

博士論文

術後眼内炎に対する抗菌点眼剤の
効果的予防用法推定のための新規評価法の確立
及び PK-PD 解析に関する研究

平成 25 年 3 月

香西 聖子

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程 創薬生命科学専攻

目次

要約.....	1
総論の部	
緒言.....	4
第 1 章 ウサギ腸球菌術後眼内炎モデルを用いた検討.....	7
1.1 投与開始時間の検討.....	7
1.1.1 眼内炎症に対する効果.....	8
1.1.2 生菌数に対する効果（接種 96 時間後）.....	9
1.2 投与回数の検討.....	11
1.2.1 投与後 24 時間における効果への影響.....	11
1.2.2 投与後 4 日間（96 時間）における効果への影響.....	14
1.3 考察.....	17
第 2 章 <i>In vitro</i> Aqueous Humor Pharmacokinetic (AHPK) model の構築.....	19
2.1 点眼投与後の眼房水中濃度測定.....	19
2.2 容量及び速度の設定.....	21
2.3 理論濃度推移の算出.....	25
2.4 培地の選択.....	26
2.5 モデルの作製.....	27
2.6 考察.....	33
第 3 章 <i>In vitro</i> AHPK model を用いた評価.....	34
3.1 <i>E. faecalis</i> に対する検討.....	34
3.1.1 薬剤非添加時の増殖曲線.....	34
3.1.2 単回又は各種投与間隔で 3 回添加時の殺菌増殖曲線.....	35
3.1.3 投与間隔と抗菌効果の関係.....	38
3.1.4 C_{max}/MIC 及び $T>MIC$ と抗菌効果の関係.....	39
3.1.5 新規 PK-PD パラメータの算出.....	43
3.2 <i>S. aureus</i> に対する検討.....	47
3.2.1 薬剤非添加時の増殖曲線.....	47
3.2.2 各種投与間隔で 3 回添加時の殺菌増殖曲線.....	48
3.2.3 投与間隔と抗菌効果の関係.....	52
3.2.4 C_{max}/MIC 及び $T>MIC$ と抗菌効果の関係.....	53
3.2.5 $iT>MIC$ 及び $T<MIC$ と抗菌効果の関係.....	55
3.3 考察.....	57
結論.....	62

謝辞.....	63
実験の部	
第 1 章 実験の部.....	64
第 2 章 実験の部.....	66
第 3 章 実験の部.....	69
引用文献.....	72

要約

近年、抗菌薬の適正使用のために Pharmacokinetics-Pharmacodynamics (PK-PD) 理論に基づいた用法・用量の設計が推進されているが、これらのほとんどは経口投与後の血漿中濃度推移に基づいた解析から導かれている。そのため、点眼投与された眼組織中濃度において、同様の理論が適用できるか否かは明らかではない。また、理論が適用可能であっても、様々な問題から点眼剤の用法・用量の変更は困難である。そこで、点眼剤の用法を改善するために、投与間隔に着目し検討を行うと共に、眼組織における薬効の推定を可能とする PK-PD パラメータの構築を試みた。対象疾患としては、白内障術後眼内炎を選択し、予防に最適な用法の確立を目指した。

まず、*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* : 眼科臨床分離株) を用いてウサギ腸球菌眼内炎モデルを作製し、ガチフロキサシン点眼液の投与開始時間及び投与回数が効果に及ぼす影響を評価した。投与は 0.3%ガチフロキサシン点眼液を 1 眼当たり 1 回 50 μ L とした。ガチフロキサシン点眼投与群では、接種 24 時間後から 3 回点眼投与群を除く全ての群で、非点眼投与群と比較して有意な炎症症状の抑制効果が確認された。一方、前房及び硝子体内生菌数は、いずれのガチフロキサシン点眼投与群においても減少傾向が確認でき、投与開始時間が早いほど検出される生菌数が少ないことが示された。これらのことから、接種から投与開始までの時間が短いほど、眼内の炎症及び細菌増殖を効果的に抑制できることが示された。さらに、接種直後より 3 回点眼投与することにより、接種直後の単回点眼投与群よりも高い効果を示すことが確認でき、前房内汚染に対するガチフロキサシン点眼液の抗菌効果は、眼房水中ガチフロキサシン濃度の AUC/MIC により影響を受けるものと推察された。

そこで次に、より高い治療効果につながる点眼投与法の構築を目的に、投与回数を固定した際の、投与間隔が抗菌効果に及ぼす影響及びその効果に関与する AUC/MIC 以外の PK-PD パラメータの検討を行うこととした。まず、ウサギに 0.3%ガチフロキサシン点眼液を 50 μ L 単回点眼投与した後の眼房水中濃度推移を測定し、その濃度推移を *in vitro* にて模擬するモデル (*in vitro* aqueous humor pharmacokinetic model、以下 *in vitro* AHPK model) の構築を試みた。モデルは、薬剤を希釈するセルと眼房水中濃度を再現しながら細菌を培養するセルを無菌的に連結し、ポンプで新鮮な培地を一定の速度で送液することにより、薬剤の眼房水中濃度推移の再現を目指した。その結果、理論通りに眼房水中濃度推移を再現できることが明らかとなり、3 回反復点眼投与後の眼房水中濃度推移の再現も可能であることが確認できた。

この *in vitro* AHPK model を用いて、*E. faecalis* に対するガチフロキサシンの抗菌効果に及ぼ

す点眼投与間隔の影響を検討した。*E. faecalis* を接種後、ガチフロキサシンを単回又は 0-8 時間間隔で 3 回投与し、接種 24 時間後までの殺菌増殖曲線を作成した。さらに、ガチフロキサシン投与群及び非投与群の増殖曲線間面積 (ABBC; area between control growth curve and bacterial killing and re-growth curve) を効果の指標として算出した。

AUC/MIC が等しい 3 回投与の各条件において、ABBC は、投与間隔 0-3 時間では投与間隔の延長に伴って増加したが、4 時間以上の投与間隔では減少する傾向を示し、釣鐘型の投与間隔時間推移を示すことが明らかとなった。この投与間隔と ABBC の関係について、一元配置分散分析を行った結果、投与間隔が抗菌効果に有意な影響を及ぼしていることが示された。即ち、AUC/MIC は等しいにもかかわらず、投与間隔が変化することにより、抗菌効果が異なることが明らかとなった。ABBC は C_{max}/MIC と負の相関を示したため、 $T > MIC$ に着目した。 $T > MIC$ と ABBC の間には正の相関が認められたものの、投与間隔が 3 時間以上の場合には、 $T > MIC$ は増加する一方で、ABBC は明らかな減少傾向を示した。そこで次に、 $T > MIC$ の連続性に着目した。投与間隔 2 時間までは $T > MIC$ が連続しているのに対し、それ以上の投与間隔では $T > MIC$ が不連続となる。そこで、 $T > MIC$ が連続している投与間隔 0-2 時間の $T > MIC$ と ABBC の関係を解析したところ、両者には有意な正の相関が確認できた。そこで、これらの知見をパラメータ化し、ABBC の投与間隔による変化の解析を試みることにした。即ち、全ての投与間隔において、最初に濃度が MIC を上回ってから最後に MIC を下回るまでの時間を intermitted $T > MIC$ ($iT > MIC$)、この $iT > MIC$ の時間内において、眼房水中薬物濃度が MIC を下回る時間の総計として $T < MIC$ を定義した。次いで、 $iT > MIC$ と ABBC の関係をみたところ、投与間隔時間と ABBC の関係と同様に、釣鐘型を示すことが明らかとなった。 $T > MIC$ が連続している投与間隔 0-2 時間においては、ABBC と $iT > MIC$ ($= T > MIC$) に正の相関が認められるため、これらの回帰直線から投与間隔 3-8 時間投与群の ABBC を外挿した。外挿値は実測値を大きく上回る値となり、その差を $\Delta ABBC$ としたところ、 $\Delta ABBC$ と $T < MIC$ には有意な正の相関関係が確認された。そこで、ABBC と投与間隔との関係について、ABBC を目的変数、 $iT > MIC$ と $T < MIC$ を説明変数として、重回帰分析を行った。その結果、ABBC の変化は、これら 2 つのパラメータを説明変数とすることで有意に説明できること、また $iT > MIC$ 、 $T < MIC$ とも、統計学的に有意な説明変数であることが明らかとなった。このことから、眼内炎の予防、即ち、前房内汚染に対して最適な点眼投与間隔を定めるための指標として $iT > MIC$ と $T < MIC$ の両パラメータの有用性が示された。

次に、*E. faecalis* について行った解析法が他の菌種にも適用できるか否かを *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) を用いて検討を行った。ガチフロキサシンの点眼投与間隔は 0.25-8 時間と

し、*E. faecalis* の場合と同様に、*in vitro* AHPK model により、抗菌効果に及ぼす投与間隔の影響を検討した。その結果、ABBC は、投与間隔 4 時間をピークとして、釣鐘型を示し、その変化は、*E. faecalis* の場合と同様に、 $iT > MIC$ と $T < MIC$ を説明変数とすることにより、統計学的に有意に説明できることが明らかとなった。

以上、新たに構築した *in vitro* AHPK model を用いることで、前房内汚染に対するガチフロキサシン点眼液の点眼投与において、AUC/MIC が固定された条件においては、投与間隔が効果に大きな影響を与えることを明らかにした。また、一般にキノロン系抗菌薬の抗菌効果は AUC/MIC 及び C_{max}/MIC に依存すると考えられているが、点眼投与後の眼房水における殺菌効果の推定には、新たに定義した $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ が新規パラメータとして有用であることを異なる 2 種の菌種において証明することができた。本研究で得られた結果は、投与条件が制限される点眼による感染症治療の最適化に、有用な情報を提供するものと考えられる。

総論の部

緒言

近年、抗菌薬の適正使用のために Pharmacokinetics-Pharmacodynamics (PK-PD) 理論に基づいた用法・用量の設計が推進されている。多くの研究により、抗菌薬はその作用様式より濃度依存的又は時間依存的に効果を示すものに大別され、それぞれ効果に関連する PK-PD パラメータが異なることが明らかとなっている。PK-PD パラメータとは、組織における薬物濃度より算出される薬物動態学的 (PK) パラメータと対象となる細菌に対する薬物の薬力学的 (PD) パラメータを組み合わせた効果の指標であり、PK パラメータとして、薬物総曝露量 (AUC) 及び最高薬物濃度 (C_{max})、PD パラメータとして、最小発育阻止濃度 (MIC) 及び最小殺菌濃度 (MBC) がそれぞれ定義されている。これらの組み合わせにより、PK-PD パラメータは、AUC 又は C_{max} の MIC に対する比 (AUC/MIC 、 C_{max}/MIC) 及び薬物濃度が MIC 以上を維持する時間 ($T > MIC$) の 3 種が主要なパラメータとして使用されている (Figure 1)。同じ投与量を投与する場合においても、この PK-PD パラメータを変化させることによって、効果を最大限に発揮させ、さらに耐性菌を出現させない用法・用量を設定することが可能と考えられている¹⁾。

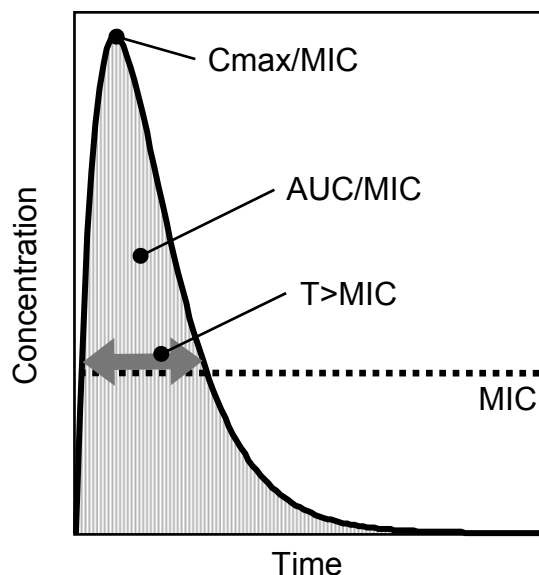


Figure 1 PK-PD parameters

MIC, minimum inhibitory concentration; AUC, area under the concentration-time curve; C_{max} , maximum concentration; $T > MIC$, time when the concentration exceeds the MIC

例えば、時間依存的に効果を示す β ラクタム系抗菌剤やグリコペプチド系抗菌剤においては、 C_{max} を上昇させることは効果の増加にはつながらないため、効果に影響を与える $T > MIC$ を延長させるために、多くの回数に分割して投与することが推奨されている¹⁾。一方、濃度依存的に効果を示すアミノグリコシド系抗菌剤やキノロン系抗菌剤においては、 $T > MIC$ の延長よりも AUC/MIC 及び C_{max}/MIC の上昇が効果の増加に関連するため^{1,2)}、高用量の 1 日 1 回投与が推奨されている。実際に、レボフロキサシンの経口投与において、この理論に基づいて 100 mg/回の 1 日 3 回投与から、500 mg/回の 1 日 1 回投与へ用法・用量の変更が行われ、この変更により、耐性化率が減少し、高い効果が得られたことが報告されている^{3,4)}。しかし、これら PK-PD 理論のほとんどは経口投与後の血漿中濃度推移に基づいた解析から導かれている。一方、点眼投与のように薬物の吸収が全身循環を介さない場合、血漿中濃度は効果の指標とはならない。さらに、眼は多くの組織から構成されており、各組織によって点眼投与後の濃度推移は様々である (Figure 2)。それらの作用部位における濃度推移は経口投与後の血漿中濃度推移とは大きく異なるため、同様の理論が適用できるかは明らかでない。また、点眼剤の場合、溶解度や粘膜刺激性の問題から、薬物の点眼液濃度の上限が制限される。さらに、一回の投与液量を増加させても結膜嚢の容積及び表面積の制限に加えて、薬液が速やかに眼外に排出されることから、眼組織中薬物濃度はほとんど変化しない^{5,6)}。そのため、経口剤においては比較的容易である用量・用法の変更が、このような特性を持つ点眼剤においては困難であると考えられる。そこで、*in vivo* 及び *in vitro* モデルを用いて点眼剤の用法の改善を試みることにした。

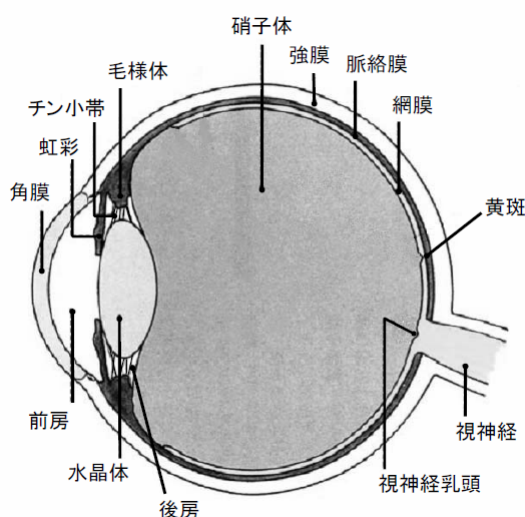


Figure 2 Anatomy of the eye

対象疾患として、白内障術後眼内炎を選択した。この疾患は、発症率が 0.04% から 0.36% と

低い、発症すると失明に至ることがある⁷⁻¹⁴⁾。特に *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) や *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) は、急激に視力を低下させ、眼内炎発症後の視力予後が悪いことが知られている¹²⁻¹⁶⁾。白内障術後眼内炎の治療法として、硝子体内への抗菌剤の注入や、緊急の硝子体手術が行われているが、これらの治療内容と最終視力の相関は認められていないことから¹⁷⁾、眼内炎を予防することが最も重要であると考えられる。白内障術後眼内炎は、主に細菌が眼房水中に混入することにより発症すると考えられており¹⁸⁾、現在はこの手術合併症の予防用法として、術前の消毒に加えて術直後より抗菌点眼剤を1日3-5回、1回1滴投与されているが、用法・用量の最適化は行われていない。そこで、限られた用法・用量において最大の効果を示す投与方法、つまり予防に最適な用法の確立を目指した。*In vivo* モデルにおいては、投与開始のタイミング及び投与回数、*in vitro* モデルでは投与間隔に着目して検討を行った。さらに、眼組織における薬効の推定を可能とする PK-PD パラメータの構築を試みた。

