

新キノロン系抗菌薬 fleroxacin のウサギ感染モデルにおける組織移行に関する研究

佐藤田鶴子・吉田 誠・阿部 葵・石垣 佳希・宮坂 孝弘・足立 雅利

日本歯科大学歯学部口腔外科学教室第1講座*

(平成7年3月16日受付・平成7年8月9日受理)

Fleroxacin (FLRX) 20 mg/kg を健常および顎骨感染ウサギに経口投与した時の本剤の組織移行について検討した。顎骨感染ウサギは *Streptococcus milleri* と *Bacteroides fragilis* を下顎骨内に複合感染させて作製した。

1. FLRX を経口投与後の血清中の T_{max} は感染群 1.47 時間、健常群は 1.28 時間、 C_{max} はそれぞれ 3.55 $\mu\text{g/ml}$, 3.23 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2. 組織については、感染群では T_{max} は 1.62~2.14 時間、 C_{max} は 2.01~6.21 $\mu\text{g/g}$ であった。とくに顎下リンパ節や耳下腺・顎下腺などの腺組織は高い移行であった。

3. 菌性感染症の惹起される部位である上顎骨、下顎骨の本剤の C_{max} の対血清比はそれぞれ 57%, 61% であり、他の系列の抗菌剤より高い移行がみられた。また、感染部位から得られた膿汁については、 C_{max} は 3.08 $\mu\text{g/ml}$ であり、血清の約 90% の良好な移行がみられた。

4. バイオアッセイ法にて測定した値のほうが全般に HPLC 法にて測定したものより高値であった。

Key words: fleroxacin, 新キノロン系抗菌剤, 体内動態, 膿汁中移行

Fleroxacin (FLRX) は杏林製薬株式会社で norfloxacin (NFLX) を基に化学修飾を加えて開発された、新キノロン系の合成経口抗菌薬で、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを有し、ヒトにおいて高い血中濃度と長い血中半減期を有する薬剤である (Fig. 1)。

今回我々は菌性感染症の主座になるウサギ顎骨に感染を惹起させ、その感染モデルに FLRX を経口投与し、口腔感染症に関連ある組織への移行をバイオアッセイ法および高速液体クロマトグラフ法により確認した。また、同様の方法で健常ウサギへ投与したものを対照 (健常群) とした。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤および投与方法

FLRX は杏林製薬株式会社から分与されたものを用いた。投与にあたっては、FLRX を 0.1% carboxymethylcellulose で懸濁させ、アトム多用途チューブ (7 Fr, アトム) を用いて、強制的に胃内に投与した。

2. 動物実験

1) 使用動物

New Zealand white (NZW) 種ウサギ、雄、7~10 日間予備飼育後、体重 2.5~3.0 kg のものを健常群とし

て 16 羽を使用し、また、感染群も同じ要領で 16 羽とした。実験にあたっては、前日より禁食させ、自由に飲水させた。

2) 感染モデル作製

感染モデルは佐藤—Heimdahl 法¹⁾に準じて作製した。ペントバルビタール Na (Pitman Moore 社) を用い、麻酔下で、術野の除毛・皮膚消毒後、頬骨耳筋の方向に沿って約 1 cm の皮膚切開を加え、骨膜に達するまで鈍的に剥離し、露出した咬筋窩前方の骨膜を切開し骨面を露出した。その下顎骨々面に菌の切削用ラウンドバー # 8 を用いて半米粒大の骨腔を形成し、その骨孔中に、 10^6CFU/ml に調整した *Streptococcus milleri* NCTC 7331 (Public Health Laboratory Service 分与 *S. milleri*) および *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 (Public Health Laboratory Service 分与 *B. fragilis*) の菌液を各々 0.025 ml ずつ浸潤させた小綿球を埋入し、4-0 PGA 糸にて骨膜縫合、次いで 3-0 絹糸にて皮膚縫合を緊密に行った。

感染モデル作製後 7 日目のウサギを試料採取用 (感染群) とした。

3) 試料の採取

健常群および感染群とも、FLRX をウサギ体重あたり 20 mg/kg の量で経口投与し、採血は投与後 0.25~6.0 時間の 9 時点で、組織採取は投与後 0.5~6.0 時間の 8 時点で行った。血清移行に関しては、耳静脈より採血後、血清分離し、試料とした。採取組織は口腔領域の感染症に関連ある、舌、歯肉、顎下リンパ節、耳下腺、顎下腺、

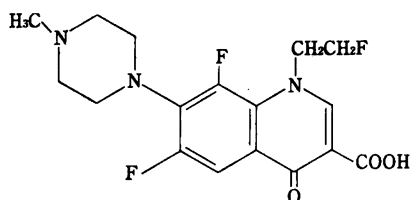


Fig. 1. Chemical structure of fleroxacin.

