

Gatifloxacin の *in vitro* pharmacokinetic model における殺菌作用

保坂雅喜・若林栄二

杏林製薬株式会社中央研究所*

ヒトの血清中薬剤濃度推移を再現する *in vitro* pharmacokinetic model を用いて、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (以下、*S. aureus*)、*Streptococcus pneumoniae*、*Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する gatifloxacin (GFLX) の殺菌作用を検討し、以下の知見を得た。

1. GFLX は 200mg 内服時の血清中薬剤濃度を再現した *in vitro* モデルにおいて、*S. aureus* Smith、*S. pneumoniae* Type III および *E. coli* ML4707 に対し強い殺菌作用を示し、菌増殖抑制作用は 24 時間持続した。しかし、*P. aeruginosa* IID1210 に対しては殺菌作用を示したものの、薬剤添加 6 時間後より再増殖がみられ、24 時間後には菌数が非添加群と同レベルに達した。

2. *In vitro* pharmacokinetic model における GFLX の殺菌作用は、本化合物の *in vitro* 抗菌力と薬剤濃度推移に依存した。

3. GFLX の殺菌効果を類薬と比較した結果、*S. aureus*、*S. pneumoniae* 及び *P. aeruginosa* に対しては tosufloxacin、sparfloxacin および levofloxacin と同等以上の効果を示した。

Key words : gatifloxacin, pharmacokinetic model, 殺菌作用

Gatifloxacin (GFLX) は杏林製薬株式会社で開発中の新キノロン系抗菌薬である。本化合物はグラム陽性菌および陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを示し、sparfloxacin (SPFX) や tosufloxacin (TFLX) とほぼ同等の抗菌活性を示すことが報告されている^{1,2)}。さらに、GFLX はヒトにおいて内服後、ほぼ完全に吸収され、高い血清中濃度を示した後、約 7~8 時間の半減期で消失することが報告されている³⁾。

キノロン系抗菌薬は、MIC 付近以上の濃度で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条件下での生菌数の変化を観察している場合が多いが、生体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。

そこでわれわれは、この薬動学的パラメーターを考慮した GFLX の殺菌作用を検討するため、200mg 内服時のヒトの血清中薬剤濃度推移を再現した *in vitro* pharmacokinetic model を用いて種々の菌に対する殺菌効果を検討し、類薬と比較した。

I. 材料と方法

1. 薬剤

GFLX (1½ 水和物: Lot No. G155311, 929 µg 力価/mg), ciprofloxacin (CPFX Lot No. K5Z9911, 859 µg 力価/mg), levofloxacin (LVFX Lot No. D495317, 941 µg 力価/mg), SPFX (Lot No. K929911, 1,000 µg 力価/mg) および TFLX (Lot No. G819010, Lot No. K235317, 680 µg 力価/mg) は杏林製薬株式会社で合成された原末を使用した。いずれの薬剤も力価の明らかなものを使用し、濃度は化合物 base に換算して表示した。

2. 試験菌株

以下の 4 菌株を用いた。

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Smith

Streptococcus pneumoniae Type III

Escherichia coli ML4707

Pseudomonas aeruginosa IID1210

なお、*S. pneumoniae* Type III は京都薬科大学より分与いただいた株を使用した。

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

を参考に、one compartment modelとして自社で作製したものを使用した。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、希釈液（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 $F_1 + F_2 = F_3$ ）を調節することにより、各薬剤のkineticsにあわせた濃度推移をC内に再現した。すなわち、Cの容量 V_c はヒトにおける薬剤消失速度定数 K_e および流速 F_3 から $F_3 = K_e \times V_c$ に従って算出された値に設定した。吸収相に相当する薬剤濃度の上昇域では吸収速度定数 K_a にあわせた流速 $F_1 = F_3 \cdot e^{K_a \cdot t}$ で薬液をCに注入した。このような設定のもとに各薬剤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。Pharmacokinetic modelにおける薬物濃度は分光光度計（HITACH U-3200）を用いてUV吸収を測定することにより定量し、ヒト血清中濃度がsimulateされていることを確認した後、殺菌効果の検討を行った。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、攪拌培養した。殺菌効果は、経時的に培地を採取し生菌数を測定す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学的パラメーターは臨床試験の結果^{5,6,8}から算出され

