

## Balofloxacinの Mausにおける光毒性誘発能の検討

丸谷 清<sup>1,2)</sup>・杉山 修<sup>1)</sup>・小泉妙子<sup>1)</sup>・小松博道<sup>1)</sup>・三好昌夫<sup>1)</sup>・  
長谷川隆司<sup>1)</sup>・田中公一<sup>1)</sup>・大谷 元<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>中外製薬株式会社安全性研究所\*

<sup>2)</sup>岐阜大学大学院連合農学研究科

<sup>3)</sup>信州大学農学部動物生産利用学講座

Balofloxacin (BLFX) の光毒性誘導能について、BALB/c系雌性マウスの耳翼皮膚反応を指標として検討した。200あるいは800mg/kgのBLFXをマウスに単回経口投与した後に40J/cm<sup>2</sup>の長波長紫外線(UVA)を照射したところ、いずれの投与群でも耳翼に紅斑等の肉眼的変化はみられず、また耳翼皮膚組織の変化も認められなかった。しかしながら、比較対照として用いたオフロキサシン(OFLX)では200mg/kg群で2/6例、800mg/kg群で5/6例にいずれもごく軽度の紅斑が観察され、ナリジクス酸(NA)では200mg/kg以上の投与群で全例に中等度以上の紅斑が発現し、皮膚の病理組織学的検査により好中球を主体とする炎症性細胞の浸潤および皮下織および真皮の浮腫も認められた。

さらに、1日1回、7日間連続して20、80あるいは160mg/kgのBLFXをマウスに経口投与した後に20J/cm<sup>2</sup>のUVAを照射したところ、いずれの投与群でも耳翼の紅斑および耳翼組織の変化は認められなかった。同様の処置を施したOFLX群のマウスでは、OFLXの80mg/kg投与群では2/6例に、160mg/kg投与群では全例(n=6)の耳翼に軽度の紅斑が出現した。また、NA群のマウスでは、80mg/kg以上の投与群の全例に紅斑が継続的に観察され、組織球および好中球を主体とする炎症性細胞の浸潤が用量依存的に観察された。

これらマウスにおける単回および反復経口投与実験において観察された耳翼の紅斑を点数化し、各投与群の光毒性の程度を溶媒群と比較した。BLFXを投与したマウスでは、単回投与および反復投与のいずれにおいても溶媒群と同様陰性であったが、OFLXの800mg/kg、NAの200および800mg/kgを単回投与した群、またOFLXの160mg/kgおよびNAの80mg/kg以上を反復投与した群で、それぞれ有意に高いスコアが得られた。

以上の成績から、本実験条件下ではBLFXはマウスに対して光毒性を示さないと結論された。

**Key words** : balofloxacin, phototoxicity, mice, UVA

Balofloxacin (BLFX) はキノリン環7位に3'-メチルアミノピペリジンを、8位にメトキシ基を有する新規フルオロキノロン系抗菌薬(NQ)で、グラム陽性菌から陰性菌まで幅広い抗菌スペクトルを示し、特にmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、*Streptococcus pneumoniae*、*Enterococcus faecalis*などのグラム陽性球菌<sup>1,2)</sup>や、*Mycoplasma pneumoniae*<sup>3)</sup>などに対する優れた抗菌活性が確認されている。

フルオロキノロン系抗菌薬が各種感染症に対して広く適用されるようになり、臨床治療の場において種々の副作用が報告されてきている。なかでも、本系統の薬剤による光線過敏症<sup>4,5)</sup>の発現が最近話題になっている。

今回我々はBLFXに起因する光毒性の有無についてマウスを用いて検討したので、以下にその結果を報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 被験薬剤

