

新経口用セフェム剤 cefcamate pivoxil の実験的感染ウサギ下顎骨移行

—マクロオートラジオグラフィーによる検討—

佐藤田鶴子・山口 昌彦・石垣 佳希

阿 部 葵・宮坂 孝弘

日本歯科大学歯学部口腔外科学教室第1講座*

(平成5年10月25日受付・平成6年5月18日受理)

Key words: 実験的感染ウサギ, 口腔組織移行, マクロオートラジオグラフィー

Cefcamate pivoxil (CCMT-PI) は塩野義製薬株式会社研究所で合成されたエステル型セフェム系抗生物質である。CCMT-PI そのものは抗菌活性を有しないが、内服後、腸壁エステラーゼにより加水分解を受け、4位のピバロイルオキシメチル基がカルボキシル基に置換され、抗菌活性を有する cefcamate (CCMT) となるプロドラッグである (Fig. 1)。

本剤はグラム陽性菌, グラム陰性菌に対し, 広範囲な抗菌スペクトルを有し, 各種細菌産生のβラクタマーゼに対して安定性を有している。また, 動物実験による吸収・排泄試験から, 経口投与により速やかに吸収され, 約20%が尿中に排泄されることが知られている^{1,2)}。

本実験では, 本剤の口腔領域の感染症への有用性を予測するため, 健常および顎骨感染ウサギを用いて,

本剤の口腔組織移行を検討した。

使用薬剤およびその調整

実験に用いた薬剤は塩野義製薬株式会社研究所で合成された標識化合物 [¹⁴C] CCMT-PI および非標識 S-1108 である (Fig. 2)。標識体の比放射能は 878 kBq/mg (23.7 μCi/mg) で HPLC により求めた放射化学的純度は 99.7% であった。投与にあたって, [¹⁴C] CCMT-PI に非標識 CCMT-PI を加え, 蒸留水に溶解して約 3.7 MBq (100 μCi) / 20 mg / 5 ml となるように調整したものを胃カテーテルを用いて胃内に強制投与した。非標識 S-1108 は 0.5% メチルセルロースに懸濁し, 20 mg/kg で同様に胃カテーテルを用いて投与し, 投与直後に水 10 ml を与えた。

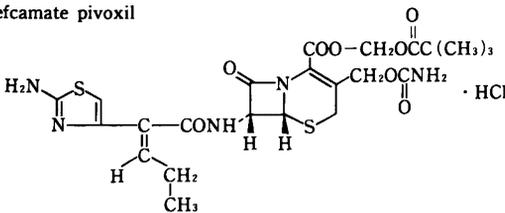
使用動物

New Zealand White 種ウサギ雄, 体重 1.9~2.3 kg (日本生物医科学資材) を 1 週間 CR-3 (日本クレー) を飼料とし, 新鮮水道水を与えてほぼ 3 kg になるまで予備飼育後, 実験開始 24 時間前より禁食させ, 薬剤の投与を行った。

顎骨感染ウサギの作製

感染モデルについては, 1 週間の予備飼育後に佐藤-Heimdahl 法³⁾に準じて作製した。作製後 1 週間で,

Cefcamate pivoxil



Cefcamate

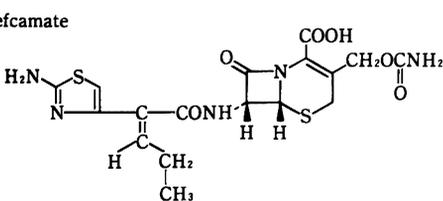
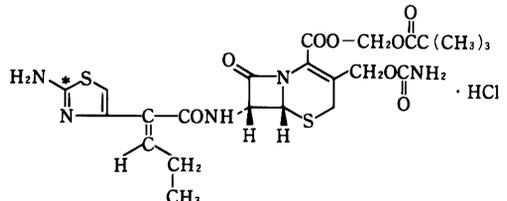


Fig. 1. Chemical structure of cefcamate pivoxil and cefcamate.

Fig. 2. Chemical structure of [¹⁴C] cefcamate pivoxil.