た値を用いた（Table 1）。

4. *In vitro* 抗菌力の測定

試験菌株に対する各薬剤の最小発育阻止濃度（MIC）は日本化学療法学会制定のMIC測定法に準じ寒天平板法により測定した⁹。なお、感受性測定用培地として*S. pneumoniae*には馬脱繊維血を5%添加したMueller Hinton agar（MHA, Difco）を、それ以外の菌にはMHAを用いた。 10^6 CFU/mLの菌を接種し、37℃、約20時間培養した後に、MICを測定した。

II. 結 果

GFLXおよび類薬の通常臨床用量を内服した時のヒト血清中濃度にsimulateさせた*in vitro*モデルを用いて、*S. aureus*、*S. pneumoniae*、*E. coli*および*P. aeruginosa*に対する各薬剤の殺菌作用を検討した。実験に用いた*in vitro* pharmacokinetic modelにおける各薬剤の濃度推移をFig. 2に、各菌株のMICをTable 2に、各薬剤の*in vitro*モデルにおける試験菌株の生菌数変動をFig. 3~6に示した。

(1) *S. aureus*

各薬剤の*S. aureus* Smithに対する殺菌作用を検討した結果、いずれの薬剤においても菌は薬剤添加直後から効

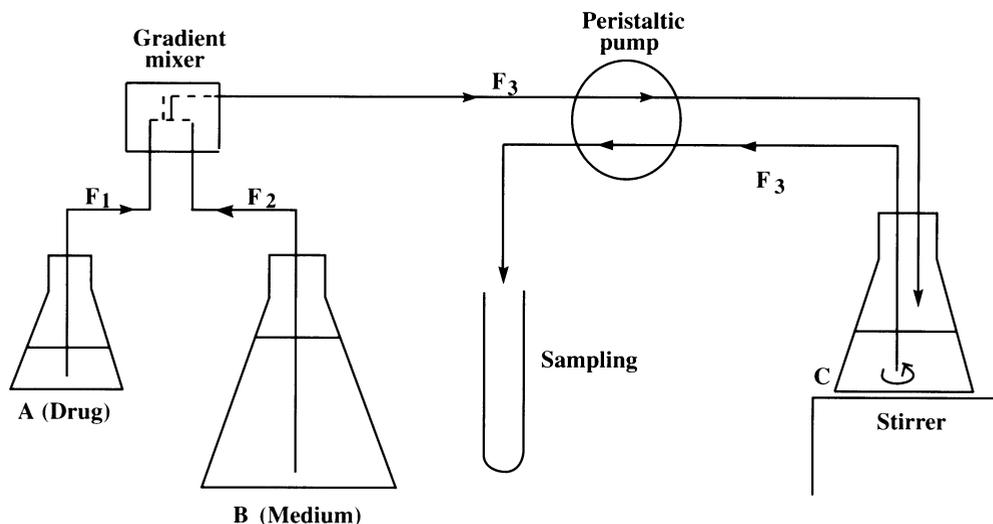


Fig. 1. Apparatus for simulation of serum concentration of drug after oral administration.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of quinolones in humans

Drug	Dose	K_a (h^{-1})	K_e (h^{-1})	C_{max} ($\mu g/mL$)	Reference
Gatifloxacin	200 mg	2.84	0.098	1.71	3
Ciprofloxacin	200 mg	2.96	0.25	1.37	5
Levofloxacin	100 mg	11.7	0.18	1.22	6
Sparfloxacin	300 mg	0.49	0.048	0.88	7
Tosufloxacin	150 mg	1.44	0.18	0.37	8

