

培養角結膜上皮細胞のフルオロキノロン系抗菌剤の取り込み

福田 正道¹⁾, 吉竹 佳乃²⁾, 佐々木一之¹⁾

¹⁾金沢医科大学眼科学教室, ²⁾金沢医科大学第二生化学教室

要 約

目 的: 培養ヒト結膜上皮細胞および培養家兎角膜細胞を単独で実験系に用い, 3種のフルオロキノロン系抗菌剤の取り込みを検討した。

方 法: 検討薬剤はオフロキサシン(OFLX), ロメフロキサシン(LFLX)およびノルフロキサシン(NFLX)の3剤である。培養細胞はChangヒト結膜上皮細胞と家兎培養角膜細胞の2種の樹立細胞株を使用した。薬剤の細胞内取り込み実験は単層細胞に各薬剤0.3 mM溶液を曝露し, 37°C, 5% CO₂ 下で, 1, 5, 30, 60分間インキュベートし, 細胞内に取り込まれた各薬剤濃度を高速液体クロマトグラフィ法で測定した。

結 果: 両培養細胞への薬剤の取り込みは, 各薬剤ともに薬剤添加早期から確認された。培養ヒト結膜上皮細胞における薬剤の取り込み量は, LFLXは 1.38 ± 0.21 nmol/10⁶ (平均値±標準偏差) cells (5 min), OFLXは

0.79 ± 0.05 nmol/10⁶ cells (5 min), およびNFLXでは 0.56 ± 0.03 nmol/10⁶ cells (5 min)であった。また, 家兎角膜細胞では, LFLXでは 1.08 ± 0.18 nmol/10⁶ cells (5 min), OFLXでは 0.58 ± 0.17 nmol/10⁶ cells (5 min), およびNFLXでは 0.41 ± 0.35 nmol/10⁶ cells (5 min)であった。LFLXの家兎角膜細胞における薬剤の取り込み量はOFLX, NFLXのものに比べて高かった。

結 論: 培養角結膜上皮細胞を用いる本実験系は, 薬剤の眼内動態を知る一つの指標になり得ると考える。(日眼会誌 103: 576—579, 1999)

キーワード: フルオロキノロン系抗菌剤, 家兎培養角膜細胞, 培養ヒト結膜上皮細胞, 薬剤の取り込み, 眼内薬物動態

The Uptake of Fluoroquinolone Agent Drugs by Cultured Human Conjunctival Epithelial Cells and Cultured SIRC Rabbit Corneal Cells

Masamichi Fukuda, Yoshino Yoshitake and Kazuyuki Sasaki

Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University

Abstract

Purpose: To investigate the uptake of drugs by cultured human conjunctival epithelial cells (HCEC) and cultured rabbit corneal cell lines (SIRC).

Method: The drugs examined were ofloxacin (OFLX), lomefloxacin (LFLX), and norfloxacin (NFLX). The amount of drug uptake in the cultured cells that were exposed to the drugs was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Result: The amount of LFLX, OFLX, and NFLX uptake in HCEC was 1.38 ± 0.21 nmol/10⁶ (mean ± standard deviation) cells (5 min), 0.79 ± 0.05 nmol/10⁶ cells (5 min), and 0.56 ± 0.03 nmol/10⁶ cells (5 min), respectively. The amount of LFLX, OFLX, and NFLX uptake in SIRC was 1.08 ± 0.18 nmol/10⁶ cells

(5 min), 0.58 ± 0.17 nmol/10⁶ cells (5 min), and 0.41 ± 0.35 nmol/10⁶ cells (5 min), respectively. The uptake levels of LFLX by both cultured cells were higher than those of OFLX and NFLX.