BLFXは白色ないし微黄白色の結晶性粉末で、試験には中外製薬株式会社生産技術研究所で製造されたロット番号ROE01を用いた。比較対照薬として、ナリジクス酸ナトリウム(NA, ロット番号128F-5072, Sigma Chemical)およびオフロキサシン(OFLX, 市販錠剤より抽出・精製, ロット番号V007E29)をそれぞれ使用した。これら被検物質は使用時まで遮光保存し、BLFXおよびOFLXは日局注射用蒸留水(ロット番号90J22A, 扶桑薬品工業)に懸濁し、NAは0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC, ロット番号CTM2955, 和光純薬工業)に溶解して用いた。

### 2. 使用動物および飼育条件

BALB/c CrSlc系雌性マウス (SPF) を日本エス・エル・シーより購入し、約1週間の檢疫・馴化期間中に一般状態に異常が認められず、順調に発育した動物を実験に使用した。投与開始時の体重範囲は19.0~26.0gであった。これらの動物は、室温23±2℃、相対湿度55±10%、人工照明時間14時間(5:00~19:00)、換気回数14~16回/時に設定した飼育室でポリカーボネート製ケージ(215×320×130mm, 5~6匹/ケージ)に収容して飼育した。飼料は、CE-2(日本クレア)を不断給餌し、飲料水は水道水と井戸水の混合水を瓶給水方式により自由摂取させた。また、床敷にはソフトチップ(原商店)を使用した。なお、飼育期間中の動物室の温湿度ならびに飼料および飲料水の分析結果には、試験に影響を及ぼす異常はなかった。

### 3. 試験方法

#### 1) 紫外線照射装置および測定装置

東芝ブラックライト蛍光ランプFL20S・BLB型を5.5cmの間隔で13本並列に配置した照射装置を用いた(ガラス板により中波長域紫外線を吸収)。照射強度の測定には、紫外線強度計(UVR-365, 東京光学機械)を用いた。

#### 2) 投与および紫外線照射

投与経路は、BLFXの臨床適用経路である経口投与とした。

単回投与試験では、前述の各溶媒に懸濁したBLFX、OFLX、NAの200mg/10ml/kgおよび800mg/10ml/kgを、また、反復投与試験では1日1回、連続7日間、いずれの薬剤とも20, 80および160mg/10ml/kgを、いずれも常法に従いマウス用金属製経口ゾンデを使用して各群5~6匹のマウスに強制経口投与した。陰性対照群のマウスには0.5%CMC水溶液の10ml/kgを投与した。

その30分後に5.6mW/cm<sup>2</sup>の照度の長波長紫外線(UVA)を単回投与試験では120分間(総エネルギー量は40J/cm<sup>2</sup>)、反復投与試験では60分間(20J/cm<sup>2</sup>)照射した。このUVA照射強度は、我々の研究所が立地する長野県南部における夏期快晴時の日中屋外でのそれとほぼ同等である。投与量は投与直前に島津動物用電子天秤EB-2800M(島津製作所)を用いて測定した体重をもとに算出した。

#### 3) 観察方法

単回投与試験ではUVA照射の30分、24、48および72時間後に、また、反復投与試験では毎回のUVA照射の直前、30分後および最終照射の30分、24、48、72時間後に耳翼の皮膚反応を観察し、次に示した判定基準に従って付点した。

紅斑をみとめない	0
ごく軽度の紅斑	1
明らかな紅斑	2

中等度~強度の紅斑 3

強度の紅斑~軽度の痂皮形成 4

#### 4) 病理組織学的検査

観察終了後のマウスをエーテル深麻酔下で安楽死させ、耳翼を10%ホルマリンで固定した。固定後、常法に従ってヘマトキシリン-エオジン重染色標本を作製し、光学顕微鏡下で観察した。

#### 5) 統計学的処理

耳翼皮膚反応から得られた評点から個体毎に点数の総和を算出し、各試験群の個体別の評点の合計に対して、Wilcoxonの順位和検定により、各試験群について対応する溶媒群と比較し、5%の水準で有意差を判定した。