果的に殺菌され、その後菌増殖抑制効果はLVFXおよびTFLXで10時間以上、GFLXおよびSPFXでは24時間持続した (Fig. 3)。

(2) *S. pneumoniae*

GFLX, CPFX および SPFX を作用させた時の *S. pneumoniae* Type III の菌数は薬剤添加後から徐々に減少し、それぞれ4, 6および10時間後に検出限界以下に達した。GFLX および SPFX では増殖抑制効果は24時間後まで持続したが、一方、CPFX および LVFX では8時間以上作用が持続したものの、24時間後には再増殖がみられ、約 10^6 CFU/mLの菌数が検出された (Fig. 4)。

(3) *E. coli*

E. coli ML4707 に対する殺菌作用はいずれの薬剤においても強く、投与直後から急速な菌数の減少がみられ、その効果は24時間持続した (Fig. 5)。

(4) *P. aeruginosa*

GFLX および LVFX では薬剤添加直後から菌数の減少がみられ2時間後に菌数は最低レベルに達したが、その後増殖し24時間後にはコントロールと同レベルに達した。一方、SPFX および TFLX は顕著な殺菌作用は観察されなかったが、数時間にわたって菌の増殖抑制作用はみられた。しかし、24時間後にはGFLX および LVFX と同様、菌数はコントロールと同レベルに達した。CPFX は検討したキノロン系抗菌薬の中では最も強い殺菌作用を示し、薬剤添加1時間後には検出限界以下に菌数は減少したが、6時間後以降、他剤と同様再増殖がみられた。*P. aeruginosa* IID1210 は他の菌株に比べCPFXを除く各キノロン系抗菌薬に対する感受性が低く、それぞれの薬剤における殺菌効果は弱かった (Fig. 6)。