* 東京都千代田区富士見 2-3-16

薬剤の投与を行った。

感染モデルについてはペントバルビタールナトリウムを0.5 ml/kg 耳静脈より注射し、右側顎下部より頬部を除毛、術野を消毒。頬骨耳筋の筋線維の走行に沿って皮膚に約1 cmの横切開を加え、深部にある咬筋を後方へ圧排し、咬筋窩前方の骨膜に縦切開を加え、骨面を露出した。その部に歯の切削用ラウンドバーを用いて骨腔を形成し、 10^8 CFU/mlに調整した *Streptococcus milleri* NCTC 7331 および *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 の2菌液を湿潤させた小綿球を1個埋入し、緊密に骨膜および皮膚縫合を行った。術前と同じ飼育状態で、術後6日目には小膿瘍を形成し、それらはいずれのウサギもほぼ同程度の大きさを有し、膿瘍が自壊しているものはなかった。

生物学的測定法

健常ウサギならびに感染ウサギとも CCMT-PI を経口投与後、所定の時間 (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 3, 4, 6 時間) で採血を行った。また、組織の採取は投与後、7 時点 (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 6 時間) でペントバルビタールナトリウムを耳静脈内に投与し、麻酔後、大腿動脈を切断して脱血させた後、採取し、採取重量の2倍量の0.1 M, pH 7.0 リン酸緩衝液を加え、超高速ホモジナイザーにて粉碎し、3,000 rpm, 20 分遠心分離後の上清を試料とした。

薬剤濃度測定法

検定菌には *Escherichia coli* 7437 を用い、薄層平板測定法で行った。

データの解析

算出された実測値をもとに、井本の解析モデル⁴⁾に従って薬動学的解析を行った。

マクロオートラジオグラフィ

前項から得られた感染モデルの血清における T_{max} に近い値から0.75時間および、ほとんど本剤が排泄されていると思われた6時間後の2時点を選び [^{14}C] CCMT-PI の分布を観察した。

[^{14}C] CCMT-PI を経口投与したウサギを所定時間にペントバルビタールナトリウムを静脈内に投与して

麻酔死させた。ただちに液体窒素で凍結、断頭後、ミクロトーム (Leitz 1400) を用いて薄切切片 (30 μ m 厚) を作製し、粘着テープ (スコッチ# 800, 3 M) を支持体とした。

切片を真空凍結乾燥後、イメージングプレート (富士写真フィルム) と密着露出し、バイオイメージアナライザー (BAS-2000) を用いて画像化した^{5,6)} (Fig. 3)。

血液中放射能濃度測定

[^{14}C] CCMT-PI 投与後の所定時間で、ヘパリン処理をしたシリンジにより、耳静脈から血液を採取した。血液に組織溶解剤 (NCS アマシャム) を加え、加温溶解後に H_2O_2 で脱色し、シンチレーターを加えて測定した。放射能の計測は液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC 1000) を用い、計数効率の補正は外部標準線源より行った。

血清中および組織内濃度

CCMT-PI 20 mg/kg を健常ウサギに単回投与した時の血清および下顎骨内濃度の薬物動態学的パラメーターを Table 1 に示した。

血清および下顎骨内濃度のピークはそれぞれ投与後0.74時間、1.01時間であり、ピーク時濃度は血清で2.75 μ g/ml, 下顎骨は2.47 μ g/gであった。同様に、上顎骨、舌、顎下腺ともピークは投与後ほとんど1時間で、上顎骨は2.62 μ g/g, 舌は3.02 μ g/g, 顎下腺3.39 μ g/gであった。