Conclusion: This method may be useful as a screening method for intraocular drug dynamics studies. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 576—579, 1999)

Key words: Fluoroquinolone, Uptake of drugs, Cultured rabbit cornea cell lines (SIRC), Cultured human conjunctival epithelial cell line (HCEC), Intraocular drug dynamics

別刷請求先: 920-0293 石川県河北郡内灘町字大学1-1 金沢医科大学眼科学教室 福田 正道
(平成10年8月17日受付, 平成11年3月26日改訂受理)

Reprint requests to: Masamichi Fukuda, PhD. Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University. 1-1 Daigaku, Uchinada-machi Kahoku-gun, Ishikawa 920-0293, Japan

(Received August 17, 1998 and accepted in revised form March 26, 1999)

I 緒 言

適切な抗菌剤による感染症治療法の確立には、抗菌剤の抗菌活性とともにその薬物動態を知ることも不可欠である。抗菌剤の臨床効果の発現には開発レベルで優れた抗菌活性をもつことが証明されているだけでなく、感染部位である標的臓器への移行も良好であることが重要である。近年、薬物動態を細胞レベルで検討することが可能となり、抗菌剤の宿主細胞内への移行性も臨床効果に影響を与えることが明らかになりつつある。これまでの眼科用抗菌剤の眼組織内への取り込みの検討は動物眼を主とする生体眼で行ってきたが^{1)~7)}、著者らはその基礎的情報を非生体眼実験系から得る試みも続けている⁸⁾。中でも外眼部組織を代表する角結膜組織については敢えて生体実験系にこだわることなく、これに代わる手法を模索している。本研究は2種の眼由来培養上皮細胞をそれぞれ単独に実験系として、3種のフルオロキノロン系抗菌剤の取り込みを検討したものである。本研究の目的は、薬物動態を細胞レベルで検討することが可能かどうかを知ることであった。

II 実験材料および方法

1. 材 料

ヒト由来 Chang 結膜上皮細胞(ATCC clo 1-51-5c-4 HCEC)および家兎由来角膜細胞(ATCC CCL 60 SIRC)の2種の樹立細胞株である。使用薬剤はオフロキサシン(OFLX)原末(分子量:361.37, 第一製薬), ロメフロキサシン(LFLX)原末(分子量:387.81, 北陸製薬)およびノルフロキサシン(NFLX)原末(分子量:319.34, 杏林製薬)で、リン酸緩衝液(PBS, PH 7.4)で3.0 mM 溶液に調整して実験に使用した。また、両上皮細胞の培養に使用した培養液は10% ウシ胎仔血清(FCS) (Biowhittaker, 米国)を含んだ Coon's modified Ham's F 12 培地(Sigma, 米国)である。

2. 培養細胞シートの作製法

両培養細胞を直径150 mm dish 中で37°C, 5% CO₂で48時間培養し、その後、0.25% トリプシン処理を行い、CF-12/10% FCS 培養液で1×10⁵ cells/ml に調整し、その細胞浮遊液2 ml を直径35 mm dish で37°C, 5% CO₂で4日間培養し、単層培養として実験に使用した。

3. 培養細胞内への薬剤の取り込み

作製した単層上皮細胞を用いて薬剤の取り込み実験を行った。まず、最初に4日間培養した培養皿から培養液を取り出し、その後、CF-12/10% FCS 培養液1,800 μl を添加し、さらに各薬剤3.0 mM 溶液200 μl を各培養皿に添加し、最終濃度0.3 mM 溶液として、1, 5, 30, 60分間、37°C, 5% CO₂で培養後、素早く各薬剤を含んだ培養液を取り除き、PBS(4°C)で3回洗浄した。その後、0.25% トリプシン(500 μl)で37°C, 10分間処理した後、蒸留水(500 μl)を

追加し、-20°C で1時間凍結保存した後、超音波処理を行った後、遠心分離(1,000 rpm, 10分)し、その上清液(5~10 μl)を試料として用いた。培養細胞内への薬剤の取り込み濃度は高速液体クロマトグラフィ(HPLC)法を用いて測定した。また、細胞数の測定に当たり、取り込み実験とは別に、培養皿に各培養細胞2×10⁵ cellsを同様の条件で培養し、培養4日後の培養皿の培養液を取り除いた後、PBS(4°C)で3回洗浄した。これを0.25% トリプシン(500 μl)で37°C, 10分間処理後、PBS(9.5 ml)を追加して全量を10 mlとし、細胞数をCoulter counter[®]で計測した。細胞数は4~5個の培養皿の平均値から求めた。培養細胞内への取り込み量は細胞10⁶ cells当たりの取り込み量(平均値±標準偏差)に換算した。また、薬剤の細胞内取り込み速度(nmol/10⁶ cells/min)は各薬剤の取り込み量と薬剤接触時間の回帰直線から求めた⁸⁾。また、得られた値の有意差の検定には Student-t 検定を用いた。