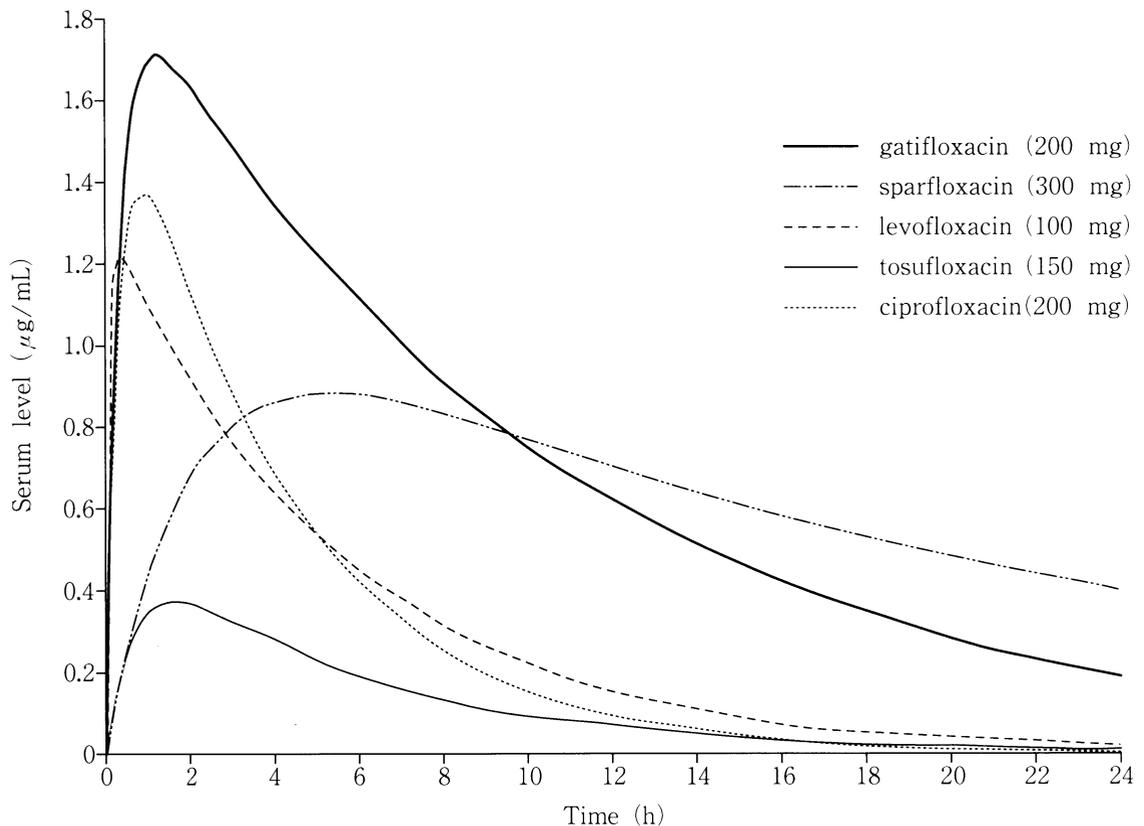


Fig. 2. Time-concentration curves simulating the serum level of quinolone agents after a single oral administration of the clinical dose.

Table 2. *In vitro* antibacterial activity of quinolones

Organism	MIC (μ g/mL)				
	Gatifloxacin	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Sparfloxacin	Tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Smith	0.05	0.39	0.20	0.025	0.025
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	0.05	0.20	0.20	0.10	0.05
<i>Escherichia coli</i> ML4707	0.0063	0.0031	0.0125	0.0063	0.0063
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID1210	0.78	0.20	0.78	0.78	0.39

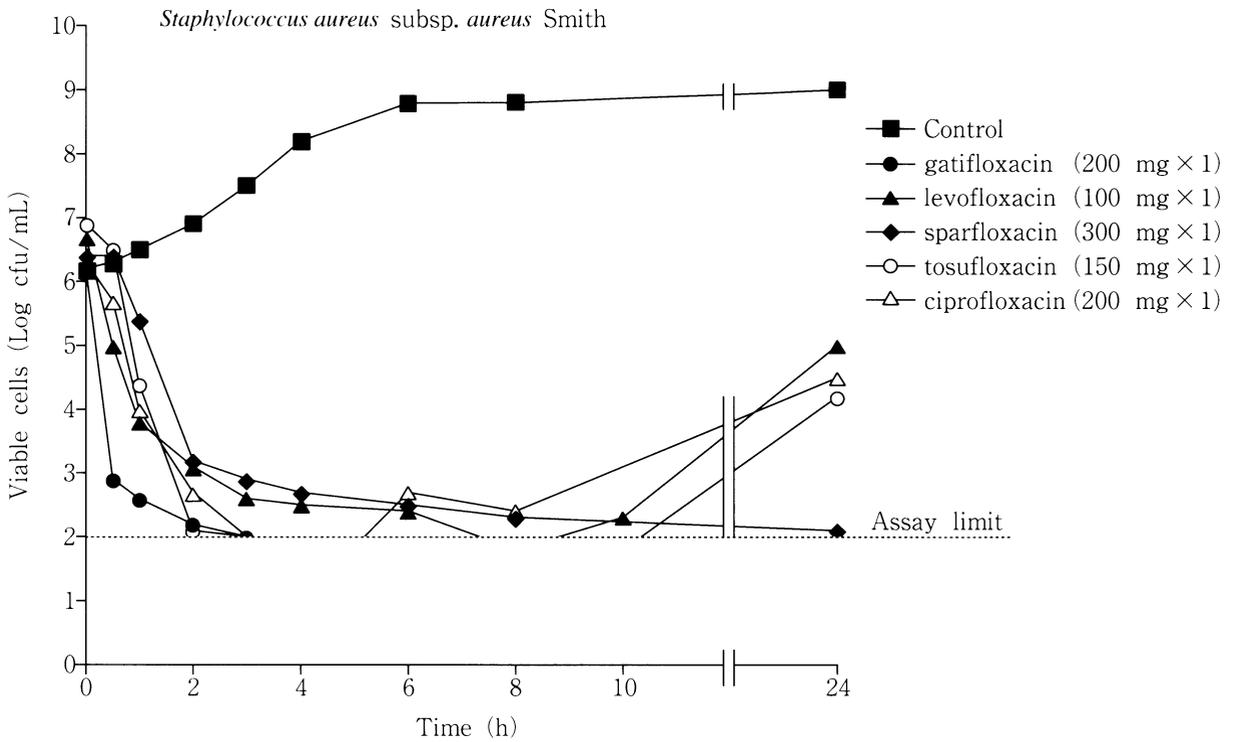


Fig. 3. Bactericidal activity of quinolone agents against *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* in *in vitro* pharmacokinetic model