マクロオートラジオグラフィ

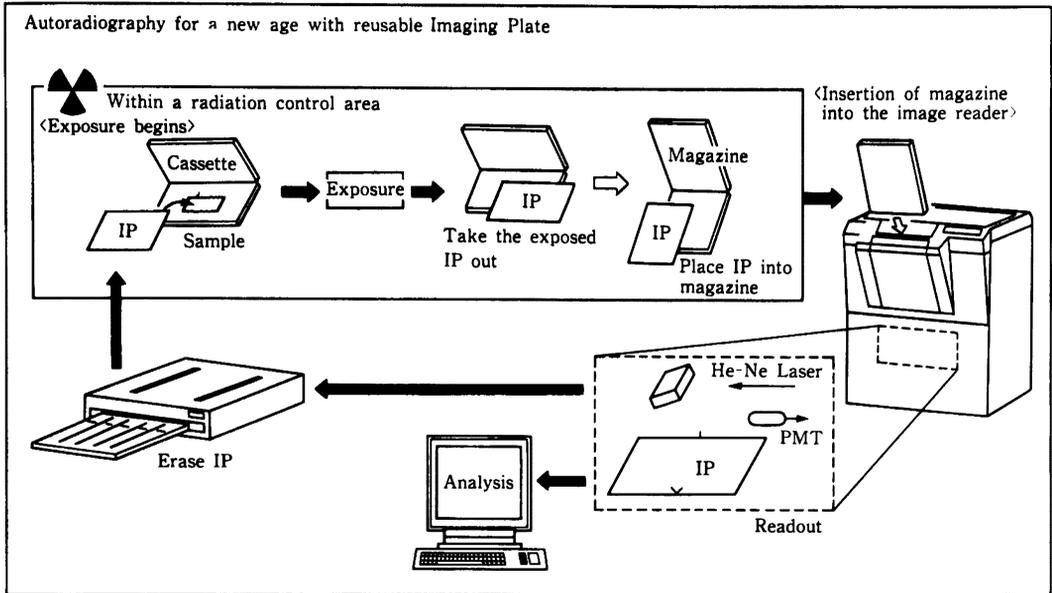
健常および感染ウサギに [^{14}C] CCMT-PI を経口投与した頭部のイメージングプレートにより得られたマクロオートラジオグラムを Fig. 4 (健常ウサギ) および Fig. 5 (感染モデル) に、また、各部位における単位面積あたりの PSL 値 (Intensities of photo-stimulated luminescence) を Table 2 に示した。

なお、実験に用いたウサギは各群1羽、計4羽である。

健常ウサギでは、投与後0.75時間では血液中がもっとも高い数値を示した。下顎骨は血中移行の約半分

Table 1. Pharmacokinetic parameters of cefcamate pivoxil in rabbit serum and mandible

Tissue	State	T_{max} (h)	C_{max} (μ g/ml, g)	$T_{1/2}$ (h)	AUC (μ g · h/ml, g)
Serum	normal	0.74	2.75	1.47	6.61
	infection	0.73	3.57	1.22	7.18
Mandible	normal	1.01	2.47	1.13	4.57
	infection	1.03	2.83	1.22	5.68



The Imaging Plate Allows Repeated Readout and Recording

The Imaging Plate (IP) is an innovative two-dimensional sensor of radioactive energy memory type, forming an image sensing layer with fine crystals of photostimulable phosphor (BaFBr:Eu²⁺) on a polyester plate.

●Exposure

When exposed, the IP accumulates and stores the irradiated radioactive energy. During this process, a sample labeled with RI (for example, a hybridized filter) is covered with a membrane such as Saran[®] wrap and is exposed on the IP inside a cassette for exposure use. Unlike with X-ray film, this operation can take place in a brightly lit room.

●Readout

When the exposed IP is inserted into an image reading unit and then scanned with a fine laser beam, it emits luminescence in proportion to the recorded radiation intensity. This luminescence is collected into a photomultiplier tube (PMT) and converted to electrical signals. The radioactive image recorded on the IP during the exposure is read as high resolution digital data of 5 pixels/mm or 10 pixels/mm and recorded in an analyzing unit (32-bit workstation). A variety of image analyses can then be conducted.

●Erasing

After reading, all the image data recorded on the IP can be erased by exposing the IP to uniform light in an IP eraser attached. The IP can then be reused.

Readout in a Mere 2 Minutes 30 Seconds, a System with Outstanding Operation Capacity

●Easier to handle than X-ray film, exposed at room temperature

The size of the Imaging

Plate is 20×40 cm or 20×25 cm, and it is about 0.5 mm thick. Its flexibility allows for simple handling, and it can come into close contact with samples. A darkroom is unnecessary and exposure can be conducted at room temperature.