III 結 果

ヒト由来培養結膜上皮細胞への薬剤の取り込みの結果を表1, 図1に示した。

表1 家兎培養結膜上皮細胞への各キノロン剤の取り込み(平均値±標準偏差)(n=3)。

時間(分)	OFLX	LFLX	NFLX
1	0.54±0.09	0.58±0.06	0.22±0.04**
5	0.79±0.05*	1.38±0.21	0.56±0.03**
30	1.67±0.03	1.30±0.13	1.87±0.21
60	2.02±0.03	2.28±0.54	2.13±0.13

(nmol/10⁶ cells)

*: p<0.05, **: p<0.01[ロメフロキサシン(LFLX)に対するオフロキサシン(OFLX), ノルフロキサシン(NFLX)の有意差検定]

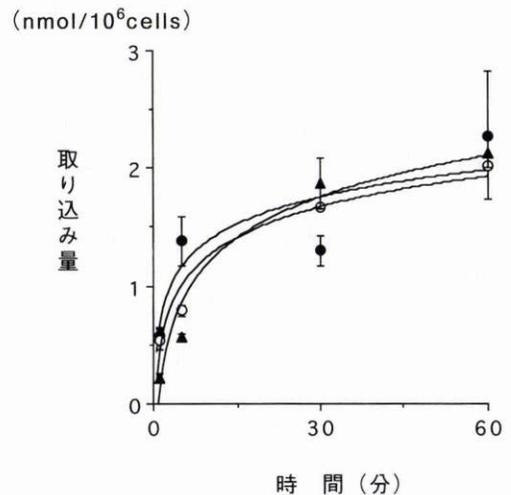


図1 培養結膜上皮細胞への各キノロン剤の取り込み(n=3)。

●: ロメフロキサシン(LFLX) ○: オフロキサシン(OFLX) ▲: ノルフロキサシン(NFLX)

表2 家兎培養角膜細胞における各キノロン剤の取り込み (平均値±標準偏差) (n=3).

時間 (分)	OFLX	LFLX	NFLX
1	0.58±0.22*	0.67±0.21	0.03±0.03**
5	0.58±0.17*	1.08±0.18	0.41±0.35**
30	1.69±0.28	2.06±0.18	1.25±0.35**
60	2.38±0.50	2.42±0.16	1.63±0.56**

(nmol/10⁶ cells)

* : p < 0.05, ** : p < 0.01 (LFLX に対する OFLX, FLX の有意差検定)

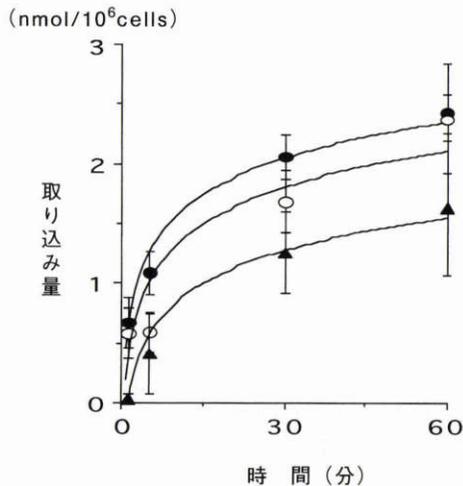


図2 家兎培養角膜細胞への各キノロン剤の取り込み (n=3).

● : LFLX ○ : OFLX ▲ : NFLX

OFLX, LFLX および NFLX の細胞内への取り込みは薬剤添加早期(1~5分)からみられ,中でも,LFLXの取り込み量は添加5分後では 1.38 ± 0.21 nmol/10⁶(平均±標準偏差)cells (n=3)であり,OFLX (0.79 ± 0.05 nmol/10⁶ cells)に比べて有意に(p<0.05)高く,またNFLX (0.56 ± 0.03 nmol/10⁶ cells)に比べても有意に(p<0.01)高い値がみられたが,薬剤接触60分後ではOFLXは 2.02 ± 0.03 nmol/10⁶ cells, LFLXでは 2.28 ± 0.54 nmol/10⁶ cells, NFLXでは 2.13 ± 0.13 nmol/10⁶ cellsであり,3剤間には有意差はみられなかった。