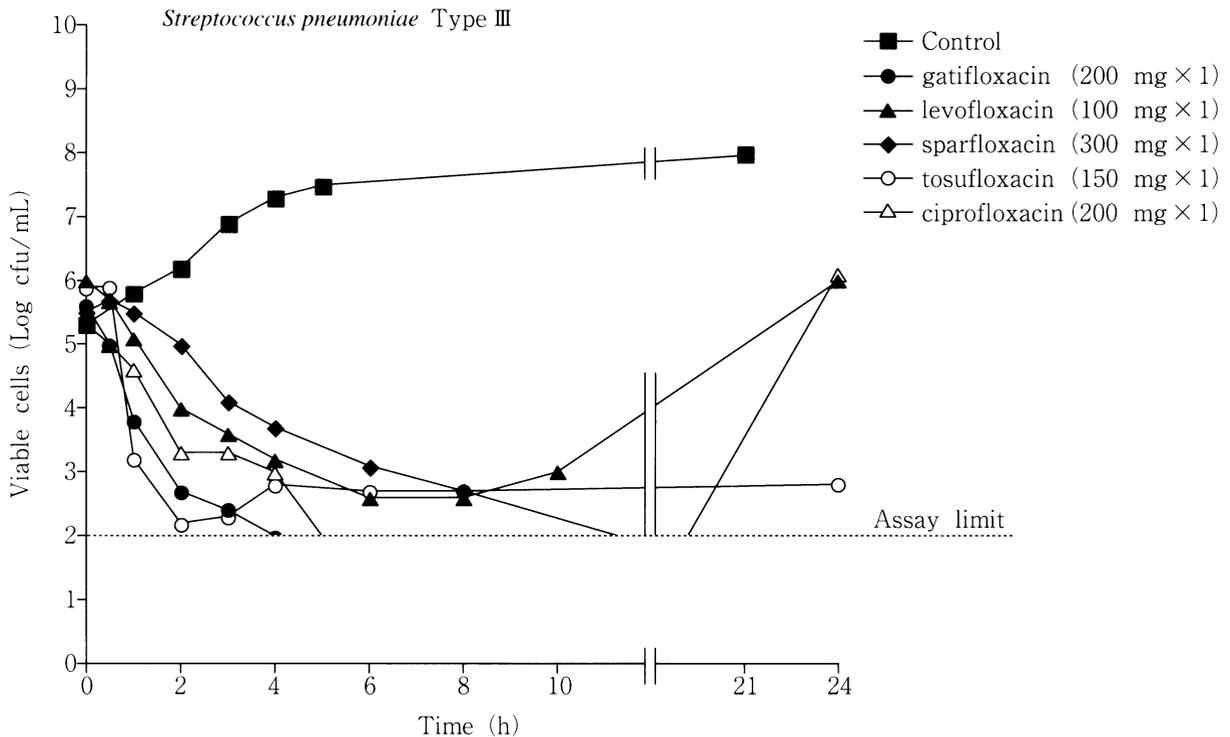


Fig. 4. Bactericidal activity of quinolone agents against *Streptococcus pneumoniae* in *in vitro* pharmacokinetic model