●Image date readout in a mere 2 minutes 30 seconds

It takes two minutes thirty seconds to scan the imaging plate (20×40 cm), with a resolution of 10 pixels/mm. Even if there are many specimens to be analyzed, they can be exposed simultaneously on the IP, read in a short period of time, and the images can be confirmed and analyzed quickly.

●Operation in an ordinary research lab

With a special imaging plate magazine designed for operation outside of a darkroom, the BAS 2000 can be placed in an ordinary research lab. Only two procedures must be conducted in a RI regulated area: exposure of the sample to IP and load IP into the IP magazine after exposure.

Fig. 3. Imaging plate system (Bio-imaging analyzer, Bas 2000, Fuji Photo Film Co.).

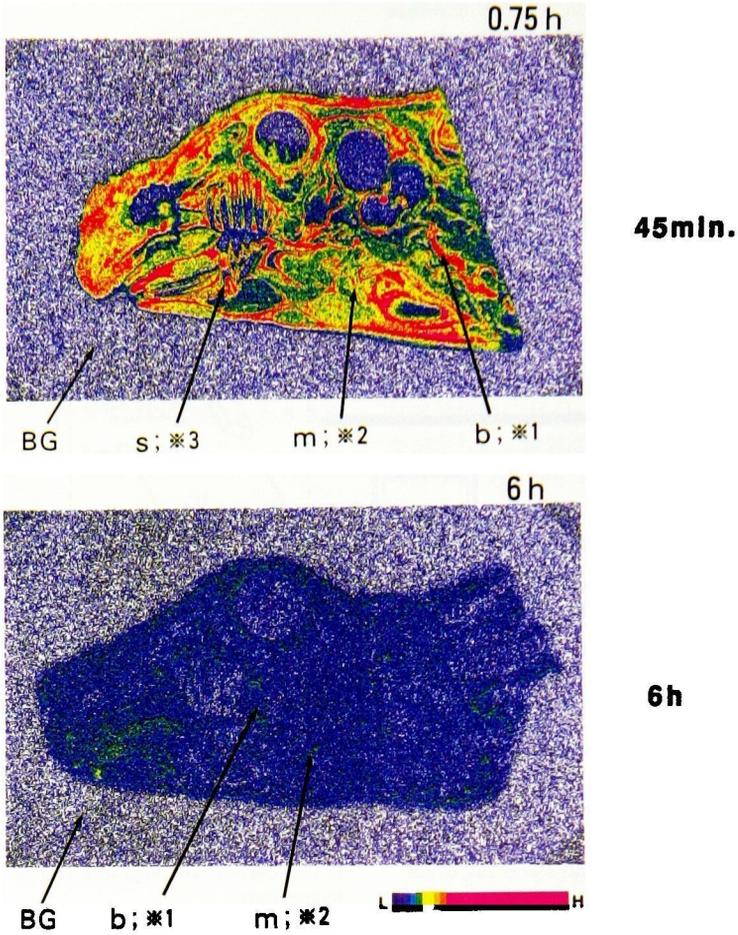


Fig. 4. Pseudocolor display obtained by using an imaging plate, showing distribution of radioactivity in sagittal sections of a normal rabbit head at 0.75 and 6 hours, after oral administration of [¹⁴C] cefcamate pivoxil.

Table 2. PSL on each of an autoradiograph, in mandible, suppurative lesion, and blood, after oral administration of [¹⁴C] cefcamate pivoxil (20 mg/kg)

Tissues	(PSL-BG)/S			
	normal rabbit		infected rabbit	
	0.75 h	6 h	0.75 h	6 h
Mandible*2	14.93	3.15	17.82	3.57
Suppurative lesion*3	14.32	—	28.31	3.03
Blood*1	29.52	4.44	36.59	3.62