## II. 結果

### 1. 単回投与試験

耳翼の皮膚反応の成績をTable 1に示した。BLFXの200mg/kg, 800mg/kg群および0.5%CMCを投与した溶媒群では、UVA照射30分および24, 48, 72時間後に、耳翼に皮膚反応の発現した個体はなかった。一方、OFLXの200mg/kg群では2/6例に照射30分あるいは24時間後にごく軽度の紅斑(評点1)が一過性に観察され、800mg/kg群では5/6例で照射30分後から24時間後までごく軽度の紅斑(評点1)が観察され、48, 72時間後にも各3, 1例に継続して認められた。また、NAの200mg/kg群と800mg/kg群では、いずれも全例(n=6)の耳翼に明らかな紅斑~中等度の紅斑(評点2~3)が、照射30分後以降、観察終了時まで継続して観察された。このように、照射終了後の耳翼の観察結果から個体別の評点の総和(4時点)の群別平均値を算出すると、BLFXではいずれの投与群でも0であったが、OFLXでは200mg/kg群で0.5, 800mg/kg群で2.3, NAでは200mg/kg群で7.8, 800mg/kg群で9.2となり、OFLXの800mg/kg群およびNAの200mg/kg以上の投与群のスコアは、溶媒群と比べて有意に高かった。

照射72時間後の耳翼皮膚の病理組織学的検査(Table 2)においては、BLFX、OFLXおよび溶媒群のすべての動物では、異常はみられなかった。一方、NAの200mg/kg群の3/6例で好中球を主体とする軽度~中等度の炎症性細胞浸潤が、さらにその内の2例で皮下織および真皮における軽度の浮腫が観察された。また、800mg/kg群では、全例に好中球を主とする軽微~中等度の炎症性細胞浸潤がみられ、その内の1例では、真皮から真皮下にかけて軽度な膿瘍ならびに潰瘍の形成が認められた。また、4/6例では皮下織および真皮における軽度の浮腫が観察された。

前述の耳翼の皮膚反応および病理組織学的検査から3種のキノロン薬の光毒性の程度を比較すると、BLFXではいずれの処置によっても耳翼の紅斑はまったく観察されず、また観察終了後の耳翼における組織学的検査でも

変化が認められなかったことから、光毒性誘発能の強さはNA>OFLX>BLFXの順となった。

## 2. 反復投与試験

耳翼の皮膚反応の成績をTable 3に示した。0.5%CMCを投与した溶媒群ならびにBLFXの20mg/kg, 80mg/kg, 160mg/kg群, OFLXの20mg/kg群およびNAの20mg/kg群では、観察期間を通して、耳翼に皮膚反応の発現した個体はなかった。一方、OFLXの80mg/kg群では、5回目ないし7回目の照射30分後にごく軽度の耳翼の紅斑(評点1)が2/6例に発現し、160mg/kg群では、2回目の照射30分後からごく軽度の紅斑が2/6例にみられ、5回目まで紅斑の程度を強めることなく発現例数のみ増加した(6/6例)が、その後は陽性例は減少し(3/6例)、最終照射の24時間後には紅斑のみられる例はなかった。また、NAでは80mg/kgおよび160mg/kg群で1回目の照射30分後からごく軽度あるいは明らかな紅斑(評点1~2)が全例の耳翼に観察され、いずれの群でも投与および照射を重ねるに従って紅斑の程度が強まり、6回目以降には80mg/kg群では明らかな紅斑(評点2)、160mg/kg群では中等度(評点3)の紅斑が観察終了時までほぼ継続して

認められた。以上の観察結果から、個体別の評点の総和(合計16時点)の群別平均値を算出すると、BLFXの各投与群、OFLXおよびNAの20mg/kg群並びに溶媒群では0であったが、OFLXの80mg/kg群では0.7、160mg/kg群では4.0、またNAの80mg/kg群では16.8、160mg/kg群では37.0となり、OFLXの160mg/kg群およびNAの80mg/kg以上の投与群のスコアは、溶媒群と比較して有意に高かった。