眼感染症領域においては、抗菌スペクトルの広さ、良好な組織移行性及び安全性からキノロン系抗菌剤が頻用されている。キノロン系抗菌剤は、DNA gyrase や Topoisomerase IV の活性を阻害することにより殺菌的に作用し、その作用は濃度依存的であること、また、殺菌的に作用することから、上述の PD パラメータである MIC と MBC は、ほぼ等しいことも知られている。本研究においては、このキノロン系抗菌剤のうち、特にキノロン環の 8 位にメトキシ基が導入されたことにより、より強い抗菌作用と高い安全性が確認されているガチフロキサシン¹⁹⁾を選択した。

以下、三章にわたり得られた知見を論述する。

第 1 章 ウサギ腸球菌術後眼内炎モデルを用いた検討

重篤な眼内炎を引き起こすことが知られている *E. faecalis* を起因菌としたウサギ腸球菌眼内炎モデルを用いて、細菌性眼内炎を予防する上で効果的な術後のガチフロキサシン点眼液の使用方法について、投与開始時間及び投与回数を検討することとした。本モデルは、感染初期に一過性の結膜充血、虹彩充血とそれに続く前房混濁が主として認められ、角膜の混濁、さらには硝子体混濁も観察されることから、臨床を模した細菌性眼内炎モデルとされている²⁰⁾。術後眼内炎の起因菌は、患者の外眼部に存在する常在菌がほとんどであり、これらが術後に眼内へ侵入することにより、発症すると考えられていることから^{18,21,22)}、評価に用いる菌株には、感染症由来ではなく、正常ヒト結膜より採取された株を用いた。

1.1 投与開始時間の検討

ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいて、0.3%ガチフロキサシン点眼液を1眼当たり1回50 μ Lとして、*E. faecalis* を前房内に接種直後より1回又は3回、あるいは接種6時間後より3回点眼投与した (Figure 3)。さらに、接種当日のみ無処置 (つまり、接種24時間後より点眼) 群も設定した。いずれの群も、接種24時間後からは、接種96時間後まで1日3回点眼投与した。また、対象群として、4日間とも何も処置しない無処置群を設定した。接種24時間後の前房内のフィブリン析出及び蓄膿等の前房混濁を細隙灯顕微鏡を用いて経時的に観察し、Figure 4 に示す採点基準に沿って眼内の炎症症状を採点した。次いで、接種96時間後の前房内容及び硝子体内容の生菌数を測定した。

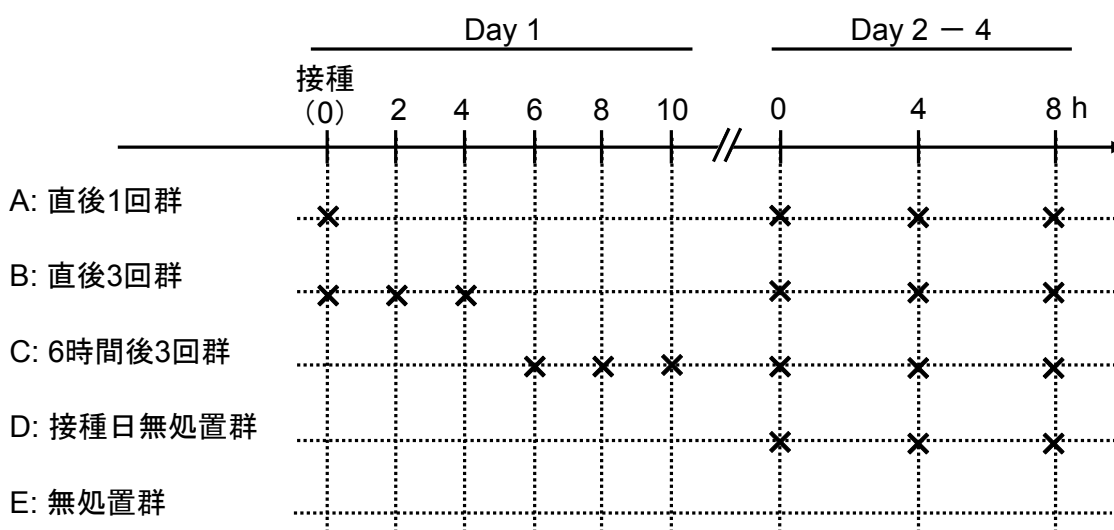


Figure 3 Experiment design

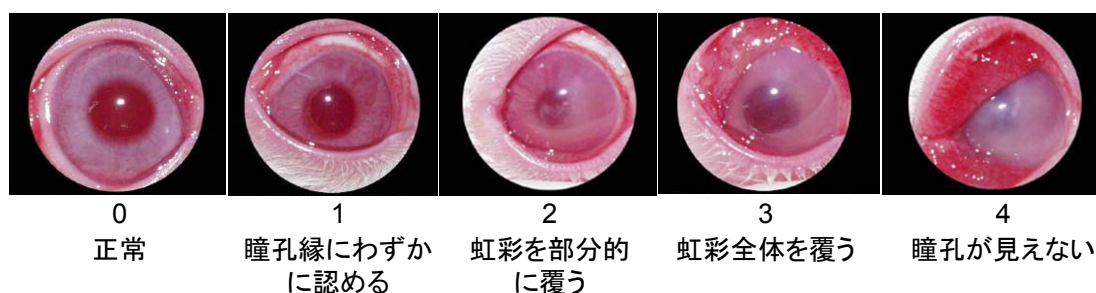


Figure 4 Criteria of anterior chamber inflammation (Inflammation score)

1.1.1 炎症に対する効果

接種 6 時間後では全ての群において、前房内にわずかなフィブリンが観察されたものの、スコアは 1 以下であり、ほとんど炎症症状は認められなかった (Figure 5)。無処置群では、接種 24 時間後で平均スコアが 2 を越え、その後 2 以上を維持した。全例に前房のフィブリン及び蓄膿が認められ、明らかな眼内炎の発症が確認できた。ガチフロサキシン点眼液の直後 1 回点眼群では、24 時間でスコアの上昇が抑制される傾向が認められ、その後、経時的にスコアは減少し、48 時間後以降では、無処置群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。直後 3 回点眼群では、24 時間で炎症スコアが 6 時間と同程度に抑えられており、ほとんどの個体で 96 時間までスコアは 1 以下であった ($p < 0.05$)。6 時間後 3 回点眼群においては、直後 1 回点眼群と同様の推移を示し、接種後 48 時間以降では無処置群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。一方、接種日無処置群では、無処置群と比較して炎症スコアが僅かに低値を示したのみであった。このことから、一度悪化した眼内炎症を抑制することは、困難であることが示された。

1.2 投与回数検討

1.2.1 投与後 24 時間における効果への影響

1.1 の検討において、投与開始時間が早く、投与回数が多いほど、炎症症状及び生菌数に対する抑制効果が高いことが示された。しかし、1.1 では、接種日の投与回数は異なるものの、接種 2 日目移行の投与回数を 1 日 3 回と揃えていた。そこで、投与回数の影響をより詳細に検討するために、接種日のみに 0.3% ガチフロキサシン点眼液を 1 眼当たり 1 回 50 μ L とし、単回あるいは 2 時間間隔で 3 回点眼投与したときの、接種 24 時間後における炎症スコア及び生菌数を評価した (Figure 8)。対照群として、無処置群を設定した。

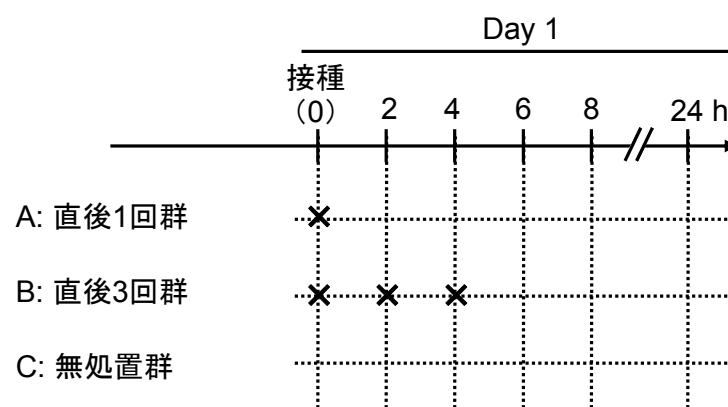


Figure 8 Experiment design

1.2.1.1 炎症に対する効果（接種 24 時間後）

無処置群では、全例で明らかな眼内炎の発症が認められた。接種 24 時間後において、いずれの投与回数においても、無処置群と比較して有意に炎症スコアが低下したが、3 回点眼群の方が 1 回点眼群よりも低かった (Figure 9)。

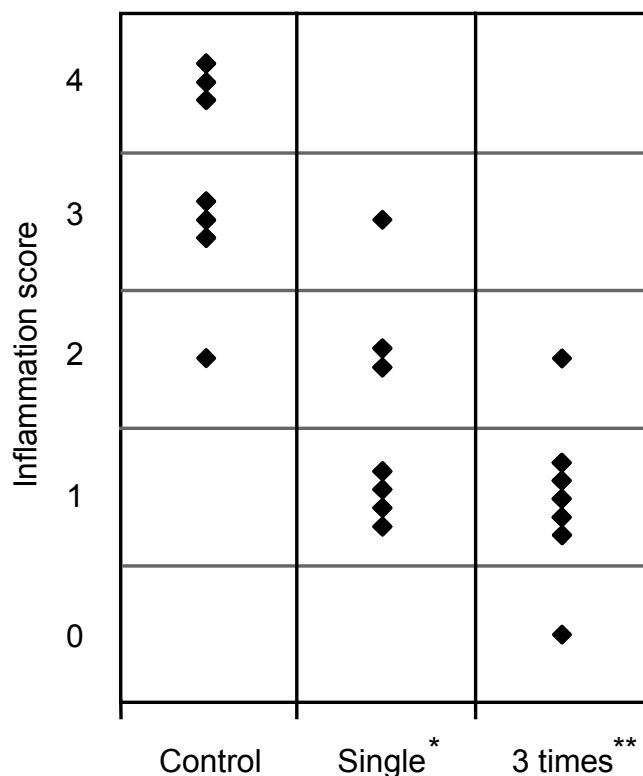


Figure 9 Anterior chamber inflammation at 24 h postinoculation.

The data represent the individual values.

^{**}, $p < 0.01$; ^{*}, $p < 0.05$, compared with control (Steel's test, 1-sided).

1.2.1.2 生菌数に対する効果（接種 24 時間後）

接種 24 時間後の無処置群における前房内容及び硝子体内容には、いずれも *E.faecalis* が検出された (Figures 10 and 11)。0.3%ガチフロキサシン点眼液 1 回点眼群及び 3 回点眼群における前房内容中の生菌数は 1 回点眼群、3 回点眼群のいずれも、無処置群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$ 及び $p < 0.01$)。一方、硝子体内容の生菌数においては、3 回点眼群でのみ無処置群と比較して有意に低値であった ($p < 0.05$)。前房内容及び硝子体内容のいずれにおいても、3 回点眼群の方が 1 回点眼群よりも *E. faecalis* の検出確率及び生菌数が低い傾向にあった。

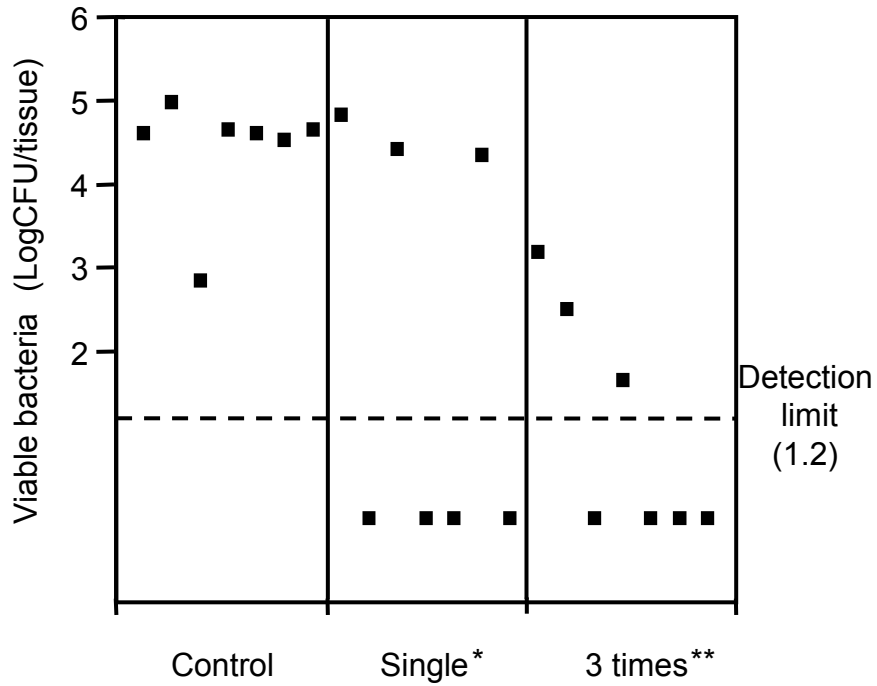


Figure 10 Viable bacteria in anterior chamber at 24 h postinoculation

The data represent the individual values.

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, compared with control (Steel's test, 1-sided).

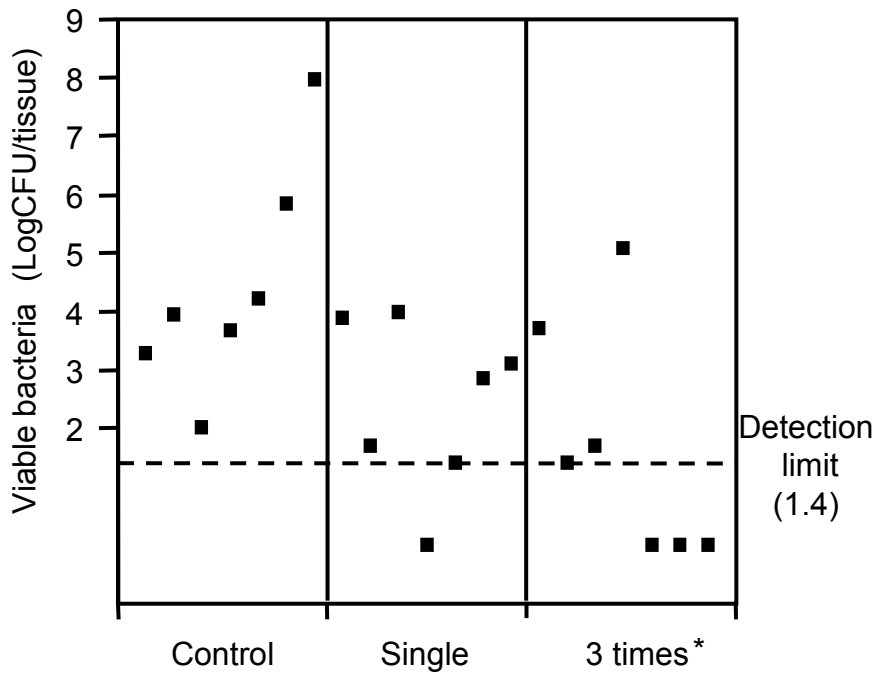


Figure 11 Viable bacteria in vitreous humor at 24 h postinoculation

The data represent the individual values.

* $p < 0.05$, compared with control (Steel's test, 1-sided).

