model to evaluate the effect of elimination half-life on bactericidal activity. The peak level of fleroxacin was unchanged in each model.

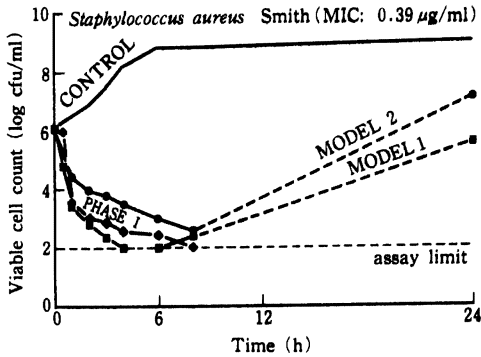


Fig. 9. Effect of elimination half-life of feroxacin on bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*.

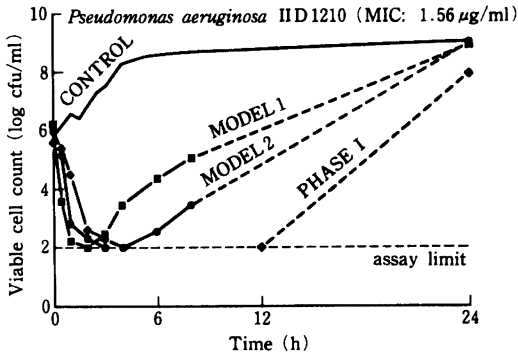


Fig. 10. Effect of elimination half-life of feroxacin on bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

レベルをきる6時間後頃より regrowth が始まったのに対し、Model 2 では8時間後までは regrowth はみられず、さらに phase 1 のモデルでは24時間後でも菌は検出されなかった。*P. aeruginosa* でも初期の生菌数の減少速度に各モデル間でわずかな差がみられたが、その後の菌の regrowth については *S. aureus* の場合と同様、薬剤消失半減期（あるいは Time above MIC）が短いほど、菌の regrowth が早くから観察された。

(2) 最高血清中濃度の影響

次に、AUC (0~24 h) 一定の条件下でピーク濃度を変化させたモデルを設定し殺菌効果を検討した。薬剤濃度推移を Fig. 11 に、*S. aureus* および *P. aeruginosa* に対する殺菌作用を Figs. 12, 13 に示した。

S. aureus, *P. aeruginosa* とも薬剤添加直後の殺菌

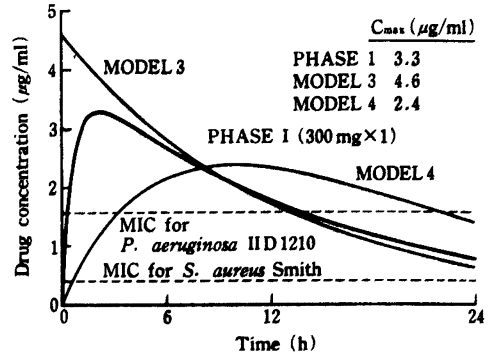


Fig. 11. Time-concentration curves of feroxacin in *in vitro* model to evaluate the effect of peak level on bactericidal activity. The area under the curve (AUC) of 0 to 24 h was unchanged in each model.

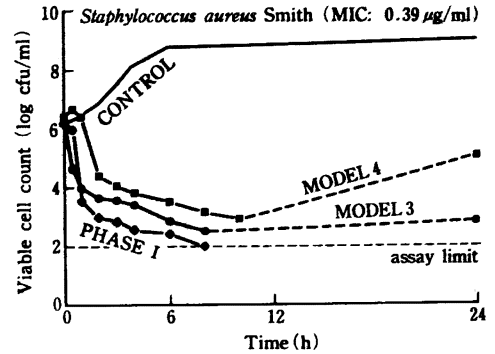


Fig. 12. Effect of peak level of feroxacin on bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*.