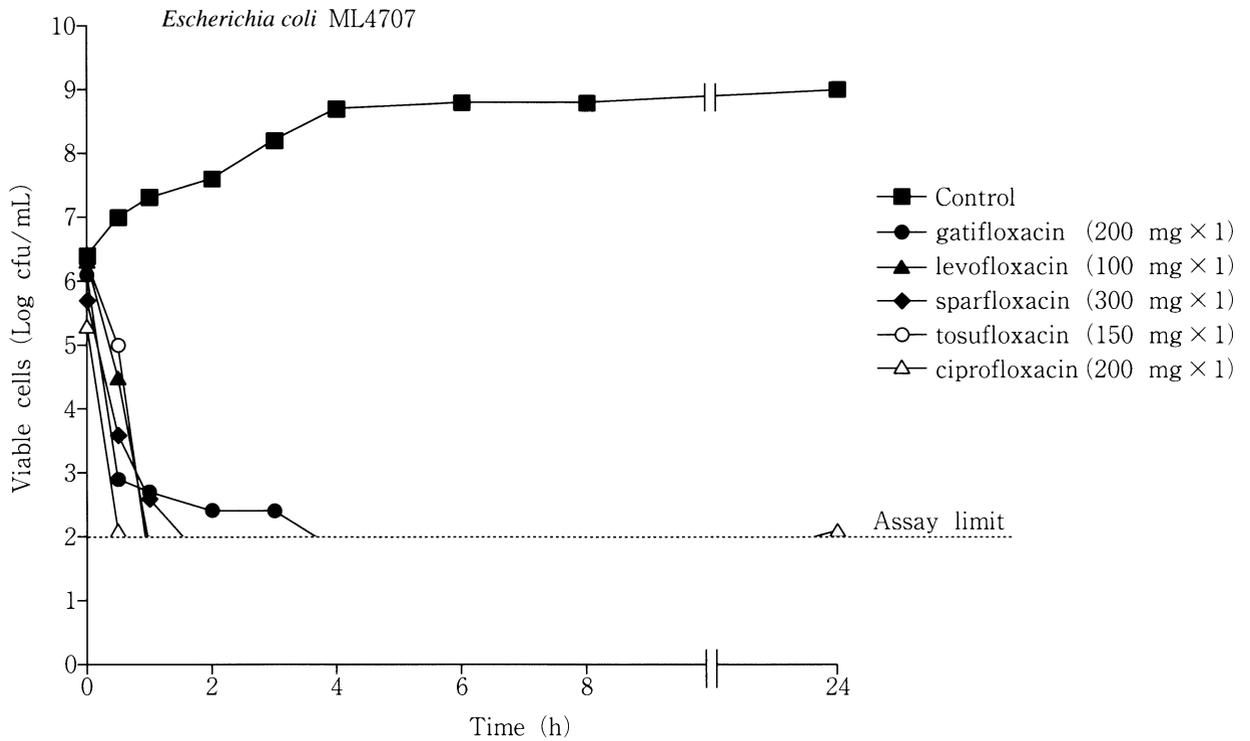


Fig. 5. Bactericidal activity of quinolone agents against *Escherichia coli* in *in vitro* pharmacokinetic model