1.2.2 投与後 4 日間（96 時間）における効果への影響

次に、接種当日投与の有用性を検討するために、接種日のみに 0.3%ガチフロキサシン点眼液を 1 眼当たり 1 回 50 μ L とし、単回点眼あるいは 2 時間間隔で 3 回点眼投与したときの、炎症症状の経時的な変化及び接種 96 時間後の生菌数を評価した (Figure 12)。対照群として、無処置群を設定した。

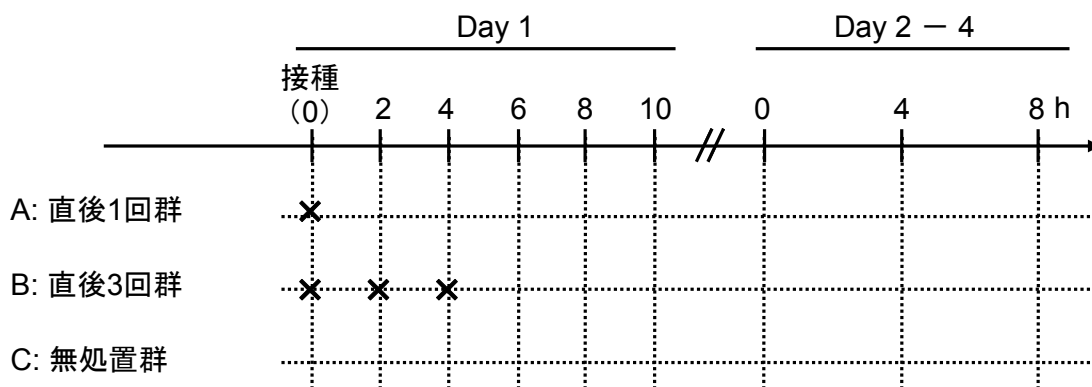


Figure 12 Experiment design

1.2.2.1 炎症に対する効果（接種 96 時間後）

無処置群では、1.1 と同様の炎症スコアの推移を示し、全例で明らかな眼内炎の発症が認められた (Figure 13)。1 回点眼群では、24 時間において無処置群と比較して有意な炎症スコアの抑制効果がみられたものの ($p < 0.05$)、その後、わずかにスコアは上昇し、抑制傾向がみられたのみであった。1.1 では、48 時間以降も十分な抑制が確認されていたことから、接種 2 日目以降からの 1 日 3 回投与の影響が大きく、接種日の単回投与のみでは、不十分であることが示唆された。一方、3 回点眼群では、接種 24 時間以降の全ての時点において無処置群と比較して有意な炎症スコアの抑制効果が確認された ($p < 0.05$)。このことから、接種日に十分な投与を行っておくことで、炎症症状の悪化が抑制できることが示された。

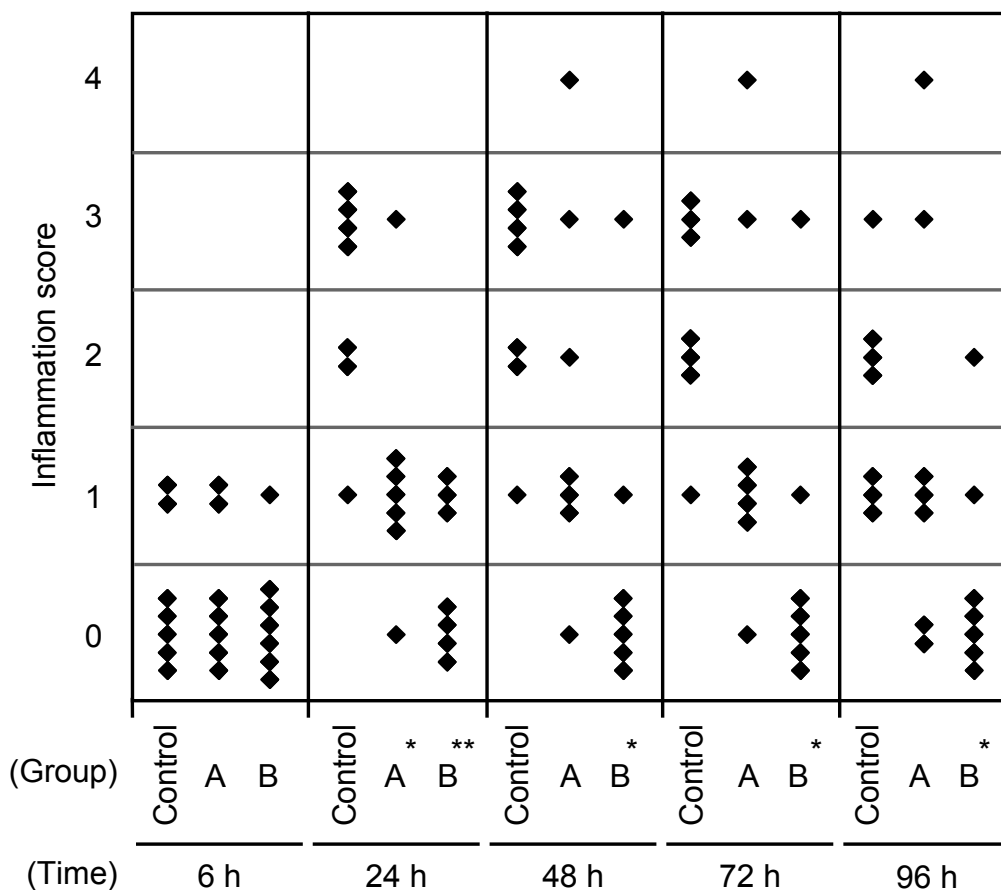


Figure 13 Progress of anterior chamber inflammation over time

The data represent the individual value. Group A, single; B, 3 times.

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, compared with control (Steel's test, 1-sided).

1.2.2.2 生菌数に対する効果（接種 96 時間後）

無処置群における接種 96 時間の前房内容では 7 例中 5 例、硝子体内容においては 7 例中 4 例で *E. faecalis* が検出された (Figures 14 and 15)。前房内容においては、単回点眼群で 7 例中 3 個体、3 回点眼群では 7 例中 1 個体のみに *E. faecalis* が検出され、3 回点眼群においては、無処置群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。硝子体内容においては、単回点眼群、3 回点眼群のいずれも *E. faecalis* が検出された個体は 1 例のみであり、生菌数はいずれも 0.20 Log CFU/tissue であった。これらのことから、接種当日に 3 回点眼投与することで、その後 3 日間の細菌の増殖、すなわち、眼内炎発症リスクを抑制できることが示され、接種当日投与の重要性が確認できた。

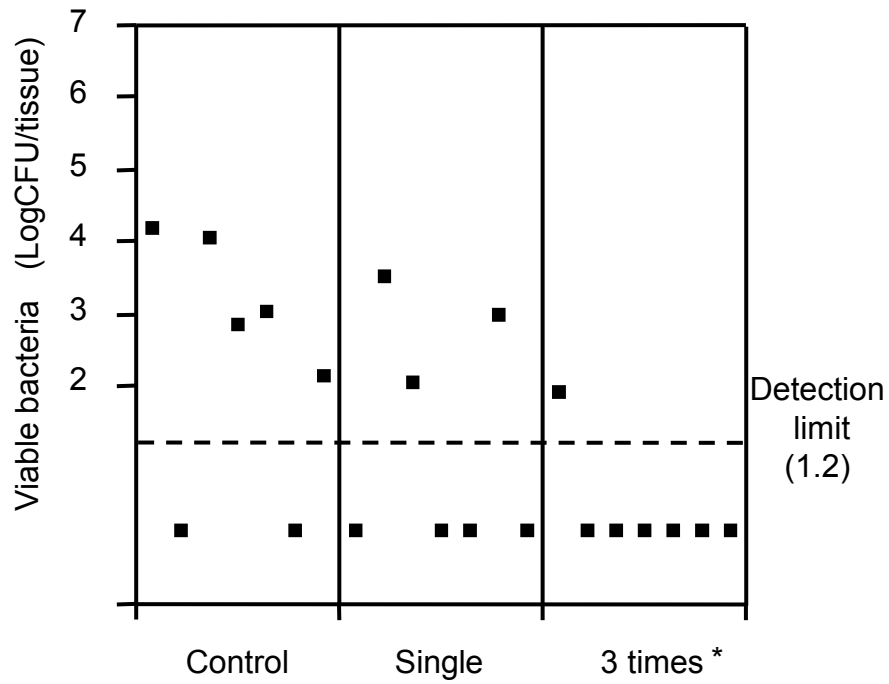


Figure 14 Viable bacteria in anterior chamber at 96 h postinoculation
 The data represent the individual values.
 *, $p < 0.05$, compared with control (Steel's test, 1-sided).

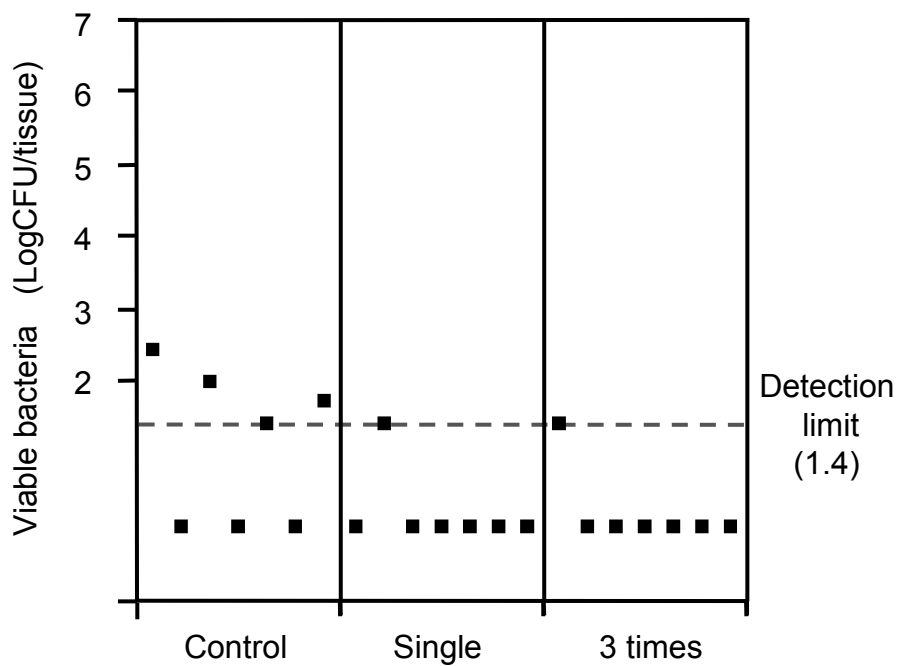


Figure 15 Viable bacteria in vitreous humor at 96 h postinoculation
 The data represent the individual values.

1.3 考察

ウサギ腸球菌眼内炎モデルを用いて、0.3%ガチフロキサシン点眼液の投与開始時間及び投与回数が、眼内炎症並びに前房内容及び硝子体内容の生菌数に与える影響を評価し、投与開始時間は、より早い方が眼内炎症及び細菌の増殖抑制効果が高いこと、投与回数は1回よりも3回の方が有効であることが示された。

接種日無処置の場合、つまり接種24時間後からガチフロキサシン点眼液を3回点眼投与した場合、接種96時間後の前房内容及び硝子体内容における生菌数の減少傾向は認められたが (Figures 6 and 7)、炎症症状の抑制効果はほとんど認められなかった (Figure 5)。細菌は宿主の免疫反応を誘導し、過剰な炎症反応は細菌が減少した後も宿主の組織を破壊することが報告されている²³⁾。つまり、ガチフロキサシンは、眼内の生菌数が増加した後でも抗菌効果は発揮するものの、一度発症した炎症症状を減少させることは困難であることが示唆された。抗炎症薬が、細菌性眼内炎の炎症症状を抑制することが報告されており^{24,25)}、抗菌薬とともに抗炎症薬を併用することも考えられるが、感染症予防の段階で、生体の免疫反応を抑制することに関しては、慎重を期す必要があるだろう。本検討において、投与初日のみに投与した場合でも、投与初日のみならず、接種96時間後まで炎症症状の抑制及び生菌数の減少効果が確認できていることから (Figures 13–15)、抗菌薬のみでも早期に投与しておくことで、眼内炎症を抑制することは可能であり、抗菌点眼剤の早期投与の有効性が示されたと言える。

白内障手術において前房内へ細菌が混入するのは、術中もしくは術直後と考えられており、術前からの抗菌点眼剤の投与や、ポピドンヨードによる洗眼等が行われているが²⁶⁻²⁹⁾、それにも関わらず、術直後に前房内に細菌が存在する確率は、5%–7.5%と報告されている³⁰⁻³²⁾。このことから、術直後にも十分な対策を講じることが重要であり、その方法の一つとして、術直後からの抗菌点眼剤の点眼投与の必要性が考えられる。

本試験において、無処置群においても接種24時間又は96時間後の前房内容は接種菌数と同程度であった (Figures 6, 10 and 14)。一方、硝子体内に細菌を接種した場合、菌は96時間以内に飽和菌数まで著しく増加し、そのほとんどが硝子体 (後眼部) に存在することが知られている³³⁾。この違いは、前房内で増殖が抑制されているのか、眼房水の排出と共に菌が眼外へ排出されているのかは明らかではないが、前房内は硝子体内と比較して、細菌を排除しやすい環境であると推察される。さらに、0.3% ¹⁴C-ガチフロキサシン点眼液を有色ウサギに点眼投与したとき、硝子体中ガチフロキサシンの C_{max} は眼房水中と比較して100分の1以下であることから³⁴⁾、点眼投与により硝子体中での抗菌効果を期待することは非常に困難である。一方、いずれの条件においても、前房内生菌数と硝子体内生菌数は同様の傾向が認められ、1

例を除き、前房内に菌が検出されない個体は、硝子体内においても菌は検出されなかった (Figures 6, 7, 10, 11, 14 and 15)。以上のことから、前房内汚染の段階で細菌を死滅させることで、硝子体へ細菌が移行することを抑制できると考えられることから、前房内汚染の段階での処置が重要であると考えられた。本モデルは、上述の通り、ヒトにおける臨床症状を模擬したモデルであるが、水晶体を除去していない有水晶体眼である点が臨床とは異なる。最近では、白内障手術と同様に、レンズを取り除く手術を施し、水晶体嚢内に細菌を接種するモデルでの評価も実施されている³⁵⁾。水晶体の有無は、前房から硝子体内への細菌の移行に影響すると考えられるが、前房内汚染に対する抗菌効果を評価する目的においては、有水晶体眼の眼内炎モデルで十分評価可能であると判断している。

接種直後からの1回点眼群と3回点眼群を比較したとき、接種2日目以降の点眼の有無、評価期間に関わらず、明らかに3回点眼群の抗菌効果が高かった (Figures 6, 7, 10, 11, 14 and 15)。0.3% ¹⁴C-ガチフロキサシン点眼液を有色ウサギに1日3回、反復点眼投与したとき、反復投与による眼房水中濃度の蓄積又は減少傾向は認められていないことから³⁴⁾、1回点眼群と比較して3回点眼群のAUC、つまりAUC/MICは約3倍であると推測される。そのため、前房内汚染に対するガチフロキサシンの点眼投与による抗菌効果は、経口投与後の血漿中濃度推移と抗菌効果の解析より算出された、キノロン系抗菌薬の効果に関与すると報告されているAUC/MIC¹⁾に依存することが示された。

第 2 章 *In vitro* Aqueous Humor Pharmacokinetic (AHPK) model の構築

ウサギ腸球菌眼内炎モデルは、前述のとおり、臨床における術後眼内炎の症状を模擬したモデルであり、前房内汚染に対する抗菌剤の効果を評価するために適していると考えられる。しかし、前房内汚染に対して、0.3%ガチフロキサシン点眼液を点眼投与するときの効果に対する投与間隔の影響を評価するためには、眼房水中の生菌数を経時的に測定する必要がある。ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいては、生菌数は一頭体より一時点のみしか評価が出来ないため、非常に多くの動物が必要となる。また、第 1 章において、生菌数の変化と炎症症状の変化にはあまり相関関係がないことが示されたことより、抗菌薬の効果を評価するにあたり、炎症症状の評価は必須ではないと判断した。そこで、生菌数の経時的な変化の評価が可能であり、動物を使用する必要のない、組織中濃度を再現可能とする *in vitro* model が有用であると判断した。これまでに、その様なモデルは多数作製されているものの、ほとんどが経口投与後の血漿中濃度を模擬するものであり、前房内汚染の標的組織となる眼房水中濃度推移を模擬する model は提示されていない。また、点眼投与後の眼房水中濃度は、経口投与後の血漿中濃度推移と比較して、消失速度が速いため、既存のモデル条件をそのまま適用することは困難である。そこで、0.3%ガチフロキサシン点眼液を点眼投与したときの眼房水中濃度を模擬する新規 *in vitro* model の構築を目指した。