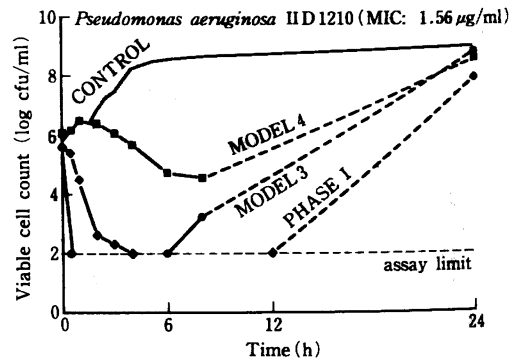


Fig. 13. Effect of peak level of feroxacin on bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

作用は薬剤の濃度推移にほぼ依存しており、特にこの傾向は *P. aeruginosa* で顕著であった。*S. aureus* に対しては薬剤濃度の上昇がもっとも緩慢な Model 4 における殺菌作用が他の 2 群に比べやや弱い傾向がみられたが、その後の regrowth は、いずれのモデルにおいても 24 時間後まで MIC 以上の薬剤濃度が維持されていたことからある程度抑制されていた。一方、*P. aeruginosa* ではすべてのモデルで 24 時間後に薬剤非添加群と同レベルまで菌数は増殖したが、regrowth は、薬剤濃度を高くかつ薬剤消失速度を速く設定した Model 3、ピーク濃度を低くかつ薬剤消失速度を遅く設定した Model 4、phase I model (300 mg×1) の順におこっていた。

III. 考 案

キノロン系抗菌薬は一般にグラム陽性菌および陰性菌に幅広い抗菌力を示し、殺菌的に作用することが報告されている^{1,6)}。多くの場合、抗菌薬の殺菌作用を検討するために一定濃度の薬剤をある時間暴露した条件下で実験が行われている。しかし、経口的に投与された薬剤は主に消化管からの吸収、各組織への分布、さらに生体からの排泄により、またあるものはその過程で代謝を受け、活性体としての濃度を経時的に変化させている。そこで我々は、生体内でのキノロン系抗菌薬の殺菌作用を推察する目的でヒトの血中薬剤濃度を再現する *in vitro* model を組み立て、種々の菌に対する殺菌作用を検討した。

第 1 相臨床試験で得られた fleroxacin の血中濃度推移を再現した *in vitro* model を用いて *S. aureus*、*E. coli* および *P. aeruginosa* に対する殺菌効果を調べたところ、300 mg 1 回内服のモデルにおいて *S. aureus* および *E. coli* は速やかに殺菌され、24 時間 regrowth は観察されなかった。すなわち、fleroxacin 感受性の *S. aureus* および *E. coli* は、1 日 1 回の投与で効果的に殺菌されることが期待された。一方、*P. aeruginosa* はこのモデルにおいていったん検出限界以下まで菌数が減少し、約 12 時間菌の増殖は抑制されたが、その後 regrowth が始まり、24 時間後には薬剤非添加群とほぼ同程度まで増殖していた。そこで regrowth がみられる 12 時間後に fleroxacin の再添加を試みたが、効果的な殺菌作用は得られなかった。この現象は他剤でも観察され、ciprofloxacin の 1 日 2 回内服モデルにおいて、2 回目の薬剤添加時にピーク濃度が MIC の約 3 倍に達するにもかかわらず、初回の薬剤添加時のような効果的な殺菌作用はみられなかった。後藤ら⁷⁾は、sparfloxacin の *in vitro* pharmacokinetic system¹ を用いて *S. aureus*、*P.*

aeruginosa に対する殺菌活性を検討し、我々と同様、初回の薬剤添加時にみられた生菌数の減少が 2 回目の薬剤添加時には観察されなかったことを報告している。この理由としては、キノロン薬の殺菌作用が非増殖菌に対して比較的弱いこと⁸⁾、また、1 回目の薬剤投与の際に、より感受性の高い菌が殺菌され、細胞集団の中の感受性の低い菌が生残したことなどが考えられる。このことから、*P. aeruginosa* に対する fleroxacin の 1 日 1 回内服と 1 日 2 回内服で得られる殺菌効果はほぼ同程度であることが推察された。