家兎由来培養角膜細胞における各キノロン剤の取り込み量を表2,図2に示した。

OFLXは培養細胞に添加1分後で 0.58 ± 0.22 nmol/10⁶ cells,5分後で 0.58 ± 0.17 nmol/10⁶ cells,30分後で 1.69 ± 0.28 nmol/10⁶ cells,60分後で 2.38 ± 0.50 nmol/10⁶ cellsであった。LFLXでは添加1分後で 0.67 ± 0.21 nmol/10⁶ cells,5分後で 1.08 ± 0.18 nmol/10⁶ cells,30分後で 2.06 ± 0.18 nmol/10⁶ cells,60分後で 2.42 ± 0.16 nmol/10⁶ cellsであった。NFLXは培養細胞に添加1分後で 0.03 ± 0.03 nmol/10⁶ cells,5分後で 0.41 ± 0.35 nmol/10⁶ cells,30分後で 1.25 ± 0.35 nmol/10⁶ cells,60

表3 家兎培養角膜細胞における各キノロン剤の取り込み速度と生体眼(AQCmax)および薬剤分配系数との相関性。

薬剤	分配係数 (logP)	取り込み速度 (nmol/min.)	点眼(AQCmax) (μg/ml)
NFLX	-1.16	0.1	0.21
OFLX	-0.67	0.11	1.16
LFLX	-0.85	0.12	1.26

薬剤分配系数および生体眼値は文献8)および9)から引用

分後で 1.63 ± 0.56 nmol/10⁶ cellsであった。LFLXの取り込み量は1~60分時点の全時点でNFLXに対して有意差(p<0.01)がみられた。OFLXとの間では1,5分時点で有意差(p<0.05)がみられた。また,3種のフルオロキノロン剤の角膜内取り込み速度はLFLX (0.12 nmol/min)は最も速く,次にOFLX (0.11nmol/min),NFLX (0.10 nmol/min)の順であった(表3)。

IV 考 按

薬剤の臨床応用に当たっては抗菌力・抗菌スペクトルに関する知識のみならず,薬剤の吸収・分布・排泄・組織移行性など体内動態についての知識も必要である。このことは近年,臨床薬理の発展とともに特に強調されている。本研究で検討したフルオロキノロン剤は広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を持ち,代謝安定・良好な組織移行性を共通の特徴としているが,同系のキノロン剤でも各薬剤の物理化学的性質が異なっているため,薬剤間に薬物動態の差がみられる。

眼科領域においても,種々の合成抗菌剤が眼感染症の治療および予防の目的に,全身的,局所的に使用されている。著者らはこれまでに種々抗菌剤の眼組織内移行動態を把握する目的で家兎生体眼,非生体眼で検討してきた¹¹⁻⁸⁾。点眼により投与された合成抗菌剤の房水中移行濃度は薬物の角膜透過性と明らかに相関性があること⁹⁾,また,角膜透過モデル装置を用いると,点眼された薬物の房水内移行動態を予測することが可能なことも提唱してきた⁸⁾。本研究では,外眼部組織を代表する角結膜組織の薬剤の取り込み情報を培養細胞系を用いて細胞レベルで検討したものである。

ヒト由来結膜上皮細胞から得られた成績を図1,表1に示したが,薬剤接触早期(1,5分後)では明らかにLFLXとNFLXの間の取り込み量には有意差がみられたが,時間の経過とともに取り込み量の差が小さくなる傾向がみられた。この現象は,薬剤が細胞内で飽和状態に近づいたために生じたものと考えられる。したがって,各々の薬剤の取り込みの特徴を把握する場合は測定開始早期の時点で判定することが望ましいと考える。一方,家兎由来角膜上皮細胞では各時点でLFLX>OFLX>NFLXの順に取り込み量が有意に高く,明らかに薬剤間での違いが