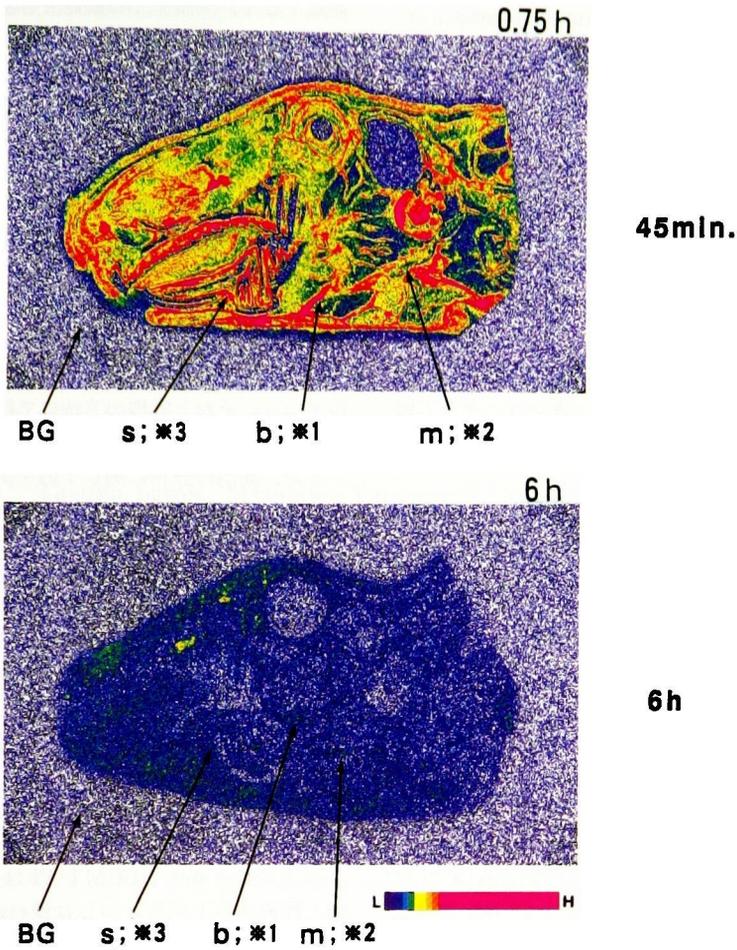


Fig. 5. Pseudocolor display obtained by using an imaging plate, showing distribution of radioactivity in sagittal sections of an infected rabbit head at 0.75 and 6 hours, after oral administration of [¹⁴C] cefcamate pivoxil.

の移行であった。なお、Table中のsuppurative lesionは感染モデルにおける感染巣とほぼ一致する下顎骨の部分を選定したものである。

投与後の6時間においては、切片上に顕著な放射能の分布は認められず、バックグラウンドレベルであった。

感染ウサギについては、投与後0.75時間では血液が高い濃度を示し、次いで感染病巣部およびその周辺部 (Fig. 5 *3) への放射能分布が高値を示し、血液と比べると約0.77倍、また病巣より離れた部位で炎症のない部位の下顎骨 (Fig. 5 *2) と比べると約

1.6倍であった。しかし、投与後6時間では、健常ウサギと同様にバックグラウンドレベルとなっていた。

さらに、マクロオートラジオグラ制作時に採取した血液の放射能濃度を測定した結果はTable3のとおりであり、血液中放射能濃度を放射能イコールCCMTであると仮定して、薬物濃度に換算した。その結果では、ほぼバイオアッセイで得られた値に近似していた。

歯科・口腔外科領域で抗菌剤を選択する場合は主として菌性感染症の治療かもしくは抜歯後の感染予防となる。いずれにしても顎骨内に炎症の主座があること

Table 3. Blood radioactivity after oral administration of [14 C] cefcamate pivoxil (20 mg/kg) in rabbits

	Time (h)	$\mu\text{g eq} \cdot / \text{ml}$
Normal rabbit	0.75	2.52
	6	0.58
Infected rabbit	0.75	4.79
	6	0.47

がそのほとんどである。そのため、抗菌剤の選択にあたっては、顎骨の移行の高いものが選ばれる。また、歯性感染症の原因と考えられているのは口腔レンサ球菌といわれる *Streptococcus* ならびに嫌気性のグラム陽性菌が中心と考えられ、これらに有効な抗菌剤が選択されている⁷⁾。