2.1 点眼投与後の眼房水中濃度測定

模擬する濃度推移としては、点眼投与後のヒト眼房水中濃度が最適であるが、ヒトにおける眼房水中濃度の測定は困難である。白内障手術前の眼房水中濃度が報告されているものの、投与方法や採取時点が限られていることから³⁶⁻³⁹⁾、基準とする濃度推移としては適していない。眼組織におけるウサギとヒトの解剖学的及び生理学的な種差は、角膜の厚み及び表面積、瞬目回数及び涙液のターンオーバーなどが挙げられるものの、サイズや構造は類似していることから⁴⁰⁾、ウサギは点眼投与における薬物動態試験及び安全性試験に広く使用されている。そこで、第 1 章でウサギ腸球菌眼内炎モデルに使用した日本白色種ウサギに、0.3%ガチフロキサシン点眼液を 50 μ L 単回点眼投与した後に、経時的に眼房水中ガチフロキサシン濃度を測定し、得られた眼房水中濃度推移の再現を *in vitro* model により目指すこととした。

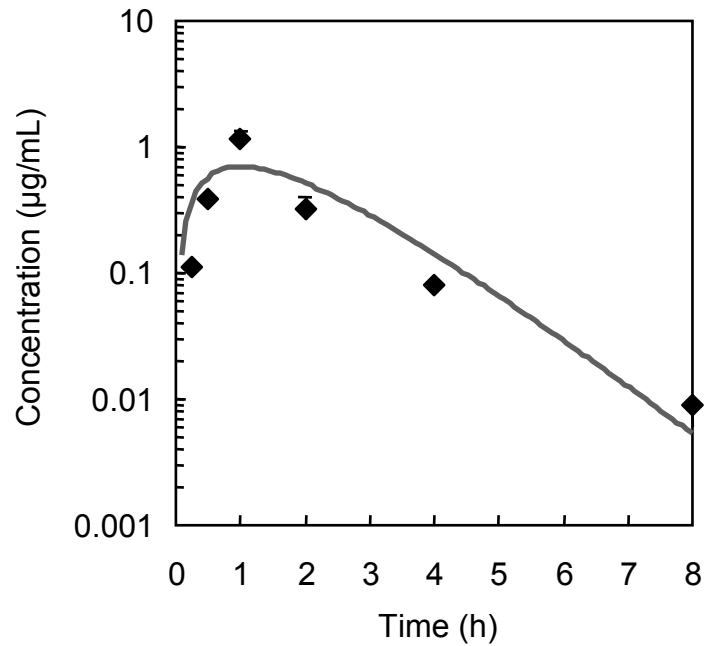


Figure 16 Concentration of gatifloxacin after a single topical administration of 0.3% gatifloxacin ophthalmic solution.

Symbols represent the mean \pm S.E.M. for 4 eyes at each time point. Solid line represent fitting curve by 1-compartment model.

ウサギに点眼投与後の眼房水中ガチフロキサシン濃度は、投与後 1 時間で C_{max} となり、その後減少した (Figure 16)。この濃度推移は、ヒトに 0.3%ガチフロキサシン点眼液を単回点眼投与後の眼房水中濃度推移³⁹⁾に近似したものであった。

得られた濃度推移を 1 次吸収のある 1-コンパートメントモデルにより解析し、pharmacokinetic (PK) パラメータを算出した (Figure 16 and Table 1)。得られた半減期 ($T_{1/2}$) は約 1.4 時間となり、報告されている他の点眼剤とほぼ同様であった⁴¹⁾。点眼投与後の薬剤は、涙液による希釈を受けた後、一部は鼻涙管から排出されるが、残りは角膜や結膜等の組織を經由して眼房水へ移行する⁴²⁾。血液を介した移行の関与も考えられるが、角膜などを介した移行に対して非常に微量であるため、1-コンパートメントモデル解析は妥当であると考えられる。

Table 1 Estimated pharmacokinetic parameters of gatifloxacin in aqueous humor after a single instillation

Tmax (h)	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Vd/F (mL)	ka (h^{-1})	kel (h^{-1})	T _{1/2} (h)	AUC ₀₋₈ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)
1.0	0.70	78	0.99	1.0	1.4	1.91

算出された移行率と分布容積のハイブリッドなパラメータである Vd/F を利用して、点眼投与後の眼房水への吸収率を算出した。実際のウサギ眼房水量 (約 0.25–0.3 mL)⁴³⁾ を分布容積 (Vd) として算出すると、0.3% ガチフロキサシン点眼液を 50 μL 単回点眼投与後の眼房水への吸収率は 0.32%–0.38% となり、これは報告されている点眼投与後の眼房水への薬物の吸収率とほぼ一致するものであった⁴⁴⁾。

様々な動物を用いてガチフロキサシンの有効性を確保するために必要な AUC/MIC が報告されており、マウス大腿又は肺感染モデルにおいて肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*: *S. pneumoniae*) に対しては 52 以上、*S. aureus* に対しては 37 以上が必要であると報告されている⁴⁵⁾。一方、ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいて用いた *E. faecalis* に対するガチフロキサシンの MIC は 0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり⁴⁶⁾、効果の認められた 0.3% ガチフロキサシン点眼液を単回点眼投与後の AUC/MIC は、わずか 4.9 であった。3 回投与では AUC が 3 倍になると仮定しても 14.7 程度であり、前述した基準値よりも低い。しかし、ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいて、0.3% ガチフロキサシン点眼液を単回もしくは 3 回点眼投与することにより炎症スコアの抑制効果及び生菌数の減少効果が確認できおり、*E. faecalis* に対する前房内汚染に対しては、ガチフロキサシンの AUC/MIC が 4.9 以上で、効果が期待できるものと考えられた。

2.2 容量及び速度の設定

1-コンパートメントモデル解析の結果、ka と kel がほぼ等しかったことから、ka = kel の条件における濃度推移を示す式を導いた。

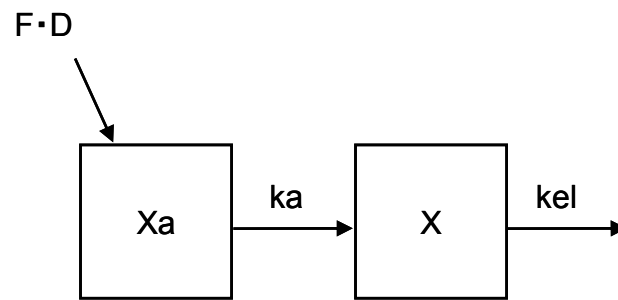


Figure 17 Schematic of 1-compartment model
 F: absorption rate, D: dose, X: amount of drug,
 ka: absorption rate constant, kel: elimination rate constant

Figure 17 より、薬物量 (X_a 及び X) の変化する速度を以下の数式で表した。

$$\text{Equation 1: } \frac{dX_a}{dt} = -ka \cdot X_a$$

$$\text{Equation 2: } \frac{dX}{dt} = ka \cdot X_a - kel \cdot X$$

これらの数式を、それぞれラプラス変換した。

Equation 1 より、

$$\begin{aligned} L\left(\frac{dX_a}{dt}\right) &= -X_a(0) + S \cdot \tilde{x}_a \\ &= -ka \cdot \tilde{x}_a \end{aligned}$$

$X_a(0) = F \cdot D$ であるため、

$$\tilde{x}_a = \frac{F \cdot D}{S + ka}$$

という関係式が得られた。

さらに、Equation 2 より、

$$L\left(\frac{dX}{dt}\right) = -X(0) + S \cdot \tilde{x}$$

$$= ka \cdot \tilde{x}a - kel \cdot \tilde{x}$$

$$X(0) = 0, \quad \tilde{x}a = \frac{F \cdot D}{S + ka} \text{ より、}$$

$$\tilde{x} = \frac{ka}{S + kel} \cdot \tilde{x}a$$

$$= \frac{F \cdot D \cdot ka}{(S + kel) \cdot (S + ka)}$$

という関係式が得られた。ここで、 $ka = kel$ であることから、 $ka = kel = K$ とおき、

$$\tilde{x} = \frac{F \cdot D \cdot K}{(S + K)^2}$$

が得られ、ラプラス逆変換の公式 $\frac{A}{(S + \alpha)^2} \rightarrow A \cdot t \cdot e^{-\alpha t}$ により、薬物 X の変化量を表す、以下の数式を導いた。

$$\text{Equation 3: } X = F \cdot D \cdot K \cdot t \cdot e^{-K \cdot t}$$

これらの $ka = kel$ の条件及び既存モデルを参考に、作製するモデルは、ポンプ、薬物希釈セル (D) 及び培養セル (C) を無菌状態で直列に繋ぐこととした (Figure 18)。培養セルには、2 方向の穴があり、2 重構造となっているため温度を一定に保つことができる角膜透過セルを用いることとした。

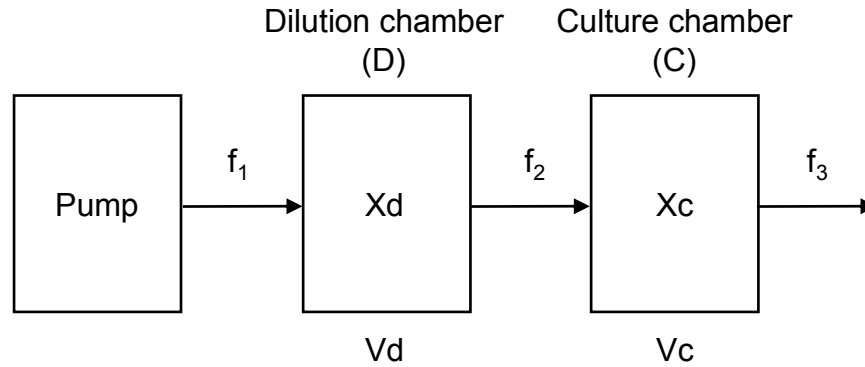


Figure 18 Schematic of in vitro model

X: amount of drug, f: flow rate, V: volume

モデルの構成より、ポンプからは新鮮な培地のみを流し、それぞれを流れる速度は一定であるとして、 $f_1 = f_2 = f_3 = f$ とした。さらに、用いるセルのサイズから、 V_d 及び V_c を 3.5 mL (=V) とした。

Equation 1 の両辺を V で割り、 $K = \frac{f}{V}$ ($= \frac{f_2}{V_d} = \frac{f_3}{V_c}$)、 $C_{D0} = \frac{F \cdot D}{V}$ 、 $C_c = \frac{X}{V}$ とすると

培養セル内のガチフロキサシン濃度は、以下の数式で表すことができる。

$$\text{Equation 4 : } C_c = \frac{f}{V} \cdot C_{D0} \cdot t \cdot e^{-\frac{f}{V} \cdot t}$$

ここで、モデル解析より K は 1 であり、セルのサイズより V を 3.5 mL としたことから、 f を 3.5 mL/h とした。この設定値より、培養セルの濃度推移は以下の数式で表すことができる。

$$\text{Equation 5 : } C_c = C_{D0} \cdot t \cdot e^{-t}$$

さらに、ウサギに 0.3% ガチフロキサシン点眼液を点眼投与したときの濃度推移より算出した T_{max} (1.0 h) 及び C_{max} (0.701 $\mu\text{g/mL}$) を、Equation 5 に当てはめることにより、 C_{D0} は 1.91 $\mu\text{g/mL}$ と設定した。

2.3 理論濃度推移の算出

単回投与と同様に、0、0.25、1、2、3、4、6 及び 8 時間間隔で 3 回投与したときのガチフロキサシン濃度の理論濃度推移を算出した (Figure 19)。反復投与における濃度推移は、投与間隔を τ として、Equation 5 (2 回目投与まで)、Equation 6 (3 回目投与まで)、Equation 7 (3 回目投与後) により算出した。

$$\text{Equation 6 : } C_c = C_{D0} \cdot t \cdot e^{-t} + C_{D0} \cdot (t - \tau) \cdot e^{-(t-\tau)}$$

$$\text{Equation 7 : } C_c = C_{D0} \cdot t \cdot e^{-t} + C_{D0} \cdot (t - \tau) \cdot e^{-(t-\tau)} + C_{D0} \cdot (t - 2\tau) \cdot e^{-(t-2\tau)}$$

τ : Dosing interval

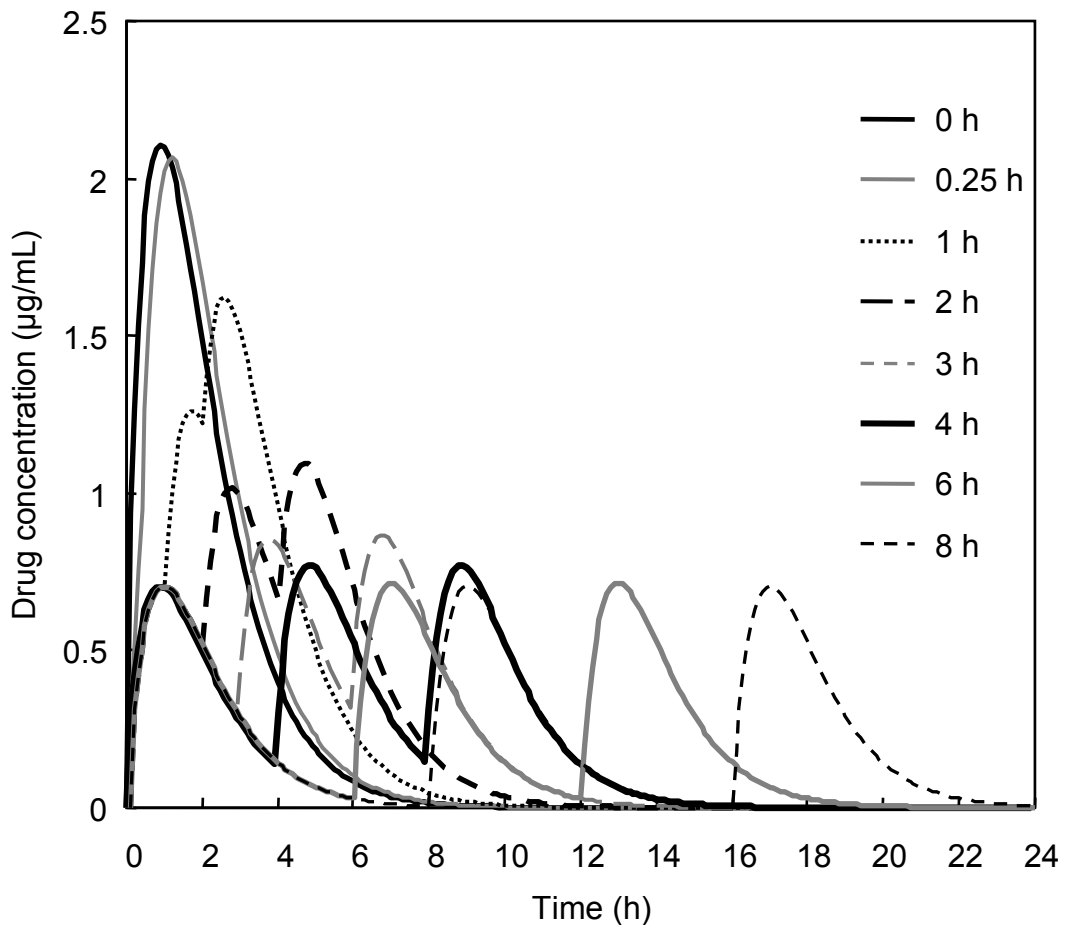


Figure 19 *In vitro* simulation of concentration-time profiles of gatifloxacin in rabbit aqueous humor after three-times-daily dosing at various intervals.