みられた。

この結果は何が原因で生じたかはまだ明らかではないが、原因の一つに薬剤の物理化学的な特徴が考えられる。本実験では培養液に 10% FCS を加えた状態で実験を行ったが、検討した 3 種キノロン剤の蛋白結合率はおおよそ 30% 以下であるため、薬剤の取り込みへの影響は低いものと考えている。一方、Schoenwald¹⁰⁾は分配係数の異なる種々の薬剤 lipophilic (LogP: 1.62-2.53), slightly lipophilic (LogP: 0.34-0.72), hydrophilic (LogP: 0.20- <-2.0) の角膜バリアー機能について検討し、脂溶性薬物ではバリアー機能は上皮にはみられないが、水溶性薬物では逆に上皮のバリアー機能が中心であると報告している。今回検討したフルオロキノロン系抗菌剤の分配係数 LogP は、OFLX (-0.67), LFLX (-0.85), NFLX (-1.16) であり、水溶性薬物に分類されることから、上皮のバリアー機能が薬剤組織内透過に大きく関与していると考ええる。

キノロン剤の組織内、細胞内への移行に関する機序には、薬物の脂溶性、解離定数、分子量、蛋白結合率が関与する受動輸送と能動輸送がある。また、キノロン剤は適度な脂溶性によって、細胞内移行がよいともされている¹¹⁾。今回検討した 3 種キノロン剤も、その疎水性という物理化学的性状の違いも薬剤取り込み量に影響しているものと考ええる。分配係数の小さい NFLX の SIRC 角膜細胞への取り込み量は、分配係数の大きい LFLX, OFLX の取り込み量に比べて明らかに低値であった。この結果は、*in vivo* の実験による点眼された 3 種薬剤の房水内移行濃度 (AQCmax)⁹⁾ は、LFLX > OFLX > NFLX の順であることと一致している⁸⁾。この意味でも本培養細胞による薬剤の取り込みの検討は、生体眼での薬剤の移行性を反映しているものと考え(表 3)。本実験系は、点眼抗菌剤の眼内移行動態を把握するための第一次的な基礎検討手段になり得るものと考ええる。

文 献

- 1) Fukuda M, Sasaki K: Intraocular dynamic mode differences of new quinolone antibacterial agents between pigmented and albino rabbit eyes. *Lens Eye Toxic Res* 6: 339-351, 1989.
- 2) 福田正道, 佐々木一之: Ofloxacin 点眼液の眼組織内移行動態の検討. *眼紀* 37: 823-828, 1986.
- 3) Fukuda M, Sasaki K, Tsuzuki H, Takahashi N: Intraocular dynamics of β -lactam (CMX) in combination with aminoglycoside. *Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto*, 1985.
- 4) 福田正道, 村野秀和, 佐々木一之: キノロン系抗菌剤の涙液内移行—同一薬剤の家兎およびヒト涙液内移行の比較—. *日眼会誌* 98: 721-726, 1994.
- 5) 周 静聖, 福田正道, 佐々木一之: 全身投与されたフルオロキノロン系薬剤 T-3761 の有色家兎眼組織内への移行動態. *あたらしい眼科* 12: 1455-1458, 1995.
- 6) 福田正道, 景 宇光, 佐々木一之: エステル型経口セフェム系抗生剤 S-1108 の眼組織内移行動態. *あたらしい眼科* 10: 141-144, 1993.
- 7) 福田正道, 周 静聖, 佐々木一之: SY-5555 の家兎眼組織移行動態の検討. *あたらしい眼科* 10: 2137-2141, 1993.
- 8) 福田正道, 佐々木一之: 非生体眼実験系によるフルオロキノロン系抗菌剤の眼内移行動態に関する基礎的情報把握の試み. *日眼会誌* 99: 532-536, 1995.
- 9) 佐々木一之, 三井幸彦, 福田正道, 大石正夫, 大橋裕一: 点眼用抗菌剤の眼内薬動力学的パラメーターとしての AQCmax の測定. *あたらしい眼科* 12: 787-790, 1995.
- 10) Schoenwald RD: Ocular drug delivery. *Pharmacokinetic considerations*. *Clin Pharmacokinet* 18: 255-269, 1990.
- 11) 松本純一: ニューキノロンあすの抗菌剤をめざして. 三橋 進(編): 学会出版センター, 東京, 67-74, 1991.