すでに本邦において歯周組織炎、歯冠周囲炎、顎炎などの歯科適応を受けている経口セフェム系抗菌剤は cefaclor (CCL)⁸⁾, cefdinir (CFDN)⁹⁾, cefuroxime axetil (CXM-AX), ceftoram pivoxil (CFTM-PI)⁸⁾ などであり、これらについてはウサギにおける組織移行の検討がなされている。

健康ウサギに本実験と同様の方法で 20 mg/kg の投与を CCL, CFDN, CFTM-PI で検討した結果と血清および下顎骨について比較した。CCL では血清の T_{\max} 0.57 時間, C_{\max} 16.78 $\mu\text{g/ml}$ とかなりの移行量であるのに対し、下顎骨は T_{\max} 0.72 時間, C_{\max} 0.65 $\mu\text{g/g}$ と低く、下顎骨の血清に対する AUC 比は 0.03 ときわめて組織移行が低かった。CFDN では血清の T_{\max} 1.70 時間, C_{\max} 4.84 $\mu\text{g/ml}$, 下顎骨は T_{\max} 2.08 時間, C_{\max} 0.78 $\mu\text{g/g}$ であり、血清に対する AUC 比は 0.19 であった。さらに、CFTM-PI は血清の T_{\max} 0.83 時間, C_{\max} 3.31 $\mu\text{g/ml}$, 下顎骨は T_{\max} 1.12 時間, C_{\max} 1.37 $\mu\text{g/g}$ であり、血清に対する AUC 比は 0.39 であった。一方、本剤では血清の T_{\max} 0.74 時間, C_{\max} 2.75 $\mu\text{g/ml}$, 下顎骨は T_{\max} 1.01 時間, C_{\max} 2.47 $\mu\text{g/g}$ であり、血清に対する AUC 比は 0.69 であり、ニューセフェムと呼ばれるものに改良されるにともない、組織移行が高くなる傾向があった。

顎骨内の感染モデルへの [14 C] S-1108 を 20 mg/kg 投与した分布に関しては、同様の実験方法で、佐藤ら¹⁰⁾がニューキノロン系抗菌剤 sparfloxacin (SPFX) で行った結果のマクロオートグラムで見ると、感染病巣がきわめて明瞭に表示されたが、今回の結果では、肉眼上では感染病巣が識別しづらかった。しかし、今回のようにイメージングプレートを用いて PSL 値を

測定すると、肉眼上では確認できない色収差を識別でき、Table 2 に示したように、健常群の下顎骨の感染巣にあたる部分(※3)の対血液比は 0.49 で、感染群の感染巣部の対血液比は 0.77 であり、感染巣中心にかなり高く移行していることがわかった。一方、対血液比で下顎骨、上顎骨、舌、顎下腺への移行率は 0.75 時間の時点で健常群は 0.42~0.57、また、感染群では 0.45~0.49 であり、感染群も正常群もほぼ同等であった (Table 2)。

同様の実験を、すでに佐藤ら^{10,11)}がニューキノロン系薬剤の SPFX および temafloxacin (TMFX) を使用して実施し、感染巣周囲に分布の高いという結果を得ている。それと同様の方法にて行った今回の実験結果はセフェム系薬剤に関しては初めての試みである。

また、薬剤の分布に関してのマクロオートラジオグラフィによる検討は一般にラットなどの小動物の胎児が用いられることが多く、胎児という発育期にあるものでは、当然その使用した薬剤により、成熟したものに比べて投与した薬剤分布が偏っていることが多い。成熟動物に対しては、藤井ら¹²⁾は成熟家兎を用いてニューキノロン剤の耳鼻咽喉科領域組織移行分布を確認している。

今回の実験では、成熟ウサギに投与した抗菌剤が感染症の病巣部に選択的に移行していることが理想であるが、実際にはどのような分布が見られるかという目的を PSL 値によって確認できた。