上記の濃度推移から以下の数式を用いて Tmax 及び Cmax を算出した (Table 2)。

Tmax については、Equations 5-7 をそれぞれ微分し、得られた式の値が 0 となる時の時間を Tmax として、以下の通り Tmax を導く数式を算出した。なお、単回投与時の Tmax (Tmax1) は、1 時間であった。

$$\text{Equation 8 : } T_{\text{max}2} = (1 + e^{\tau} + \tau \times e^{\tau}) / (1 + e^{\tau})$$

(2 回目投与後 3 回目投与まで)

$$\text{Equation 9 : } T_{\text{max}3} = (1 + e^{\tau} + e^{2\tau} + \tau \times e^{\tau} + \tau \times 2 \times e^{2\tau}) / (1 + e^{\tau} + e^{2\tau})$$

(3 回目投与以降)

τ : Dosing interval

Cmax は、Equations 5-7 に各 Tmax を代入して各濃度を算出し、最も高い値とした。

Table 2 PK parameters

Dose frequency (times)	Dosing interval (h)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ($\mu\text{g}\times\text{h/mL}$)
1	—	0.70	1.91
	0	2.11	
	0.25	2.07	
	1	1.62	
	2	1.10	
	3	0.87	
	4	0.77	
	6	0.72	
3	8	0.70	

2.4 培地の選択

眼房水により近い環境にするために、使用する培地は人工眼房水であるオペガード MA[®]を選択したが、培養が長時間になると炭酸が抜け、pH が変化することが明らかとなった (pH 6.66 → pH 8.71)。そこで、pH を一定に保つために炭酸を除外したところ、白濁することが

明らかとなり、オペガード MA[®]の利用が困難となった。また、細菌の培養によく用いられる Brain Heart Infusion (BHI) broth は、培地中に含まれる成分の詳細が不明であること、培地由来の夾雑ピークが多いために HPLC での薬物定量が困難となることから不適切と判断した。そこで、細胞培養等で使用されている DMEM/F-12 を培地として選択した。細菌に対する本培地の妥当性については、3.1.1 項にて考察する。

2.5 モデルの作製

既存のモデルは、主に容器からの細菌の消失を考慮しないモデル^{47,48}と細菌の消失を防ぐためにフィルターを設置したモデルが存在する⁴⁹⁻⁵¹。上述の通り、眼房水中濃度推移は消失が速く、ほとんどの細菌が流出してしまう可能性が考えられたことから、フィルターを設置するモデルを選択した。

2.5.1 モデル 1

Figure 20 にモデル 1 を模式的に示した。薬物希釈セルに、ガチフロキサシンを添加後、経時的に培養セル内の濃度推移を確認したところ、このモデルでは単回投与したときのガチフロキサシンの理論濃度推移と比較して、セル内濃度が低値を示した (Figure 21)。これは、培養セルの右側に隣接しているセルへガチフロキサシンが拡散し、培養セル内の薬物濃度が低下したためと推察された。

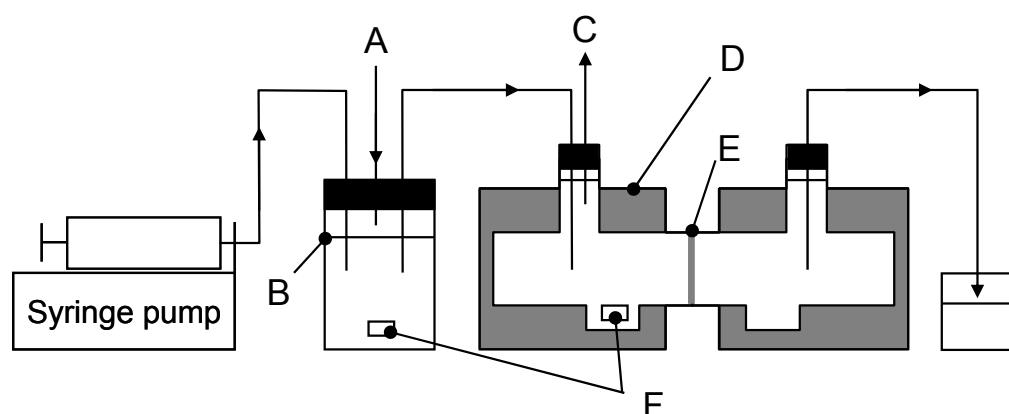


Figure 20 Schematic diagram of the *in vitro* AHPK model (1st ver.).

(A) drug port, (B) dilution chamber, (C) sample port, (D) culture chamber,
(E) membrane filter and (F) magnetic stirrer.

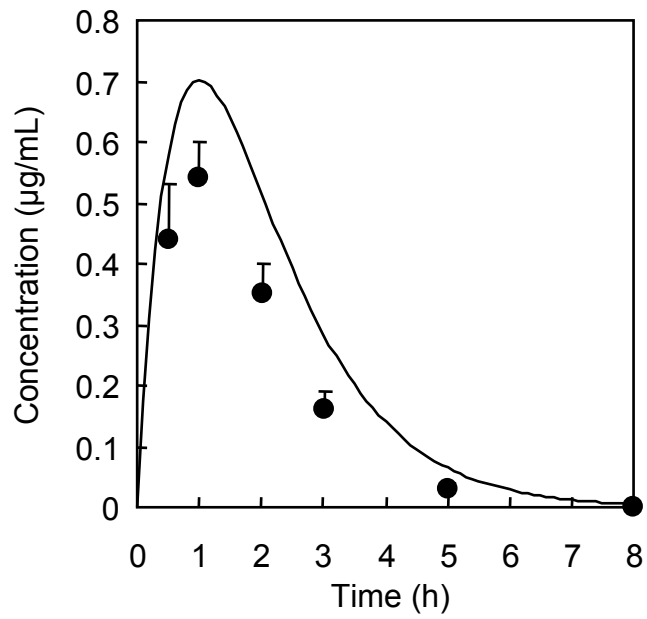


Figure 21 Concentration of gatifloxacin following a single application in an *in vitro* AHPK model (1st ver.).

The data represent the mean + S.E.M. (n = 3). The solid line represents the predicted concentration of gatifloxacin in culture chamber.

2.5.2 モデル 2

モデル1の問題点を解決するために、培養セルに隣接する右側のセルには培地を満たさず、フィルターを介して培養セルから右側のセルに移動した液をポンプで吸引し、排出させることとした (Figure 22)。その結果、培養セル内のガチフロキサシン濃度は、理論濃度推移よりも高値を示した (Figure 23)。この理由として、用いたセルの形状が複雑であるため、溶液の粘性等によって、培養セル内にデッドスペースが生じている可能性を考えた。

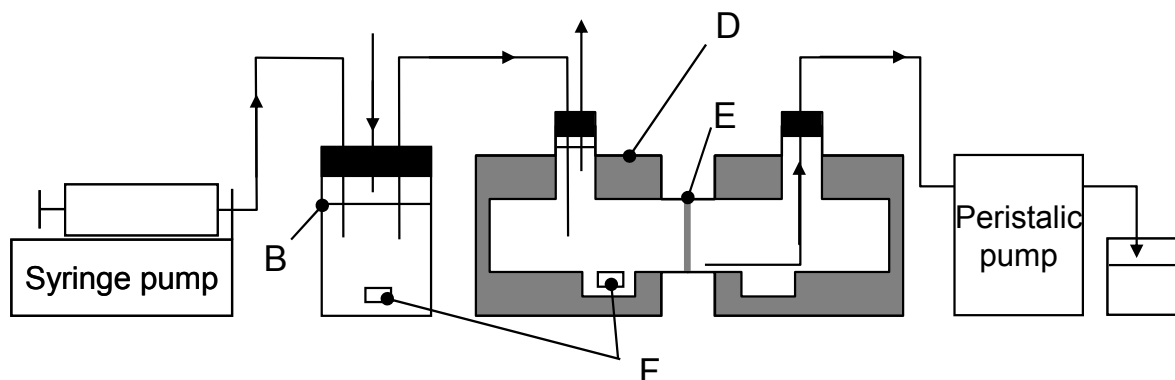


Figure 22 Schematic diagram of the *in vitro* AHPK model (2nd ver.).

(A) drug port, (B) dilution chamber, (C) sample port, (D) culture chamber, (E) membrane filters and (F) magnetic stirrer.

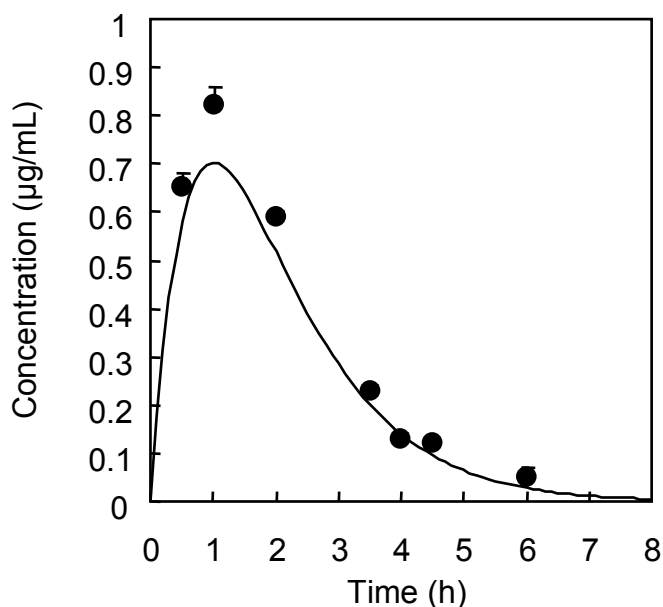


Figure 23 Concentration of gatifloxacin following a single application in an *in vitro* AHPK model (2nd ver.).

The data represent the mean + S.E.M. (n = 3). The solid line represents the predicted concentration of gatifloxacin in culture chamber.

2.5.3 モデル 3

単回投与

モデル 2 において、理論濃度推移よりも高値を示した理由として、用いたセルの形状が複雑であるため、溶液の粘性等によって、培養セル内にデッドスペースが生じている可能性を考えた。そこで、デッドスペースの影響を減らすために、セル内の攪拌子を 2 つに増やすこととした。また、フィルター付近にチップを設置するために、モデル 2 で培養セルの右側に隣接していたセルを取り除いた。さらに、流速が速いため、細菌を添加した場合にフィルターが細菌で目詰まりを起こし、培養セル内圧が上昇することが明らかとなったので、フィルターの前にプレフィルターを設置することで、目詰まりを防止した。改良して得られたモデル 3 の模式図を Figure 24 に示した。本モデルにおいてガチフロキサシンを添加した後に得られた培養セル内ガチフロキサシン濃度は、理論値にほぼ一致し、統計学的にも有意な相関があることが明らかとなった (Figure 25, $r^2 = 0.9922$, $p < 0.001$)。

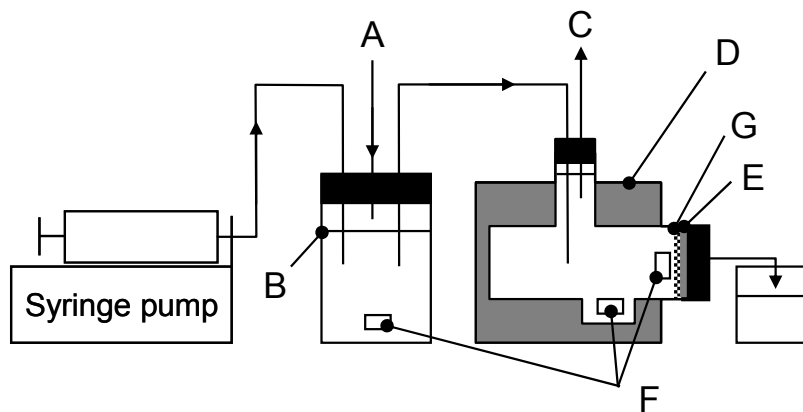


Figure 24 Schematic diagram of the *in vitro* AHPK model (3rd ver.).

(A) drug port, (B) dilution chamber, (C) sample port, (D) culture chamber, (E) membrane filter (F) magnetic stirrer and (G) Pre filter.

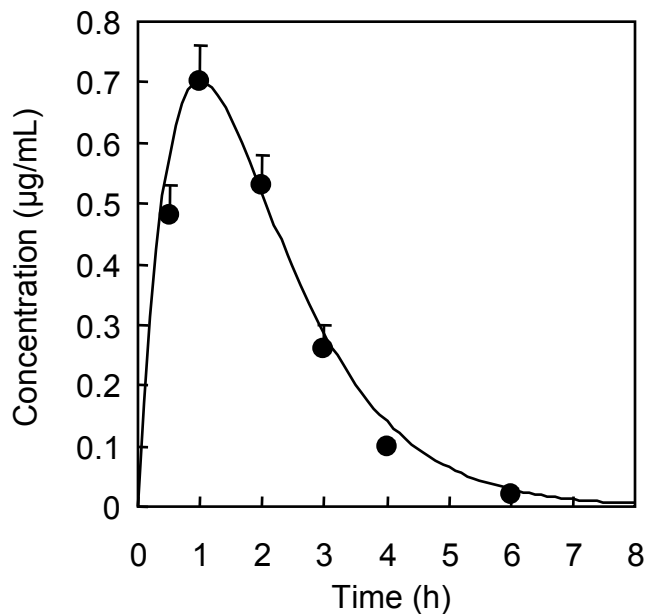


Figure 25 Concentration of gatifloxacin following a single application in an *in vitro* AHPK model (3rd ver.).

The data represent the mean + S.E.M. (n = 3). The solid line represents the predicted concentration of gatifloxacin in culture chamber.

反復投与

モデル3を用いて、ガチフロキサシンを薬物希釈セル (B) に 0.25 時間間隔及び 2 時間間隔で 3 回添加したときの、培養セル (D) 内のガチフロキサシン濃度推移を測定した。わずかに高値を示したものの、ほぼ理論通りの濃度推移が得られた (Figures 26 and 27)。単回投与と同様に、理論値と実測値の相関を確認した結果、統計学的に有意な相関関係が確認できた (0.25 時間間隔: $r^2 = 0.9888$, $p < 0.001$, 2 時間間隔: $r^2 = 0.9870$, $p < 0.001$)。以上のことから、ウサギに 0.3%ガチフロキサシン点眼液を 50 µL 点眼投与したときの眼房水中濃度推移を模擬する model (*in vitro* AHPK model) が構築できたと判断した。

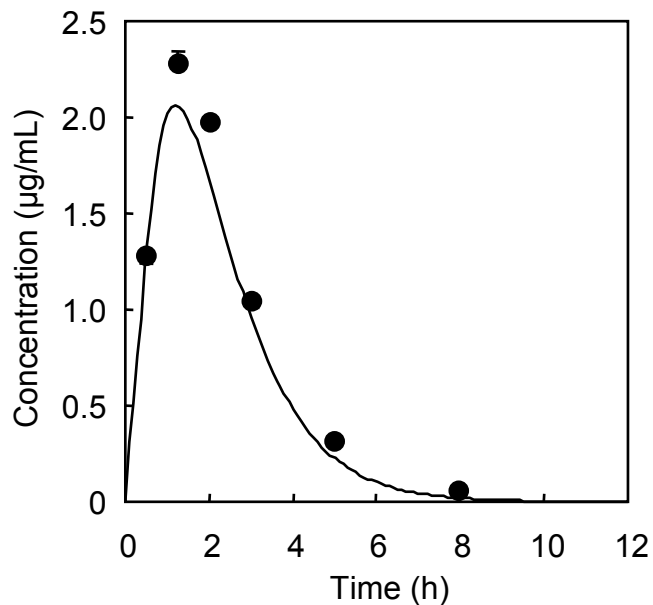


Figure 26 Concentration of gatifloxacin in an *in vitro* AHPK model (3rd ver.). gatifloxacin was applied three times at intervals of 15 min.