上顎骨、下顎骨で、感染群のみ膿汁も採取した。

血清は採取した血液を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を試料とした。組織は 2 倍重量（顎下リンパ節のみ 4 倍）の標準希釈液（1/15 M PBS pH 7.4）を加え、ポリトロンホモジナイザーで十分ホモジナイズし、混和したものを 4℃、3,000 rpm、10 分間遠心分離してその上清を試料とした。なお、その上清の一部（0.5 ml）は HPLC にて測定を行うための試料とし、測定まで密封容器内で -80℃ にて凍結保存した。

3. バイオアッセイ法による測定

1) 検定菌

Escherichia coli NIHJ JC-2 を用いた。日抗基力価試験 1-4-(5) の調整法に準じて調整した検定菌液を測定培地に 0.2% (v/v) の割合で接種した。

2) 測定用培地

市販培地の BRAIN HEART INFUSION AGAR (DIFCO) を用いた。pH 調整は行わなかった。

3) 濃度測定

濃度測定は 8 mm thick Paperdisk Advantic®（東洋製作所）を用い、薄層平板ディスク法により行った。4℃ で 1 時間予備拡散を行った後、37℃、18 時間培養し、阻止円を測定した。

4) 標準溶液の調整

FLRX を 0.1% NaOH で溶解後、1/15 M PBS にて段階希釈した。

4. 高速液体クロマトグラフ法による測定

バイオアッセイ法と同じ測定用試料を杏林製薬（株）製剤技術センターで濃度を高速液体クロマトグラフ法²⁾により測定した。

5. 薬動学的解析

濃度測定によって得られた実測値から井本³⁾のプログラムを使用し、モーメント解析および one compartment model にて薬動学的解析を行った。

II. 結 果

バイオアッセイ法による FLRX の血清中および組織濃度から薬動学的解析を行い、結果を Table 1 に示した。

血清中の T_{max} は感染群 1.47 時間、健常群は 1.28 時間、 C_{max} はそれぞれ 3.55 $\mu\text{g/ml}$ 、3.23 $\mu\text{g/ml}$ と違いはみられなかった。AUC（濃度—時間曲線下面積）はそれぞれ、12.05 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ 、13.54 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ であった。

組織では、感染群では T_{max} は 1.62~2.14 時間で、 C_{max} は 2.01~6.21 $\mu\text{g/g}$ 、AUC は 7.24~27.94 $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$ であった。特に顎下リンパ節や耳下腺・顎下腺などの腺組織は血清中移行に比べ高く、ついで舌や歯肉などの軟組織への移行も高かった。上顎骨、下顎骨も C_{max} の対血清比はそれぞれ 57%、61% であった。骨以外の組織へは血清中濃度よりすぐれた移行を示した。

感染群のみ試料採取できる膿汁については T_{max} は 2.41 時間、 C_{max} は 3.08 $\mu\text{g/ml}$ 、AUC は 13.67 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ であり、 C_{max} の対血清比では約 90% の良好な移行がみられた。特に移行パターンとしては全体に血清中濃度も

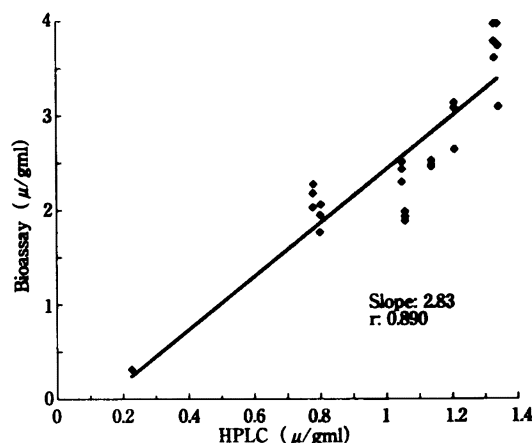


Fig. 2. Correlation of concentration of fleroxacin by HPLC and Bioassay.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of fleroxacin in rabbits (20 mg/kg ; p.o.)