次に、ヒトでみられた fleroxacin の薬動力学的特長がその殺菌作用にどのように反映しているか検討する目的で、薬動力学的パラメーターを変化させた *in vitro* model を設定し、*S. aureus*、*P. aeruginosa* を用いてヒトの薬剤濃度推移を再現したモデルにおける殺菌効果と比較した。その結果、*S. aureus*、*P. aeruginosa* とともに薬剤消失半減期が短いほど菌の regrowth は早くみられ、また薬剤のピーク濃度が高いほど初期の殺菌力は強いことが特に *P. aeruginosa* で顕著に観察された。*S. aureus* ではピーク濃度の影響は各モデル間であまり大きな差として表われなかったが、これは Crumplin ら⁹⁾が norfloxacin を用いた実験で報告しているように、あるレベル以上の濃度作用により fleroxacin の殺菌活性がほぼプラトーに達しているためと考えられた。よって、fleroxacin の初期の殺菌力は薬剤のピーク濃度に、その後の増殖抑制作用は薬剤の消失速度（あるいは Time above MIC）におおむね依存していることが推察された。Blaser ら¹⁰⁾は、キノロン薬やアミノグリコシド系抗生物質の殺菌活性には MIC に対する薬剤のピーク濃度の比が重要な因子であると指摘している。彼らは、*S. aureus* や *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* を用いて行った実験で、ピーク濃度が 3 MIC 以上の場合、4 時間以内に 99% 以上の菌が殺菌されること、ピーク濃度が MIC の 8 倍を越えないと 24 時間以内に regrowth が観察されること、さらに regrowth した菌に対しては 2 回目以降の薬剤の添加はほとんど殺菌作用を示さないことを観察している。この点について、今回我々の実験で得られた成績は、彼らのものとほぼ一致していた。生体内では、薬剤による菌の殺菌以外に宿主が本来持っている種々の防御機構が働き、効率的に菌が処理されると考えられる。また、薬剤の濃度推移は各組織で異なり、血中での濃度推移のみからでは他の感染部位における殺菌作用を判断することは不可能である。今回用いたモデルでは、このような宿主の感染防御因子については考慮しておらず、生体内の各部位での正

確な殺菌効果は反映されていないことも考えられるが、菌に対する薬剤の pharmacodynamics を推測するためのモデルとして、本モデルは有用であると思われる。

以上の結果から、floxacin 内服後の高い血中濃度と、その後の長い薬剤消失半減期 (Time above MIC) が、効果的な殺菌作用とそれに続く増殖抑制効果に反映されていると考えられ、floxacin の once a day 療法の有用性が示唆された。

文 献

- 1) Hirai K, Aoyama H, Hosaka M, Oomori Y, Niwata Y, Suzue S, Irikura T: In vitro and in vivo antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agent Chemother* 29: 1059~1066, 1986
- 2) 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 floxacin in healthy male volunteers. *J Antimicrob Chemother* 22 (Suppl. D): 133~144, 1988
- 3) Grasso S, Meinardi G, Carneli I, Tamassia V: New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob Agent Chemother* 13: 570~576, 1978
- 4) 小林宏行, 志村政文: BAYo 9867 (Ciprofloxacin) の臨床第一相試験. *Chemotherapy* 33 (Suppl. 7): 140~170, 1985
- 5) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆, 安田 隆, 渡辺泰雄, 田井 賢: T-3262 の臨床第 I 相試験. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 9): 158~180, 1988
- 6) 伊藤 明, 平井敬二, 井上松久, 三橋 進: AM-715 に関する細菌学的検討. *Chemotherapy* 29 (Suppl. 4): 1~11, 1981
- 7) 後藤 元, 後藤美江子, 岡 慎一, 浦山京子, 木村哲, 島田 馨: *In vitro* pharmacokinetic system を用いた sparfloxacin の抗菌活性の検討. *Chemotherapy* 39 (Suppl. 4): 54~58, 1991
- 8) Zeiler H J: Evaluation of the in vitro bactericidal action of ciprofloxacin on cells of *Escherichia coli* in the logarithmic and stationary phases of growth. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 524~527, 1985
- 9) Crumplin G C, Kenwright M, Hirst T: Investigations into the mechanism of action of the antibacterial agent norfloxacin. *J Antimicrob Chemother* 13 (Suppl. B): 9~23, 1984
- 10) Blaser J, Stone B B, Groner C, Zinner S H: Comparative study with enoxacin and netilmycin in a pharmacodynamic model to determine importance or ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agent Chemother* 31: 1054~1060, 1987

Bactericidal activity of floxacin in *in vitro* pharmacokinetic model

Eiji Wakabayashi, Masaki Hosaka and Keiji Hirai

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd., 2399-1,

Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-01, Japan

The bactericidal activity of floxacin against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* was determined using an *in vitro* pharmacokinetic model. Viable cell counts of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* decreased to undetectable levels in the model of a 300 mg once-daily oral dose, and regrowth was not observed until 24 h except for *P. aeruginosa*. The activity against *P. aeruginosa* in the model of a twice-daily dose (at a 12 h interval) was equal to that of the once-daily dose. The effect of pharmacokinetic parameters such as peak level and elimination half-life on bacterial kill kinetics was also studied in this model. The extent of bactericidal activity and length of the bacteriostatic period was dependent on peak level and time above MIC, respectively.