The data represent the mean + S.E.M. (n = 3). The solid line represents the predicted concentration of gatifloxacin in culture chamber after three times addition every 15 min.

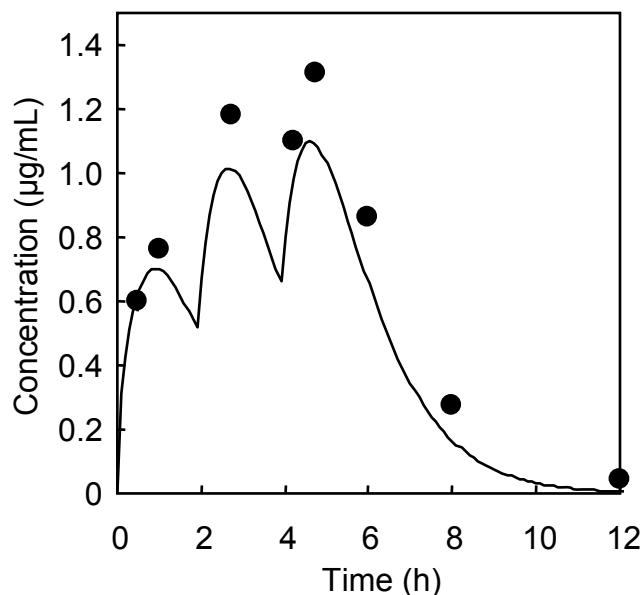


Figure 27 Concentration of gatifloxacin in an *in vitro* AHPK model (3rd ver.). gatifloxacin was applied three times at intervals of 2 h.

The data represent the mean + S.E.M. (n = 3). The solid line represents the predicted concentration of gatifloxacin in culture chamber after three times addition every 2 h.

2.6 考察

0.3%ガチフロキサシン点眼液をウサギに 50 μ L 単回点眼投与したときの眼房水中ガチフロキサシン濃度を再現する *in vitro* aqueous humor pharmacokinetic model (*in vitro* AHPK model) を作製した。

抗菌剤の効果は、薬剤と細菌の直接的な反応であることから、感染組織における薬物濃度が重要であり、動物を用いた感染モデルを使用する場合、ヒトと動物の組織中濃度推移の違いを考慮しなければならない。一方、*in vitro* AHPK model では流速や初期濃度を変化させるだけで、どのような濃度推移でも再現可能であり、抗菌剤の有効性の評価において有益なモデルであると考えられる。組織中濃度を *in vitro* で再現し、細菌と薬剤の関係を評価するモデルはこれまでも多く存在したが、眼房水中薬物濃度推移を再現したモデルは *in vitro* AHPK model が初めてである。

眼房水への薬物の移行ルートには、角膜ルートと強結膜ルートがあり⁴²⁾、いずれのルートを紹介するか、またその透過性には、脂溶性や分子サイズなどの化合物の物理化学的性質が影響するが⁵²⁻⁵⁶⁾、眼房水へ移行した薬物の消失は、シュレム管などを介した眼房水排出の影響が大きいと考えられている。そのため、今回ガチフロキサシン点眼液を点眼投与した後の眼房水中濃度推移でみられたように、吸収速度定数と消失速度定数がほぼ等しく、他のキノロン系抗菌点眼剤を点眼投与した後の眼房水中濃度推移は、ガチフロキサシンを点眼投与した後の眼房水中濃度推移とほぼ等しい^{57,58)}。従って、今回構築したモデルは、他のキノロン系抗菌点眼剤を点眼投与したときの眼房水中濃度推移を再現することも可能であると考えられる。また、キノロン系抗菌点眼剤のみならず、他の点眼剤においても同様の濃度推移が確認できることから⁵⁹⁻⁶¹⁾、本モデルは細菌に対する抗菌効果だけでなく、細胞等に対する薬理効果や安全性の評価にも有用であると考えられる。

第 3 章 *In vitro* AHPK model を用いた評価

第 1 章にて、*E. faecalis* を起因菌として眼内炎を発症させたウサギに 0.3%ガチフロキサシン点眼液を点眼投与した際、投与回数の増加に伴って効果が増加することが示され、点眼投与したガチフロキサシンの前房内における効果も、一般的にキノロン系抗菌剤の効果に関与すると考えられている AUC/MIC に依存することが明らかとなった。一方、前述の通り、点眼剤においては用法・用量の変更が困難であるため、AUC/MIC を増加させることは容易ではない。そこで、投与回数、つまり AUC/MIC が一定となる条件において、比較的容易に変更可能な投与間隔が効果に及ぼす影響を、0.3%ガチフロキサシン点眼液を点眼投与後の眼房水中ガチフロキサシン濃度推移を再現する *in vitro* AHPK model を用いて、評価することとした。

3.1 *E. faecalis* に対する検討

ウサギ腸球菌眼内炎モデルで得られた結果と合わせて考察するために、同じ *E. faecalis* A-2-7 株を用いて、検討を実施した。

3.1.1 薬剤非添加時の増殖曲線

ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいて眼内炎の発症が確認されている 1×10^4 CFU/eye (房水容量を 300 μ L としたとき 3×10^4 CFU/mL) より、初期菌量を 3×10^4 CFU/mL (4 Log CFU/mL) に設定した。

初期値からの生菌数の経時的な変化を Figure 28 に示す。培養開始後 3 時間から菌の増殖がみられ、24 時間では 9.3 ± 0.6 Log CFU/mL に達した。ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいては、接種 24 時間もしくは 96 時間後においても、接種菌量と同程度の生菌数を示した (約 4 Log CFU/tissue (mL)、硝子体容量を 1 mL⁶²⁾ として換算)。一方、株は異なるものの *E. faecalis* を硝子体内へ 2 Log CFU 注入したときの、生菌数の変化は、約 6 時間で 1 Log CFU/eye (mL) 上昇し、24 時間で 8.98 Log CFU/eye (mL) に到達することが示されている (後眼部容量を 1 mL⁶²⁾ として換算)。前述したとおり、ウサギ腸球菌眼内炎モデルでは、その前房における細菌の増殖が、硝子体内と比較して抑制傾向にあると考えられるが、実際の患者においては、そのような抑制傾向があるか否か定かではなく、前房内における細菌の増殖が、硝子体内での増殖に類似したものになる可能性がある。本モデルは、その現実に関わり得る、生体機能が低下した重篤な感染状態を模擬していると考えられる。予防において、効果を過大評価することは、発症リスクを増加させることとなるため、本モデルを用いて予防用法の検討を行うことは有用であると考えられる。

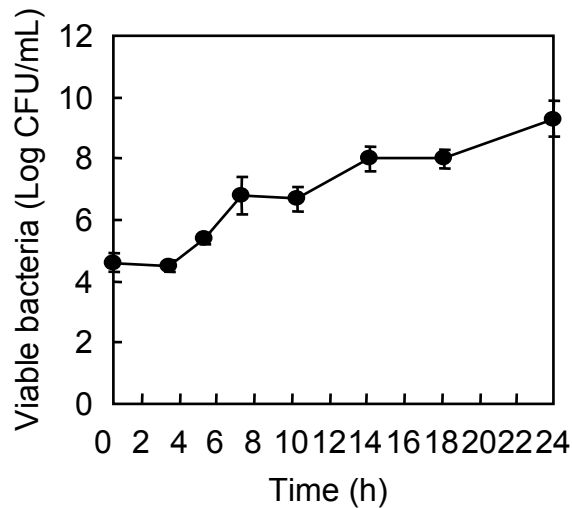


Figure 28 Growth kinetics of *E. faecalis* A-2-7.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3).

3.1.2 単回又は各種投与間隔で3回添加時の殺菌増殖曲線

単回又は投与回数を3回に固定して0、0.25、1、2、3、4、6及び8時間間隔でガチフロキサシンを添加したときの生菌数の変化を評価した。初期値に対する生菌数の変化比を Figure 29 に示した。初期値は 4.5 ± 0.3 Log CFU/mL (平均値 \pm 標準誤差) であった。単回投与では、3時間までは生菌数が減少したものの、その後、再増殖が起こり、10時間後には薬剤非添加群と同程度の生菌数に達した。3回投与群においても、全ての投与間隔で同様に生菌数の減少と再増殖が認められ、いずれの投与間隔においても24時間後では薬剤非添加群とほぼ同程度の生菌数となった。

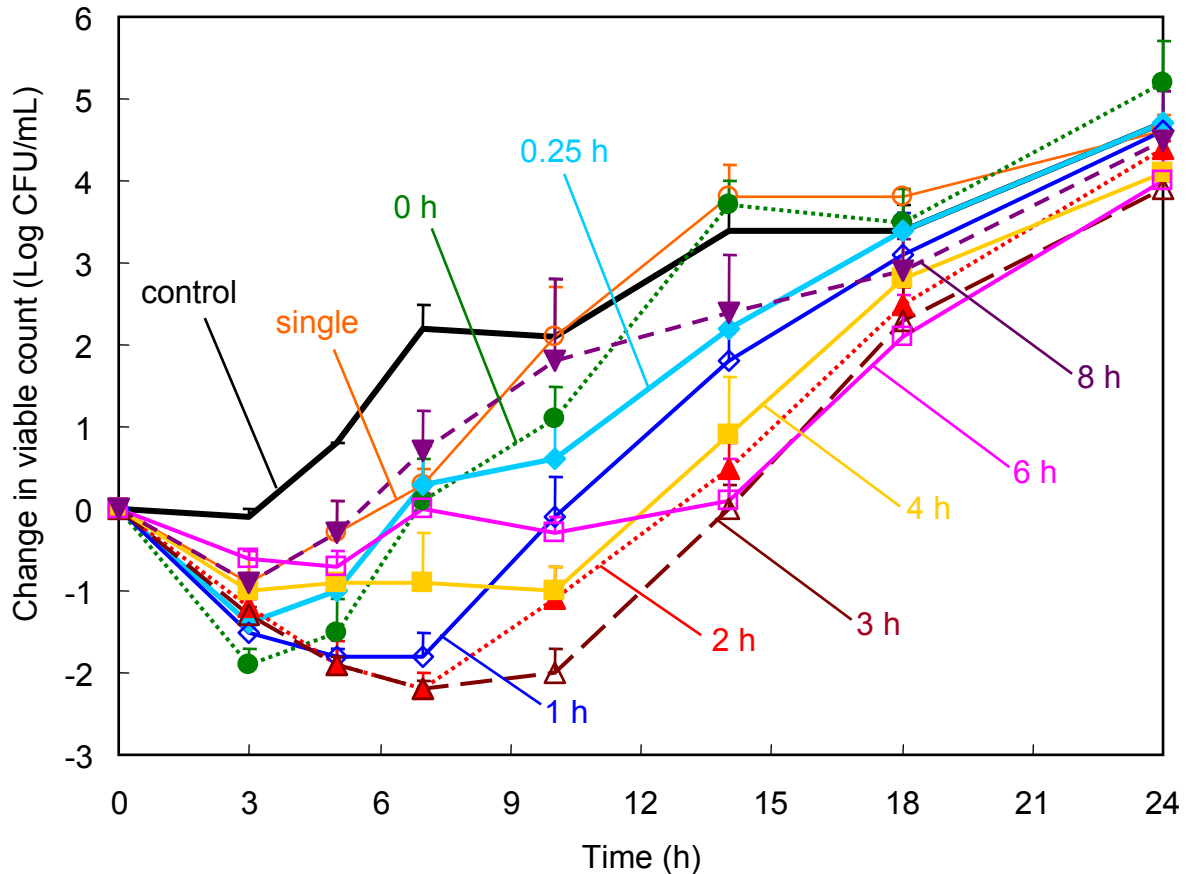


Figure 29 Killing and regrowth kinetics of *E. faecalis* A-2-7 exposed to gatifloxacin once or three times at various intervals.

The data represent the mean + S.E.M. (n = 3–5).

しかし、生菌数の初期値からの最大減少量 (Δ_{\max}) においては、投与間隔が0時間から3時間までは、投与間隔の延長に伴ってわずかに増加傾向を示したものの、投与間隔が4時間になると減少に転じ、6時間、8時間と投与間隔を延長するとさらに減少する傾向が認められた (Figures 29 and 30)。また、最大減少量に到達する時間 ($T_{\Delta_{\max}}$) も、同様の傾向を示し、投与間隔が0時間から3時間までは投与間隔の延長に伴って延長したが、4時間間隔及び6時間間隔で減少傾向を示し、8時間間隔ではさらに低下した (Figures 29 and 31)。

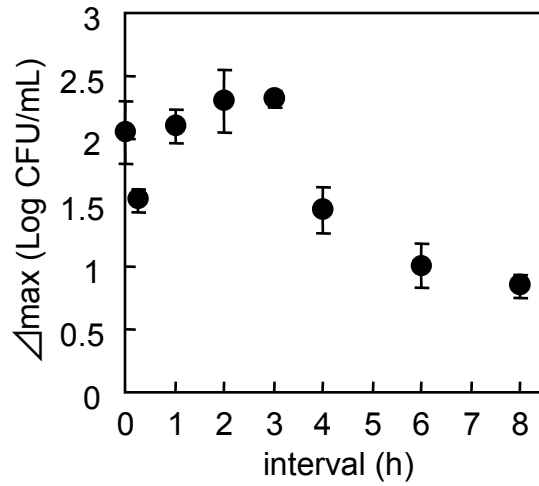


Figure 30 The relationship between dosing interval and maximum reduction in viable count (Δ_{\max}) (*E. faecalis* A-2-7).

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–5).

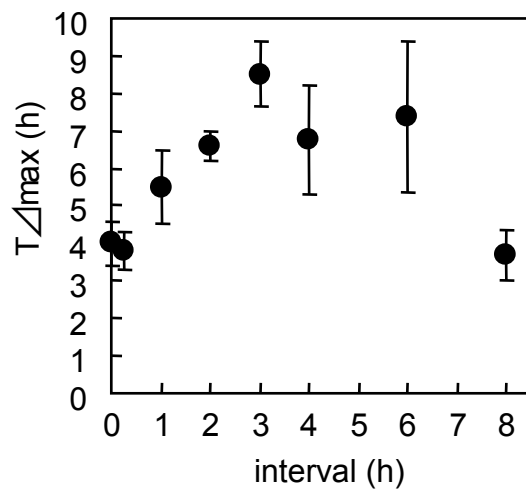


Figure 31 The relationship between dosing interval and time to reach maximum reduction of viable count ($T\Delta_{\max}$) (*E. faecalis* A-2-7).

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–5).