Sample or serum / group	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$) ($\mu\text{g/g}$)	$T_{1/2}$ (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$) ($\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$)	MRT (h)	VRT (h ²)	C_{max} ratio	AUC ratio
Serum	Healthy	1.28	3.23	2.55	13.54	3.37	8.25	
	Infected	1.47	3.55	2.09	12.05	2.50	3.12	
Tongue	Healthy	1.41	3.72	2.37	14.46	3.15	7.39	1.15
	Infected	1.95	6.16	2.68	26.90	3.27	5.86	1.74
Gingiva	Healthy	1.24	3.73	2.01	12.30	2.68	5.39	1.15
	Infected	2.14	3.58	2.87	16.71	3.49	6.12	1.01
Submandibular lymph node	Healthy	1.63	4.65	2.99	22.81	3.86	10.01	1.44
	Infected	2.03	6.21	2.74	27.61	3.29	5.63	1.75
Parotid gland	Healthy	1.67	4.21	2.14	14.59	2.55	3.25	1.30
	Infected	1.84	5.82	2.52	23.82	3.05	4.96	1.64
Submandibular gland	Healthy	1.20	5.82	1.71	16.22	2.11	2.63	1.80
	Infected	1.96	6.04	2.84	27.94	3.45	6.46	1.70
Maxilla	Healthy	1.83	1.47	2.46	5.86	2.94	4.35	0.46
	Infected	1.78	2.01	2.19	7.24	2.87	5.88	0.57
Mandible	Healthy	2.14	1.28	3.67	7.74	4.70	14.59	0.40
	Infected	1.62	2.17	2.07	7.26	2.47	3.06	0.61
pus	Infected	2.41	3.08	2.74	13.67	3.26	5.34	0.87

組織移行も感染群と健常群がほぼ類似しており、感染群は健常群を上回る良好な移行が認められた。

同時に採取した試料を HPLC 法にて測定した値とバイオアッセイ法での値との相関をみた。バイオアッセイ法で FLRX の活性を有する全成分を含めて測定したほうが全体的に高値であったが、両者には相関がみられた (Fig. 2)。

III. 考 察

FLRX はキノリン環の 1 位の側鎖、キノリン環の 6 位および 8 位の 3 か所にフッ素を置換した構造を持つ NFLX に次ぎ杏林製薬中央研究所で開発されたニューキノロン薬である。本剤は優れた抗菌力と体内動態をもち、ヒトでは各種感染症に 1 日 1 回投与で有効なことが認められている⁴⁾。

そこで、NZW 種ウサギを用い、体内動態を検討した。特にこのように動物の組織移行に関する研究では、ヒト病巣から組織を採取してその移行をみるのが妥当であろうが、その際には、起因菌がそれぞれ異なっており、一定した感染巣が得られないため、他の抗菌薬との効果を比較するための試料が得がたいものである。そこで、これらの欠点をカバーすることのできたのがこの感染モデルである。また、動物種でウサギを選択したのは、菌性感染症に匹敵する感染巣を作製するには、その操作上、ある程度の大きさの動物が必要であるという理由からである。本実験に用いた感染モデルはすでに、歯科領域感染症モデルとして歯科適応を受けた抗菌薬を用いてその有効性を確認し、本剤と同様ニューキノロン系薬剤に関してすでに同様の方法にて検討がなされている。その際、ニューキノロン系抗菌薬の特徴として、ウサギの体内動態としては、一般的に組織中濃度が血中濃度を凌駕しており⁵⁾、特に口腔関連組織では耳下腺、顎下腺などの腺組織への移行がきわめて優れていることが知られている⁶⁻⁸⁾。また、菌性感染症が存在し、かつその部への抗菌薬の移行を求められる顎骨については下顎骨をみても、移行濃度の低いペニシリン系やセフェム系のものなどと比べ、ニューキノロン系薬剤は顎骨内に血清中の約半量近くの移行が得られている。

本剤 FLRX, sparfloxacin (SPFX)⁶⁾, ofloxacin (OFLX)⁷⁾, levofloxacin (LVFX)⁷⁾, temafloxacin (TMFX)⁸⁾ について血清中濃度および下顎骨濃度をみると、以下ようになる。血清中移行について T_{max} , C_{max} および AUC は FLRX では 1.28 時間, 3.23 $\mu\text{g/ml}$, 13.54 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$, SPFX では 5.30 時間, 0.77 $\mu\text{g/ml}$, 12.96 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$, OFLX では 0.94 時間, 3.45 $\mu\text{g/ml}$, 16.33 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$, LVFX では 1.59 時間, 3.63 $\mu\text{g/ml}$, 29.78 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$, TMFX では 1.50 時間, 2.13 $\mu\text{g/ml}$, 13.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ であった。

一方、下顎骨移行では T_{max} , C_{max} および AUC はそれぞれ FLRX では 2.14 時間, 1.28 $\mu\text{g/g}$, 7.74 $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$,

SPFX では 5.60 時間, 0.34 $\mu\text{g/g}$, 6.74 $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$, OFLX では 1.59 時間, 1.15 $\mu\text{g/g}$, 7.17 $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$, LVFX では 1.75 時間, 0.88 $\mu\text{g/g}$, 4.11 $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$, TMFX では 1.50 時間, 0.92 $\mu\text{g/g}$, 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$ であった。これらの値と、血清中移行および下顎骨移行に関して FLRX と他剤を比較してみると、OFLX, LVFX もしくは TMFX などと類似したパターンがみられた⁶⁻⁸⁾。このことは、同様の方法で行った当施設の結果から、セフェム系の cefaclor (CCL)⁹⁾ などと比較してみると、CCL では下顎骨の対血清比は約 3 % しかないのに比べて、本薬剤は血清中および下顎骨とも良好な移行が認められている違いがあった。