一方、耳翼皮膚の病理組織学的所見(Table 4)では、BLFX, OFLXおよび溶媒群のすべてのマウスでは、異常はみられなかった。一方、NAでは、20mg/kg群には異常はみられなかったが、80mg/kg群の1/6例に組織球および好中球を主体とする軽微な炎症性細胞浸潤が、160mg/kg群では4/5例で組織球および好中球を主とする軽度から中等度の炎症性細胞浸潤ならびに皮下織および真皮における軽度の浮腫が観察された。

したがって7日間反復投与試験における3薬剤の光毒性誘発能の強さは、単回投与試験同様、NA>OFLX>BLFXと順位付けられた。

Table 1. Induction of inflammatory reaction in the ears of mice receiving balofloxacin, ofloxacin or nalidixic acid (single administration)

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of mice	Time after irradiation				Incidence of inflammation	Score <sup>a)</sup> mean (±SD)
			30 min	24 h	48 h	72 h		
Control	0	6	0 <sup>b)</sup>	0	0	0	0/6	0
balofloxacin	200	6	0	0	0	0	0/6	0
	800	6	0	0	0	0	0/6	0
ofloxacin	200	6	1	2	0	0	2/6	0.5 (0.8)
	800	6	5	5	3	1	5/6	2.3 (1.4) <sup>c)</sup>
nalidixic acid	200	6	6	6	6	6	6/6	7.8 (0.8) <sup>c**)</sup>
	800	6	6	6	6	6	6/6	9.2 (0.4) <sup>c**)</sup>

<sup>a)</sup> Mean of total individual scores obtained by observations on ear redness as follows:

0, normal; 1, very slight erythema; 2, well defined erythema; 3, moderate to severe erythema; 4, severe erythema to slight eschar formation.

<sup>b)</sup> Number of animals with ear redness.

<sup>c)</sup> P<0.05, <sup>c\*\*)</sup> P<0.01

Table 2. Histopathological findings in ear sections (single administration)

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of mice	Neutrophil infiltration					Edema				
			- <sup>a)</sup>	±	+	++	##	-	±	+	++	##
Control	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
balofloxacin	200	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	800	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
ofloxacin	200	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	800	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
nalidixic acid	200	6	3	0	2	1	0	4	0	2	0	0
	800	6	0	2	2	2 <sup>b)</sup>	0	2	0	4	0	0

<sup>a)</sup> -: normal, ±: very slight, +: slight, ++: moderate, ##: marked.

<sup>b)</sup> Slight formation of micro-abscess and ulcer was observed on the part of corium and subcutaneous tissue in 1 of 2 mice.

Table 3. Induction of inflammatory reaction in the ears of mice receiving balofloxacin, ofloxacin or nalidixic acid (consecutive administration)

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of mice	Times of treatment							Incidence of inflammation	Score <sup>a)</sup> (±SD)	
			1	2	3	4	5	6	7			
Control	0	6	0-0 <sup>b)</sup>	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0-0-0-0	0/6	0
balofloxacin	20	6	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0-0-0-0	0/6	0
	80	6	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0-0-0-0	0/6	0
	160	6	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0-0-0-0	0/6	0
ofloxacin	20	6	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0-0-0-0	0/6	0
	80	6	0-0	0-0	0-0	0-0	0-1	0-1	0-1	0-2-0-0-0	2/6	0.7 (1.2)
	160	6	0-0	0-2	0-3	0-5	0-6	0-3	0-3	2-3-0-0-0	6/6	4.0 (1.3) <sup>c)</sup>
nalidixic acid	20	6	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0-0-0-0	0/0	0
	80	6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	4-6	6-6-6-6-6	6/6	16.8 (0.8) <sup>c)</sup>
	160	5	0-5	5-5	5-5	5-5	5-5	5-5	5-5	5-5-5-5-5	5/5	37.0 (1.2) <sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Means of total individual scores obtained by observations on ear redness as follows:

0, normal; 1, very slight erythema; 2, well defined erythema, 3, moderate to severe erythema; 4, severe erythema to slight eschar formation.