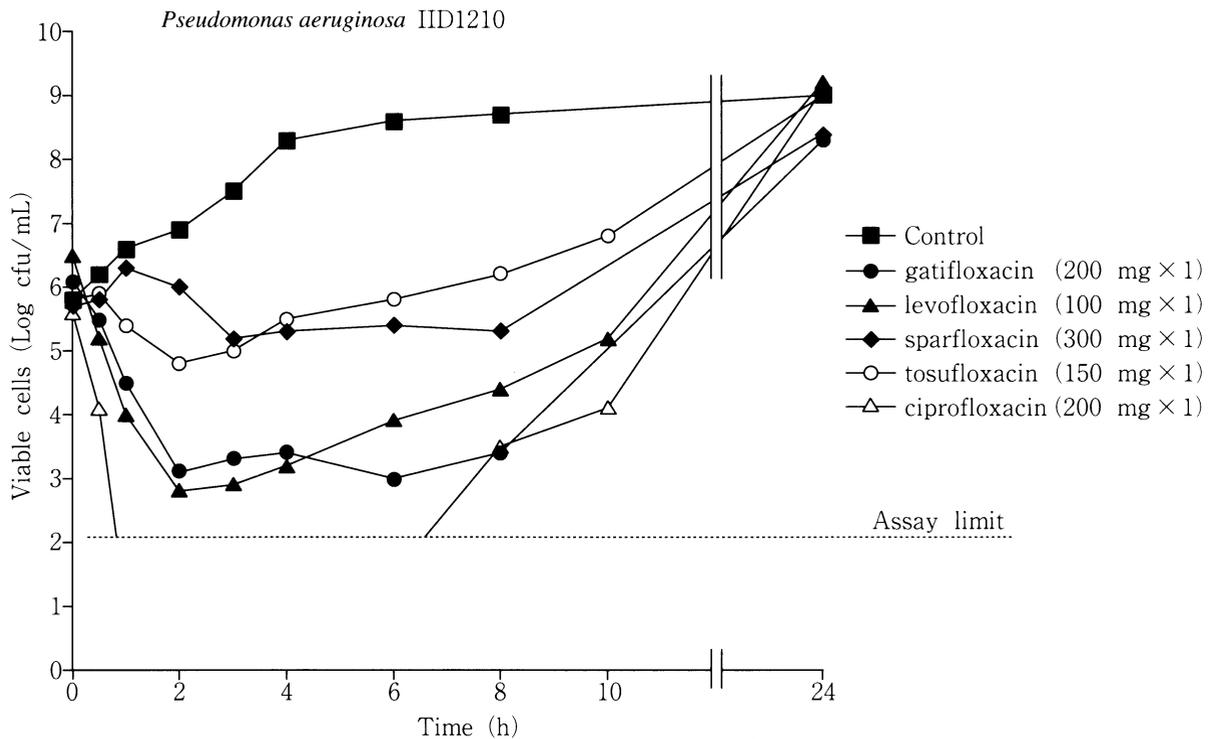


Fig. 6. Bactericidal activity of quinolone agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *in vitro* pharmacokinetic model

Ⅲ. 考 察

ヒトの血清中薬剤濃度推移を再現する *in vitro* モデルを用いて、GFLXの各種菌株に対する殺菌作用を検討し、類薬と比較した。

臨床試験の結果^{3,5,8)} から simulate した各薬剤の臨床用量服用時のヒト血清中薬剤濃度推移を比較すると、SPFX および TFLX のピークレベルは GFLX, CPFX および LVFX に比べ低く、また、SPFX の濃度曲線は緩やかであった。このような薬剤の濃度推移下での殺菌作用を4種の菌株を用いて検討した。

その結果、本モデルにおいて GFLX は *S. aureus*, *S. pneumoniae* および *E. coli* に対し、優れた *in vitro* 抗菌力を反映して良好な殺菌効果を示した。これに対し、*P. aeruginosa* は他の菌種に比べ薬剤感受性が低く、検出限界まで達することなく比較的早い時間から再増殖がおこっていた。

我々はこれまでに *in vitro* pharmacokinetic model を用いた検討からキノロン系抗菌薬の殺菌力はピーク濃度に、その後の菌増殖抑制作用は薬剤消失速度（あるいは Time above MIC）に依存することを報告している¹⁰⁾。今回の検討では、*P. aeruginosa* に対する殺菌効果は CPFX が最も強く、GFLX, LVFX がこれに次ぎ、SPFX, TFLX の効果は弱かった。血中ピーク濃度と *P. aeruginosa* に対する MIC との比 (Cmax/MIC) は CPFX : 6.9, GFLX : 2.2, LVFX : 1.6, SPFX : 1.1, TFLX : 0.9 であり、*P. aeruginosa* に対して薬物添加後にみられる各薬物の殺菌効果は Cmax/MIC と関連していると考えられた。また、GFLX では、*S. aureus*, *S. pneumoniae* および *E. coli* に対して MIC レベル以上の薬剤濃度がほぼ24時間維持されており、菌の増殖抑制作用も24時間持続したが、*P. aeruginosa* に対しては MIC を上回る濃度は数時間程度であり、菌数は6時間後まで減少したものの、その後再増殖が観察された。同様の現象は類薬でも観察され、CPFX や LVFX では *S. aureus* および *S. pneumoniae* で8時間以降再増殖が認められた。このことは本モデルにおいて、キノロン系抗菌薬の菌増殖抑制作用が Time above MIC と関連していることを示唆している。また、*S. aureus* や *S. pneumoniae* に対し、GFLX では薬剤添加直後から比較的速い菌数の減少がみられたが、それに比べ SPFX では菌数の減少は緩やかであり、このことは薬剤濃度の上昇の速さが生体内での迅速な殺菌作用の発現につながることを示唆している。以上のことから、pharmacokinetic model における各薬物の殺菌効果は、*in vitro* 抗菌力及び薬剤濃度推移に依存すると考えられた。