さらに、バイオアッセイ法と HPLC 法との関係については、バイオアッセイでは代謝物を含め活性体をすべて測定しており、それに比して HPLC では未変化体を測定している。特にウサギでは、代謝物の割合が多く¹⁰⁾、バイオアッセイ法にて測定した値の法が HPLC 法にて測定した値よりも全般的に高値であった。これについては、川原ら¹⁰⁾ によると、ウサギに FLRX を投与して得られた尿からは未変化体以外にデメチル体、N-オキシド体、デメチルオキシソ体、ホルミル体の 5 個が単離、同定されている。また、FLRX 投与 24 時間後のウサギ尿中の ¹⁴C activity (% of total activity) は未変化体を抽出したフラクション 2 で 32.9 %, デメチル体と N-オキシド体を抽出したフラクション 3 で 30.9 %, デメチルオキシソ体とホルミル体を抽出したフラクション 1 で 29.1 % であり、代謝物を含めて測定すると、未変化体だけの値の約 3 倍であると推察できた。

以上、FLRX はウサギ下顎骨に形成した局所感染に対し優れた移行濃度を示し、ヒトでの有効性が期待される抗菌薬であると考えられた。

謝 辞

本研究に際し、HPLC 分析にご協力頂いた杏林製薬株式会社製剤技術センターの関係各位に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 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
- 2) 町田正明, 草嶋久生, 内田 広, 大石正夫: 新キノロン系抗菌剤 Fleroxacin の家兎における眼内動態に関する研究。Chemotherapy 38 (S-2): 115~121, 1990
- 3) 井本 隆: 経口用抗菌薬のモーメント解析法 Cefpodoxime proxetyl のヒト血中濃度解析。歯薬療法 7: 180~188, 1988
- 4) Legett J E, Fantin B, Ebert S, Totsuka K, Vogelmann B, Calame W, Mattie H, Craig W A: Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. J. Infect. Dis. 159: 281~292, 1989
- 5) Neuman M: Clinical pharmacokinetic of the newer

- antibacterial 4-quinolones. Clin Pharmacokinet 14: 96~121, 1988
- 6) 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剤 sparfloxacin の実験的感染ウサギ下顎骨移行—¹⁴C-sparfloxacin の分析について—。Chemotherapy 39 (S-4): 131~137, 1991
 - 7) 佐藤田鶴子, 岩重洋介, 足立雅利, 吉田 誠, 前川登志江, 柳井智恵, 山口昌彦, 湯澤伸好, 園山 昇: 口腔外科領域における Levofloxacin (LVFX) の基礎的ならびに臨床的研究。歯薬療法 11: 14~21, 1992
 - 8) 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, 大塚肇三: 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ーによる検討。Chemotherapy 41 (S-5): 718~722, 1993
 - 9) 井下万也, 佐藤田鶴子: 経口抗菌剤 ceftoram 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
 - 10) 川原富美男, 大家 毅, 永津芳雄, 内田 広: 新キノロン系抗菌剤 Fleroxacin のヒト及び各種実験動物における代謝。Chemotherapy 38 (S-2): 122~134, 1990

Transfer of a new quinolone, fleroxacin, to the oral tissues of experimentally infected rabbits

Tazuko Satoh, Makoto Yoshida, Aoi Abe, Yoshiki Ishigaki,
Takahiro Miyasaka and Masatoshi Adachi

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 present study was designed to measure the penetration of fleroxacin (FLRX) in to various tissues of New Zealand white male rabbits whose mandibles were experimentally infected with a combination of *Streptococcus milleri* and *Bacteroides fragilis*. When 20 mg of FLRX per kg was orally administered to the infected rabbits and normal rabbits, the T_{max} values of FLRX in the serum were 1.47 h in the infected group and 1.28 h in the normal group, while the C_{max} values were 3.55 $\mu\text{g/ml}$ and 3.23 $\mu\text{g/ml}$, respectively. In various tissues of the infected group, T_{max} values were 1.62 to 2.14 h and the C_{max} values were 2.01 to 6.21 $\mu\text{g/g}$. In particular, higher levels of transfer were observed in the submandibular lymph node, parotid gland and submandibular gland. The ratios of C_{max} to the serum level in the maxilla and mandible were approximately 57 % and 61 %, respectively. The C_{max} of FLRX in the pus obtained from the infected site was 3.08 $\mu\text{g/ml}$, which was 90 % of the serum level. FLRX showed sufficient concentration in the various oral tissues, and is fully expected to have an excellent clinical effect in the treatment of infectious diseases.