<sup>b)</sup> Number of animals with ear redness:

1st to 6th treatments, (pre)-(30 min); 7th treatment, (pre)-(30 min)-(24 h)-(48 h)-(72 h).

<sup>c)</sup>: P<0.01.

Table 4. Histopathological findings in ear sections (consecutive administration)

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of mice	Cell infiltration <sup>a)</sup>					Edema				
			- <sup>b)</sup>	±	+	++	≠	-	±	+	++	≠
Control	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
balofloxacin	20	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	80	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	160	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
ofloxacin	20	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	80	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	160	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
nalidixic acid	20	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	80	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0
	160	5	1	0	3	1	0	1	0	4	0	0

<sup>a)</sup> Histiocyte and neutrophil.

<sup>b)</sup> -: normal, ±: very slight, +: slight, ++: moderate, ≠: marked.

### Ⅲ. 考 察

フルオロキノロン系抗菌薬(NQ薬)の副作用としては、消化管および中枢毒性<sup>6,7)</sup>、幼若動物における関節毒性<sup>8)</sup>、非ステロイド系炎症剤(NSAIDs)やテオフィリン併用療法下での痙攣誘発作用<sup>9,10)</sup>とともに光線過敏症の発現<sup>4,5)</sup>が知られている。本系統の薬剤による光線過敏症は、母核である4-oxoquinoline環の8位にフッ素や塩素などのハロゲン置換体を有する構造の薬剤において比較的高頻度に見られることが経験的に知られているが、その発症機序は未だ不明な点が多い。Matsumotoら<sup>11)</sup>はBLFXの8位のみをフッ素に置換した8-Fおよび8位未置換の8-Hを用いて、これら誘導体のUVA照射に対する安定性ならびにUVA照射物による細胞障害性を調べている。その結果、BLFXの光安定性が8-Fや8-Hと比較して極めて高く、他の誘導体で認められる細胞障害性がBLFXでは著

明に減弱することを明らかにしている。またWagaiら<sup>12)</sup>は同系マウスを用いて各種市販NQ薬の光毒性誘発能を検討し、使用した6種のNQ薬のいずれにおいても光毒性反応の発現を認めている。その相対強度はロメフロキサシン>エノキサシン=NA>OFLX=DR-3355=シプロフロキサシンとなり、8位フルオロ基を有するロメフロキサシンが最も強い光毒性を示した。これらの事実はNQ薬に共通するキノリン骨格そのものが生体に対して光毒性反応を誘発し得るポテンシャルを有するとともに、キノリン環8位の側鎖構造が光毒性誘発に重要な役割を果たしていることを示唆している。したがって、*in vivo*での光毒性誘発能に及ぼす8位メトキシ基の効果について興味を持たれるところである。

今回、BLFXのマウスに対する光毒性誘導能についてNAおよびOFLXを比較対照薬として検討したところ、

OFLXおよびNAでは200mg/kg以上投与した場合に皮膚の発赤反応が用量依存的に観察された。これらは、病理組織学的には好中球の浸潤ならびに皮下織および真皮の浮腫に特徴付けられる急性の炎症性変化であった。一方、BLFXでは投与可能な最高用量である800mg/kg群でも変化は認められなかった。この傾向は、7日間連続して反復処置した場合でも同様であり、繰り返し投与による光毒性反応の発現はみられなかった。

このように、市販キノロン薬が陽性反応を誘導する条件下でさえ、BLFXを投与されたマウスでは光毒性反応がまったく観察されなかったことから、NQ薬の光毒性反応誘導能がその光安定性と密接に関連している可能性が高い。今後は8位側鎖構造の違いによる光毒性増減のメカニズムについて、光エネルギーによるラジカル生成との関連の中で明らかにしてゆくことが必要であろう。