3.1.3 投与間隔と抗菌効果の関係

殺菌増殖曲線 (Figure 29) より、投与間隔によって、生菌数の経時的な推移が変化することが示された。そこで、この 24 時間における生菌数の変化を総合的に評価できる効果の指標として、薬剤非添加時と薬剤添加時の殺菌増殖曲線間面積 (the area between control growth and the bacterial killing and regrowth curve for 24 h, 以下 ABBC⁶³⁾) を算出した (Table 3)。単回投与時の ABBC は $5.98 \pm 5.7 \text{ Log CFU/mL}\times\text{h}$ であった。それに対して、3 回投与群はいずれの投与間隔においても $15.00 \text{ Log CFU/mL}\times\text{h}$ 以上であり、単回投与と比較して 3 回投与の効果が高いことが示された。この投与回数が効果に与える影響については、第 1 章のウサギ腸球菌眼内炎モデルを用いた検討で得られた結果を反映していると考えられる。

3 回投与時の各投与間隔と ABBC の関係を Figure 32 に示した。投与間隔が 0 時間より 3 時間までは、投与間隔の延長に伴って ABBC は増加したが、4 時間以上の投与間隔では減少する傾向を示し、投与間隔時間に対して釣鐘型の推移を示した。この 3 回投与における投与間隔と ABBC の関係について、一元配置分散分析を行った結果、投与間隔が抗菌効果に統計学的に有意な影響を及ぼしていることが示された ($p < 0.001$)。これは、投与回数を固定した条件、すなわち、AUC/MIC が一定となる条件であるにもかかわらず、投与間隔が変化することにより抗菌効果が異なることを明確に示すものであった。さらに、3 回投与における ABBC について、投与間隔群間で比較したところ、0 時間間隔及び 8 時間間隔群に対して 2 時間間隔及び 3 時間間隔群が有意に高いことが確認できた ($p < 0.05$, Figure 32)。

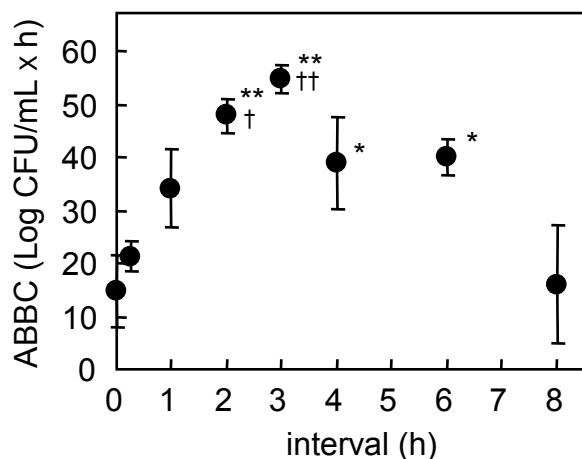


Figure 32 The relationship between the dosing interval and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *E. faecalis* A-2-7.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–5). **, p < 0.01; *, p < 0.05, compared with 0-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided). ††, p < 0.01; †, p < 0.05, compared with 8-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided).

3.1.4 C_{max}/MIC 及び T>MIC と抗菌効果の関係

そこで次に、投与間隔に伴う ABBC の変化に関与する PK-PD パラメータを明らかとするために、PK-PD パラメータと ABBC との関係を解析することとした。投与回数を 3 回に固定しているため、AUC/MIC は一定となり、関与が考えられる既存の PK-PD パラメータは C_{max}/MIC と T>MIC となる。そこで、理論濃度推移より算出した各群の PK-PD パラメータ (C_{max}/MIC 及び T>MIC) と ABBC との関係を評価した (Table 3)。

Table 3 PK-PD indices and antibacterial efficacy against *E. faecalis* A-2-7 at various dosing regimens and intervals

Regimen	Dosing interval (h)	PK-PD indices		ABBC
		T>MIC (h)	C _{max} /MIC	(Log CFU/mL×h)
QD	–	2.24	1.80	5.98 (5.70)
TID	0	4.02	5.40	15.00 (6.94)
	0.25	4.11	5.30	21.70 (3.15)
	1	5.05	4.14	34.66 (7.68)
	2	6.62	2.80	47.49 (3.24) **,†
	3	7.49	2.22	55.72 (2.82) **,††
	4	7.08	1.98	38.95 (8.62) *
	6	6.80	1.83	40.31 (3.50) *
	8	6.74	1.81	16.52 (10.93)

QD, once a day; TID, three times a day. Calculated AUC/MIC values are 4.9 and 14.7 for QD and TID, respectively. ABBC values are expressed as mean (S.E.M.) in parentheses of 3 – 5 experiments. **, p<0.01; *, p<0.05, compared with 0-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided). ††, p<0.01; †, p<0.05, compared with 8-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided).

まず、ABBC と C_{max}/MIC の関係进行评估した。ABBC は C_{max}/MIC が約 2 以下においては、C_{max}/MIC の増加に伴って増加傾向を示したが、2 以上になると C_{max}/MIC の増加に伴って減少した (Figure 33)。単回帰分析の結果、両者には負の相関が認められたが (p<0.01)、相関係数 (r²) は 0.2314 と低く、また、C_{max}/MIC が低い領域では明らかな増加傾向が認められていることから、単相関では C_{max}/MIC と ABBC の関係を描写することは出来ないと考えられた。さらに、C_{max}/MIC は抗菌効果と正の相関が期待されるパラメータであるにも関わらず、C_{max}/MIC が 2 以上の領域では、その上昇に伴い ABBC が明らかな減少傾向を示したことから、ABBC は C_{max}/MIC の増加に伴い見掛け上低下しているものの、実際に影響しているの

は C_{max}/MIC そのものではなく、その背後にある別の因子であると推察した。

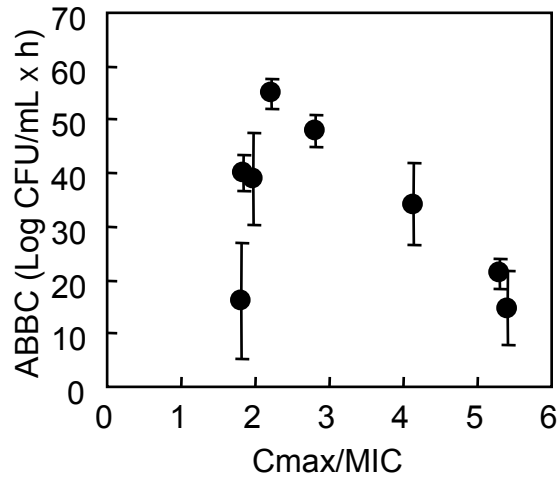


Figure 33 The relationship between C_{max}/MIC and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *E. faecalis* A-2-7.

The data represent the mean ± S.E.M. (n = 3–5)

そこで次に、ABBC と T>MIC の関係について解析したところ、T>MIC の延長に伴う ABBC の増加傾向が認められた (Figure 34)。単回帰分析により、相関係数 (r^2) は 0.3492 と低かったが、有意な正の直線関係が認められた ($p < 0.001$)。C_{max}/MIC とは異なり、正の相関が確認できたことから、ABBC の変化は、C_{max}/MIC よりも T>MIC に影響を受けている可能性があると考えられた。しかし、7 時間付近では ABBC の大きなバラツキが確認されたため、C_{max}/MIC と同様に両者の関係を単相関で描写することはできないと考えられた。

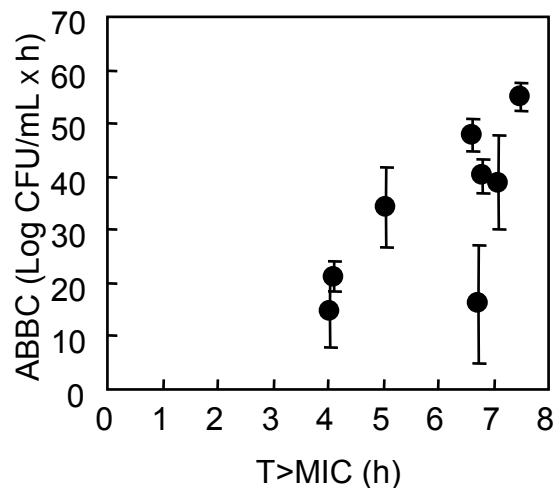


Figure 34 The relationship between T>MIC and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *E. faecalis* A-2-7.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–5).

そこで次に、T>MIC の連続性に着目した。投与間隔が 2 時間までは眼房水中濃度は常に MIC を上回っているため、T>MIC が連続しているのに対し、それ以上の投与間隔では T>MIC が不連続となる。そこで、T>MIC が連続している投与間隔 0 時間から 2 時間までの T>MIC と ABBC の関係を直線回帰したところ、両者には有意な正の相関が確認できた ($r^2 = 0.5962$, $p = 0.0002$, Figure 35)。このことから、3 時間より長い投与間隔において、投与間隔の延長に伴って ABBC が減少したのは、T>MIC が不連続になることによると推察された。

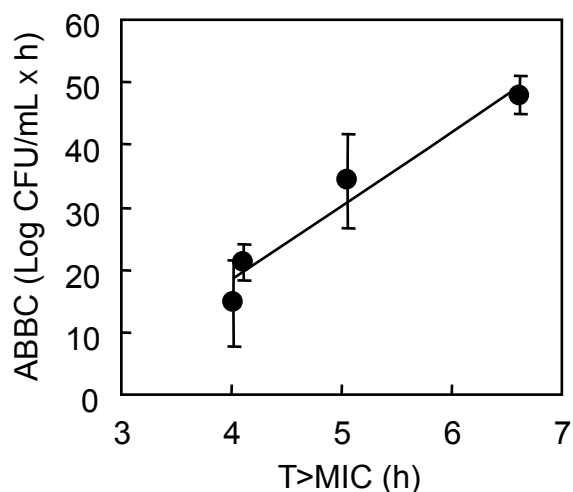


Figure 35 The relationship between continuous T>MIC and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *E. faecalis* A-2-7.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 4–5). Solid line shows the regression line.

3.1.5 新規 PK-PD パラメータの算出

T>MIC が連続していれば、ABBC は T>MIC に依存して増加することが確認できたことから、これらの知見をパラメータ化し、投与間隔による ABBC の変化の解析を試みることにした。すなわち、全ての投与間隔において、最初に濃度が MIC を上回ってから最後に MIC を下回るまでの時間を intermission of T>MIC (*i*T>MIC) と定義した (Figure 36 and Table 4)。さらに、この *i*T>MIC の時間内において、眼房水中ガチフロキサシン濃度が MIC を下回る時間の総計として T<MIC を定義した (Figure 36 and Table 4)。

Table 4 PK-PD indices and antibacterial efficacy of gatifloxacin against *E. faecalis* A-2-7 at various dosing regimens and intervals

Regimen	Dosing interval (h)	PK-PD indices			C _{max} /MIC	ABBC (Log CFU/mL×h)
		T>MIC (h)	<i>i</i> T>MIC (h)	T<MIC (h)		
QD	–	2.24	2.24	0.00	1.80	5.98 (5.70)
TID	0	4.02	4.02	0.00	5.40	15.00 (6.94)
	0.25	4.11	4.11	0.00	5.30	21.70 (3.15)
	1	5.05	5.05	0.00	4.14	34.66 (7.68)
	2	6.62	6.62	0.00	2.80	47.49 (3.24) **, [†]
	3	7.49	8.42	0.93	2.22	55.72 (2.82) **, ^{††}
	4	7.08	10.32	3.24	1.98	38.95 (8.62) *
	6	6.80	14.26	7.46	1.83	40.31 (3.50) *
	8	6.74	18.24	11.50	1.81	16.52 (10.93)

QD, once a day; TID, three times a day. Calculated AUC/MIC values are 4.9 and 14.7 for QD and TID, respectively. ABBC values are expressed as the mean (S.E.M.) in parentheses of 3 – 5 experiments. **, p<0.01; *, p<0.05, compared with 0-h dosing interval (Dunnnett's test, 2-sided). ††, p<0.01; †, p<0.05, compared with 8-h dosing interval (Dunnnett's test, 2-sided).

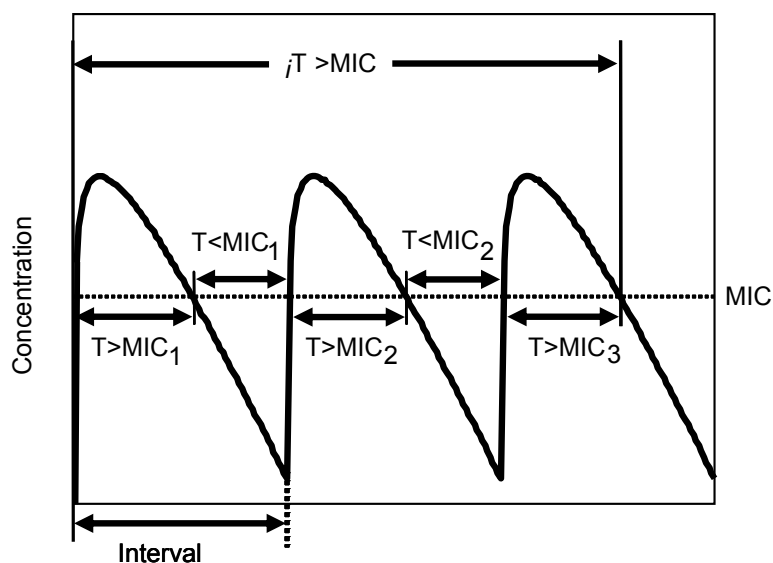


Figure 36 Schematic representation of the pharmacokinetic indices defined in this study.

$T > MIC$, cumulative time when drug concentrations exceed MIC over 24 h ($T > MIC = T > MIC_1 + T > MIC_2 + T > MIC_3$); $T < MIC$, cumulative time of $T > MIC$ intermission when drug concentrations were below MIC ($T < MIC = T < MIC_1 + T < MIC_2$); $iT > MIC$, sum of $T > MIC$ and $T < MIC$.

次いで、 $iT > MIC$ と ABBC の関係进行评估したところ、投与間隔と ABBC の関係と同様に、釣鐘型を示すことが明らかとなった (Figure 37)。 $T > MIC$ が連続している 0 時間から 2 時間間隔においては、ABBC と $iT > MIC$ (= $T > MIC$) に正の相関が認められるため、これらの関係より算出した回帰直線を用いて、投与間隔が 3 時間から 8 時間における $iT > MIC$ から ABBC を外挿した。外挿値は実測値を大きく上回る値となり、その差を $\Delta ABBC$ として算出したところ (Figure 37)、 $\Delta ABBC$ と $T < MIC$ には有意な正の相関関係が確認された ($r^2 = 0.9442$, $p < 0.001$, Figure 38)。このことから、投与間隔が 3 時間以上の場合に見られる ABBC の減少には、 $T < MIC$ が関与しているものと考えられた。

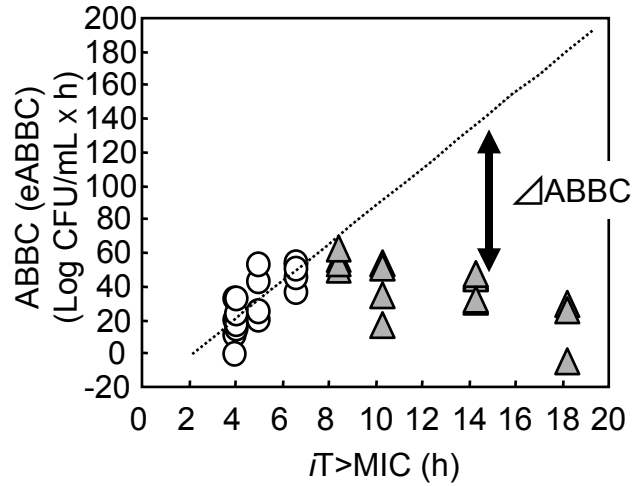


Figure 37 The relationship between ABBC and $iT>MIC$.

The relationship between ABBC and $iT>MIC$ (circles) was extrapolated to yield the differences of the regression function (dotted lines) from the actual values (triangles). The difference was termed $\Delta ABBC$.

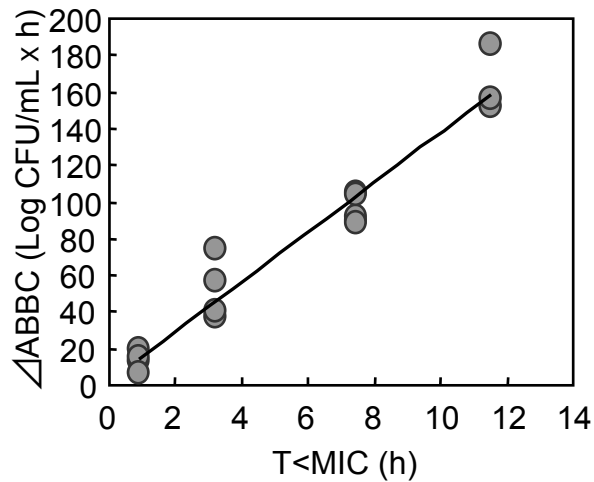


Figure 38 The relationship between $\Delta ABBC$ and $T<MIC$.