後藤ら¹¹⁾ は SPFX の *in vitro* pharmacokinetic system における殺菌作用について報告しており、今回我々が用いたモデルにおいて得られた結果はそれらの報告とほぼ一致していた。近年開発された各キノロン系抗菌薬はい

ずれも抗菌活性が増強され、本モデルにおいても血清中で検出される薬剤濃度で *P. aeruginosa* を除く各菌は効果的に殺菌され、その後長時間にわたって増殖が抑制されたが、これらの効果は各薬剤のすぐれた臨床成績に反映しているものと思われる。

GFLX は *in vitro* pharmacokinetic model を用いた本試験において、*P. aeruginosa* に対し SPFX および TFLX より優れた殺菌効果を示した。また、グラム陽性菌である *S. aureus* および *S. pneumoniae* に対して GFLX は LVFX および CPFX よりも迅速かつ持続的な効果を示したが、これらは *in vitro* 抗菌力や薬物動態の違いが反映された結果と考えられた。

以上、GFLX はヒトの血清中濃度を再現した *in vitro* pharmacokinetic model において各種細菌に対し強い殺菌作用を示し、臨床における本薬剤の有用性が示唆された。

文 献

- 1) Hosaka M, Yasue T, Fukuda H, et al.: In vitro and in vivo antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 36: 2108~2117, 1992
- 2) Wakabayashi E, Mitsuhashi S: In vitro antibacterial activity of AM-1155, a novel 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38: 594~601, 1994
- 3) Nakashima M, Uematsu T, Kosuge K, et al.: Single- and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 2635~2640, 1995
- 4) Grasso S, Meinardi G, Carneli I, et al.: New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 13: 570~576, 1978
- 5) 小林宏行, 志村政文: BAYo9867 (ciprofloxacin) の臨床第 I 相試験。 *Chemotherapy* 33 (S-7): 140~170, 1985
- 6) Nakashima M, Uematsu T, Kanamaru M, et al.: Phase I study of levofloxacin, (S)-(-)-ofloxacin. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 23: 515~520, 1992
- 7) 斎藤 玲, 富沢磨須美, 中山 一朗, 他: Sparfloxacin (SPFX) の基礎的, 臨床的検討。 *Chemotherapy* 39 (S-4): 203~212, 1991

- 8) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆, 他: T-3262の臨床第I相試験。Chemotherapy 36 (S-9): 158~180, 1988
- 9) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 10) 若林栄二, 保坂雅喜, 平井敬二: In vitro pharmacokinetic modelを用いたfleroxacinの殺菌作用の検討。Chemotherapy 42: 599~604, 1994
- 11) 後藤元, 後藤美江子, 岡慎一, 他: In vitro pharmacokinetic systemを用いたsparfloxacinの抗菌活性の検討。Chemotherapy 39 (S-4): 54~58, 1991

Bactericidal activity of gatifloxacin in an *in vitro* pharmacokinetic model

Masaki Hosaka and Eiji Wakabayashi

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun,

Tochigi 329-0114, Japan

The bactericidal activity of gatifloxacin (GFLX) against *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* was determined using an *in vitro* pharmacokinetic model simulating serum levels of the drug in humans after oral administration of 200 mg.

1. GFLX showed potent bactericidal activity against *S. aureus* Smith, *S. pneumoniae* Type III, and *E. coli* ML4707. *P. aeruginosa* IID1210 was also killed in the model of GFLX, but regrowth was observed 4 h after addition of the drug.

2. The bactericidal activity of GFLX in the *in vitro* pharmacokinetic model was due to its antibacterial activity and pharmacokinetic properties.

3. The bactericidal activity of GFLX against *S. aureus*, *S. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* was equal or superior to that of levofloxacin, sparfloxacin, and tosufloxacin.