#### 文 献

- 1) Ito T, Otsuki M, Nishino T: *In vitro* antibacterial activity of Q-35, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1708~1714, 1992
- 2) Matsubara S, Matsumoto M, Ishigai M, Nakagami M, Nabuchi Y, Takahashi F, Tanaka K: Pharmacokinetics and pharmacology of Q-35, a new 8-methoxy quinolone, in experimental animals. *Program Abstr, 31st ICAAC*, abstract No. 1445, 1991
- 3) Gohara Y, Arai S, Akashi A, Kuwano K, Tseng Cheng-Chuang, Matsubara S, Matsumoto M, Furudera T: *In vitro* and *in vivo* activities of Q-35, a new fluoroquinolone, against *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1826~1830, 1993
- 4) Birkett D A, Garretts M, Stevenson C J: Phototoxic bullous eruptions due to nalidixic acid. *Br J Dermatol* 81: 342~344, 1969
- 5) Kawabe Y, Mizuno N, Sakakibara S: Photoallergic reactions caused by enoxacin. *Photodermatology* 6: 57~59, 1989
- 6) Christ W, Lehnert T, Ulbrich B: Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev Infect Dis* 10 (Suppl. 1): S141~S146, 1988
- 7) Halkin H: Adverse effects of the fluoroquinolones. *Rev Infect Dis* 10(Suppl. 1): S258~S261, 1988
- 8) Patterson D R: Quinolone toxicity: methods of assesment. *Am J Med* 91B. *catarrhalis*: 35S~37S, 1991
- 9) Wijnands W J, van Herwaarden C L, Vree T B: Enoxacin raises plasma theophylline concentrations. *Lancet* ii(8394): 108~109, 1984
- 10) Yamamoto K, Naitoh Y, Inoue Y, Yoshimura K, Morikawa K, Nagata O, Hashimoto S, Yamada T, Kubo S: Seizure discharges induced by the combination of new quinolinecarboxylic acid antimicrobial drugs and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chemotherapy* 36 (Suppl. 2): 300~324, 1988
- 11) Matsumoto M, Kojima K, Nagano H, Matsubara S, Yokota T: Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1715~1719, 1992
- 12) Wagai N, Yamaguchi F, Sekiguchi M, Tawara K: Phototoxic potential of quinolone antibacterial agents in Balb/c mice. *Toxicol Letters* 54: 299~308, 1990

## Phototoxicity study of balofloxacin in mice

Kiyoshi Marutani<sup>1, 2)</sup>, Osamu Sugiyama<sup>1)</sup>, Taeko Koizumi<sup>1)</sup>, Hiromichi Komatsu<sup>1)</sup>, Akio Miyoshi<sup>1)</sup>, Takashi Hasegawa<sup>1)</sup>, Kouichi Tanaka<sup>1)</sup> and Hajime Otani<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Toxicology Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

14016, Minamihara, Nakaminowa, Minowa-machi, Kamiina-gun, Nagano 399-46, Japan

<sup>2)</sup>The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University

<sup>3)</sup>Division of Animal Science, Shinshu University

We examined the phototoxic potential of balofloxacin (BLFX), a newly developed fluoroquinolone antibacterial agent in which a methoxy group is substituted at the 8 position of the quinoline nucleus, using BALB/c mice under irradiation with long-wave UV light (UVA).

When mice were dosed orally with a single dose of 800 mg of BLFX per kg of body weight, the maximum dose given, and exposed to UVA light, no inflammatory lesions were observed in their ears. Ear redness was marked in mice given a single oral dose of more than 200 mg of ofloxacin (OFLX) and nalidixic acid (NA) per kg, and exposed to UVA light. Histopathological changes, edema, and infiltration of neutrophils were also observed microscopically in groups receiving NA but not in groups receiving OFLX nor BLFX. Similar inflammatory reactions were observed to occur in a dose-dependent manner with consecutive dosing of OFLX and NA.

From these results, it could be concluded that BLFX lacks phototoxic potential in mice as long as it is given under the present conditions.