以上のことから、CCMT-PI は他の同系統の抗菌剤と比較すると同等ないしは優れた移行が見られた。また、感染巣周辺への良好な移行を示した。

文 献

- 1) 中島光好, 植松俊彦, 尾熊隆嘉, 吉田 正, 木村靖雄, 小西雅治, 松野 敏, 山本貞雄: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の第 I 相臨床試験。Chemotherapy 41 (S-1): 109~125, 1993
- 2) 木村靖雄, 他: 新規エステル型経口セフェム剤 S-1108 の実験動物における体内動態に関する検討。Chemotherapy 41 (S-1): 163~176, 1993
- 3) 佐藤田鶴子, Heimdahl A: 実験的家兎顎骨病巣形成に関する研究。歯学 76: 1520~1526, 1989
- 4) 井本 隆: 抗生剤の薬動力学的学に関する研究。歯薬療法 2: 124~130, 1983
- 5) Gahan P B: Autoradiography for Biologist. Academic press, London, 1972
- 6) Miyahara J: The Imaging Plate: A new radiation image sensor, Chemistry Today 223: 29~36, 1989
- 7) 佐々木次郎, 他 (14 施設および関連施設): 歯科・口腔外科領域における S-1108 の基礎的・臨床的検討。Chemotherapy 41 (S-1): 718~734, 1993

- 8) 井下万也, 佐藤田鶴子: 経口抗菌剤 cefteram pivoxil および cefaclor のウサギ口腔組織移行に関する研究—食餌の影響—. 日口外誌 38: 1069~1083, 1992
- 9) 佐藤田鶴子, 柳井智恵, 石垣佳希, 阿部 葵, 宮坂孝弘, 吉田 誠: 経口用セファロスポリン系抗生物質 cefdinir のウサギ感染モデルにおける口腔組織移行に関する検討. 歯薬療法 12: 158~162, 1993
- 10) 佐藤田鶴子, 菊池典久, 井下万也, 岩重洋介, 田中正司, 園山 昇, 宮崎 亀, 松永義正: 新経口用ニューキノロン系抗菌剤 sparfloxacin の実験的感染ウサギ下顎骨移行— ^{14}C sparfloxacin の分布について. Chemotherapy 39 (S-4): 131~137, 1991
- 11) 佐藤田鶴子, 柳井智恵, 前川登志江, 園山 昇, 武田勝男, 佐久間由光, 矢野 茂, 大塚峯三: ニューキノロン系抗菌剤 temafloxacin のウサギ口腔組織への移行性について—マクロオートラジオグラフィ—による検討—. Chemotherapy 41 (S-5): 718~722, 1993
- 12) 藤井敏彦・古川日出男, 宮崎 亀, 橋本昌久, 清水 嵩尚, 村井兼孝: ^{14}C 標識 AT-2266 のモルモット耳鼻咽喉組織における分布に関する研究. Chemotherapy 32 (S-3): 142~146, 1984

Penetration of a new oral cefem, cefcamate pivoxil, into rabbit oral tissues

Tazuko Satoh, Masahiko Yamaguchi, Yoshiki Ishigaki,
Aoi Abe, Chie Yanai and Takahiro Miyasaka

The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo, Department of Oral and
Maxillofacial Surgery I, 2-3-16 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

The pharmacokinetics in the oral tissues of cefcamate pivoxil (CCMT-PI) following an oral dose of 20 mg/kg were studied in rabbits with and without jaw bone infection by *Streptococcus milleri* and *Bacteroides fragilis*.

1. In normal rabbits, the peak level of CCMT-PI in the serum was 2.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$. While those in the mandible, maxilla, tongue, submandibular gland were 2.47, 3.02, 3.39 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectively.

2. Autoradiograms of ^{14}C CCMT-PI showed that the tissue-to-blood concentration ratios of those tissues were almost the same in infected and normal rabbits.

3. Autoradiograms of ^{14}C CCMT-PI showed that the radioactivity was well distributed to inflamed sites in the infected rabbits about 0.77 as high as blood level, and it was about 1.6 as much as in the non-inflamed region in those rabbits.