以上のことから、ABBC は正の相関を示す $iT>MIC$ と負の相関を示す $T<MIC$ を用いて描写できるのではないかと考えられた (Equation 10)。

$$\text{Equation 10 : } ABBC = a \times iT>MIC + b \times T<MIC + c$$

そこで、ABBC と投与間隔の関係について、ABBC を目的変数、 $iT > MIC$ と $T < MIC$ を説明変数として、重回帰分析を行った。その結果、ABBC の変化はこれら 2 つのパラメータを説明変数とすることで統計学的に有意に説明できること ($p < 0.001$)、 $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ のいずれも、統計学的に有意な説明変数であることが明らかとなった ($p < 0.001$)。さらに、この関係を示す式として、Equation 11 が得られた。

$$\text{Equation 11 : } ABBC = 10.92 \times iT > MIC - 13.23 \times T < MIC - 24.47$$

Equation 11 により算出された ABBC の理論値は実測値を良好に描写しており、投与間隔に基づく ABBC の変化が $iT > MIC$ と $T < MIC$ によって、推測可能であることが示された (Figure 39)。このことから、眼内炎の予防、即ち、前房内汚染に対して最適な投与間隔を定めるための指標として $iT > MIC$ と $T < MIC$ の両パラメータの有用性が示された。

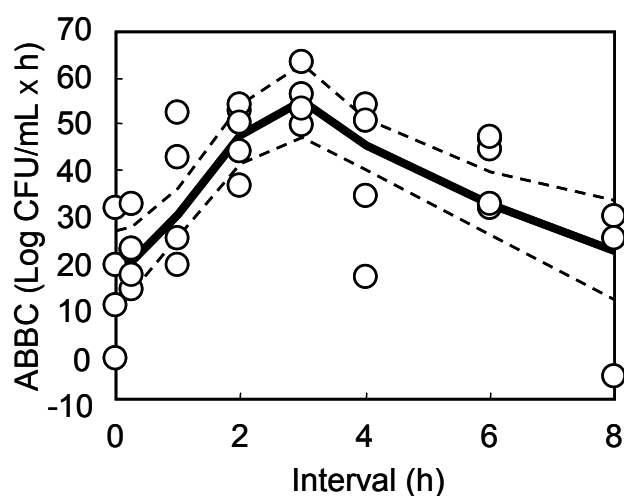


Figure 39 The relationship between the dosing interval and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *E. faecalis* A-2-7.

Individual results of ABBC (open circles) were plotted against dosing interval. The solid line represents the theoretical line obtained by multiple regression analysis described by Eq. 9: $ABBC = 10.92 \times iT > MIC - 13.23 \times T < MIC - 24.47$ ($p < 0.001$). Dotted lines represent its 95% confidence limits.

本検討において、 $T < MIC$ の増大が抗菌効果 (ABBC) の減弱につながっていることが示され、これは、眼房水中濃度が MIC 以下になることで、MIC の持続性、つまり効果の持続性が損なわれたためと考えられるが、一方でその機構の詳細は不明である。 $T < MIC$ が生じる投与間隔のうち、3 時間間隔を除いては、ガチフロキサシンを 3 回添加したときの、2 回目及び 3 回目添加後の生菌数の減少の程度が、初回添加後よりも小さい傾向にあった (Figure 29)。同様の現象が、他のキノロン系抗菌剤においても確認されており、その原因として、細菌が薬剤に対して耐性を持ったことが示唆されている⁶⁴⁻⁶⁶)。このことから、同様に、 $T < MIC$ を生じる投与間隔においては、*E. faecalis* がガチフロキサシンに耐性を持った可能性が考えられた。そこで、*in vitro* AHPK model において、生菌数の経時的変化を評価したときと同様の条件で、*E. faecalis* にガチフロキサシンを 2 時間又は 8 時間間隔で 3 回添加したときの *E. faecalis* に対するガチフロキサシンの MIC を経時的に測定したが、いずれの時点においても MIC の変化は確認されなかった。本試験条件における AUC/MIC は、耐性化が起りやすいとされている AUC/MIC よりも低いため^{67,68})、耐性化ではなく、一過性の感受性の低下が起こっていた可能性が考えられるが、詳細については、今後、更なる検討が必要であろう。

3.2 *S. aureus* に対する検討

次に、*in vitro* AHPK model の有用性並びに $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ の PK-PD パラメータとしての有用性を検証するために、*E. faecalis* A-2-7 株について行った解析法を他の菌種にも適応できるか否か、*E. faecalis* に次いで術後眼内炎の視力予後が悪いことが知られており、眼感染症の主要起因菌である *S. aureus* を用いて検討を行った。菌株は、*E. faecalis* と同様に正常ヒト結膜由来である G1449 株を選択した。ガチフロキサシンの *S. aureus* G1449 株に対する MIC は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ であった⁴⁶)。

3.2.1 薬剤非添加時の増殖曲線

初期菌数は *E. faecalis* と同じ 3×10^4 CFU/mL (4 Log CFU/mL) に設定した。初期値からの生菌数の経時的な変化を Figure 40 に示す。例数が少なく、バラツキが大きかったため、正確な増殖開始時間は確認できなかったが、24 時間では 7.4 Log CFU/mL に達することが確認できた。硝子体内に約 2 Log CFU の *S. aureus* を注入したとき、*S. aureus* の生菌数は、24 時間で 6.14 Log CFU/eye (mL) に到達することが示されており³³)、僅かな乖離はあるものの、*E. faecalis* と同様に、本モデルを用いて眼内炎に対する予防用法を検討することは妥当であると考えられた。

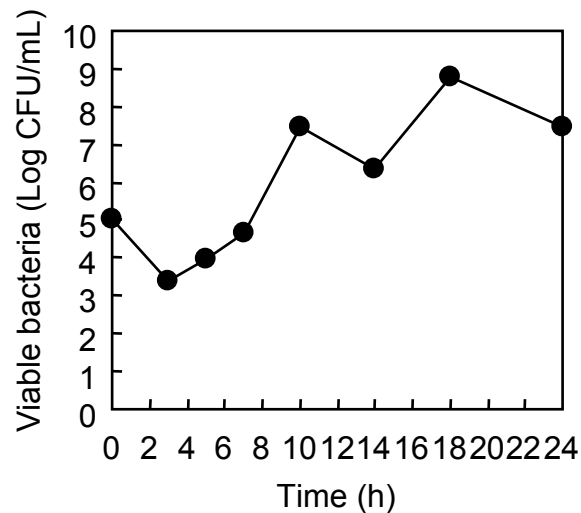


Figure 40 Growth kinetics of *S. aureus* G1449.
The data represent the mean (n = 2).

3.2.2 各種投与間隔で3回添加時の殺菌増殖曲線

3.2.2.1 初期菌数：4 Log CFU/mL

単回又は投与回数を3回に固定して投与間隔2時間又は4時間でガチフロキサシンを添加したときの生菌数の変化を評価した (Figure 41)。生菌数の初期値は5.1 Log CFU/mLであった。単回投与において、生菌数は約5時間まで減少し続けたが、その後再増殖が起こり、培養開始後14時間ではコントロールとほぼ同程度となった。一方、投与間隔2時間及び4時間においては培養開始後5時間から14時間まで定量限界値未満の値を持続した。臨床現場において、眼房水中に混入した細菌が全滅し、投与間隔の差が現れないことは問題ではないが、この条件では、*E. faecalis* でみられた投与間隔が抗菌効果に及ぼす影響及びその結果より導いたパラメータの適応可能性を正確に評価することが困難となるため、初期菌量を 3×10^7 CFU/mL に増加させて、再検討を行った。

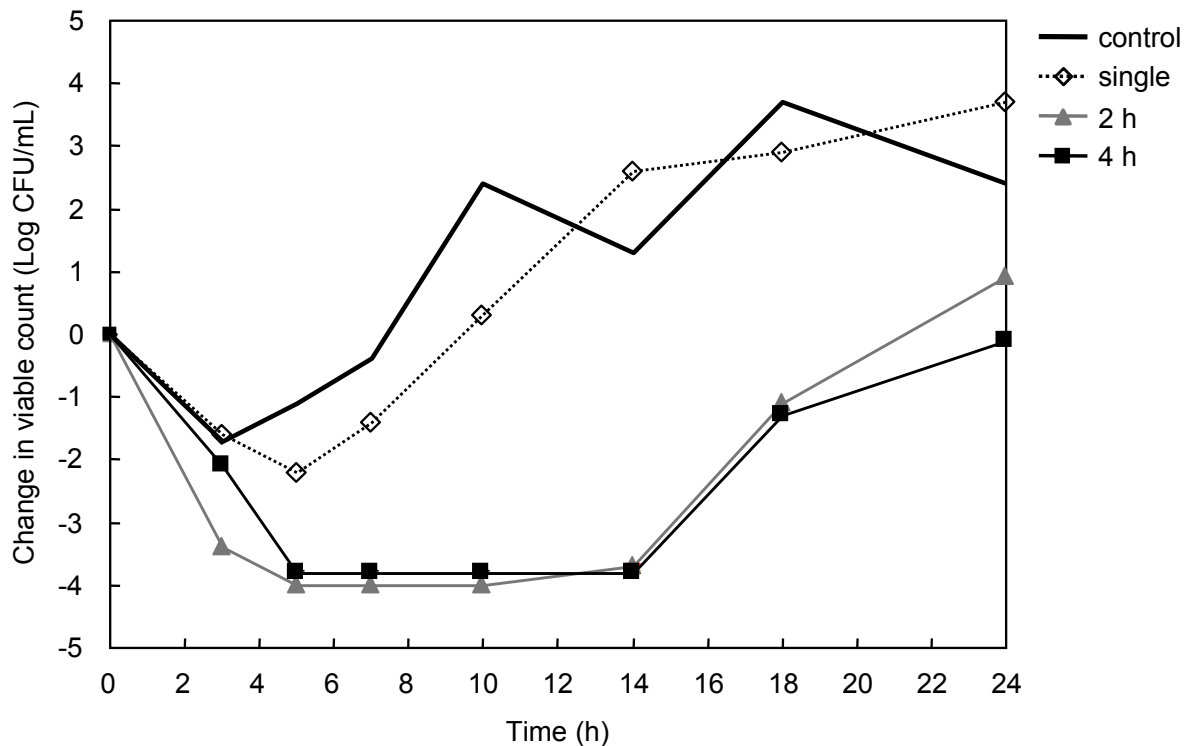


Figure 41 Killing and regrowth kinetics of *S.aureus* G1449 exposed to gatifloxacin once or three times at various intervals.

The data represent the mean. (n = 2).

3.2.2.2 初期菌数 : 7 Log CFU/mL

初期菌数を 3×10^7 CFU/mL (7 Log CFU/mL) に増加させ、投与間隔を 0.25、2、4、6 及び 8 時間として、ガチフロキサシンを、3 回添加したときの生菌数の変化を評価した。初期菌数の実測値は 7.37 ± 0.05 Log CFU/mL であった。薬剤非添加群では、初期値からの生菌数のわずかな増加が認められ、5 時間で 8.0 Log CFU/mL に達し、その後はほぼ同じ生菌数を維持した。全ての投与間隔で生菌数の減少と再増殖が認められたが (Figure 42)、0.25 時間間隔と 2 時間間隔においては、生菌数は 24 時間で薬剤非添加群と同程度に達したのに対し、4 時間以上の投与間隔では薬剤非添加群よりも低値を示した。

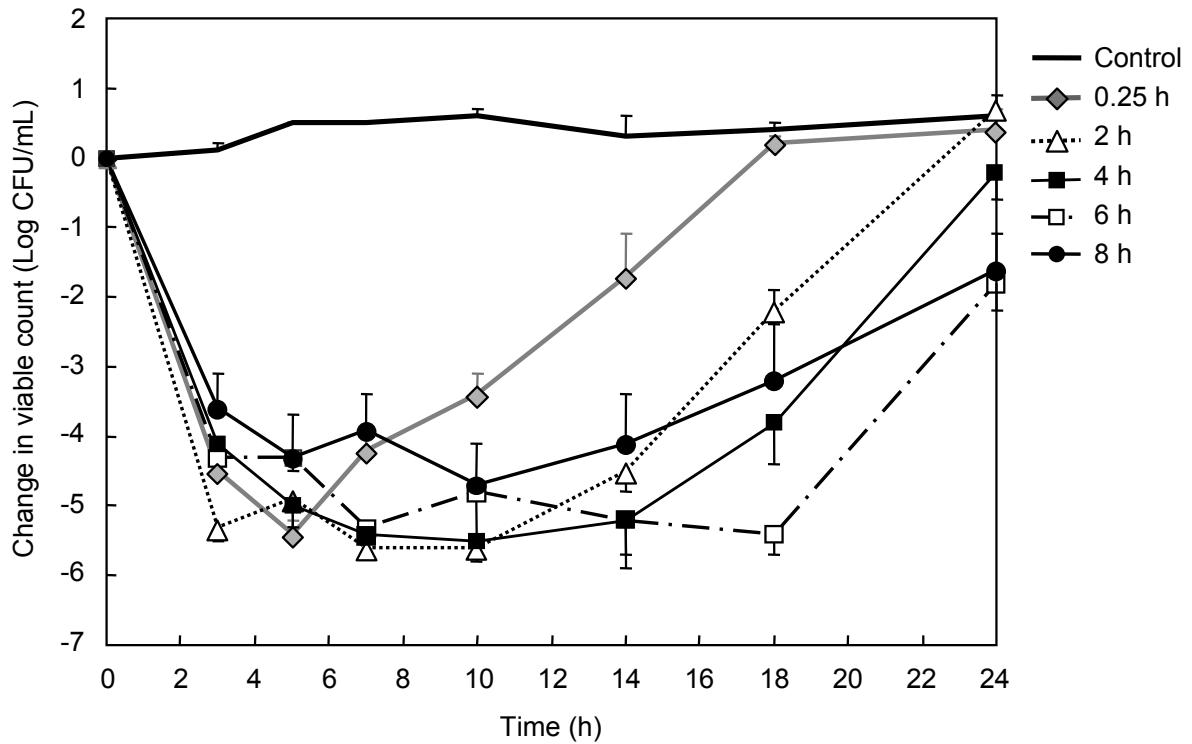


Figure 42 Killing and regrowth kinetics of *S. aureus* G1449 exposed to gatifloxacin once or three times at various intervals.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–4).

投与間隔が4時間までは、生菌数の初期値からの最大減少量 (Δ max) はほぼ等しかったが、6時間間隔及び8時間間隔では僅かに減少傾向を示した (Figure 43)。最大減少量に到達する時間 ($T\Delta$ max) は投与間隔の延長に伴って遅延する傾向が示された (Figure 44)。定量限界値未満の時点が存在したため、 Δ max 及び $T\Delta$ max のいずれも正確な傾向をとらえられていない可能性があるものの、*E. faecalis* と同様に投与間隔によって変化することが確認できた。

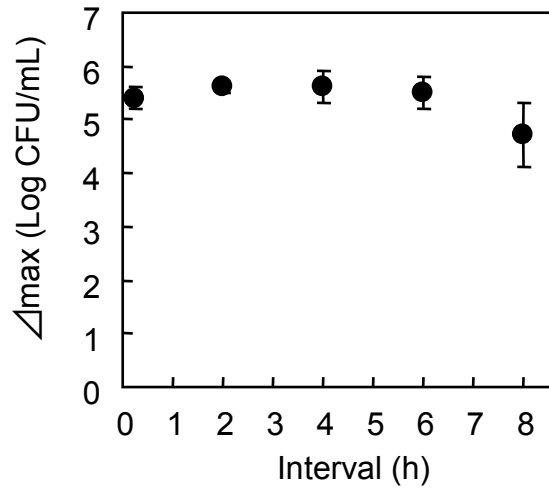


Figure 43 The relationship between dosing interval and maximum reduction in viable count (Δ_{\max}) (*S. aureus* G1449).

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–4).

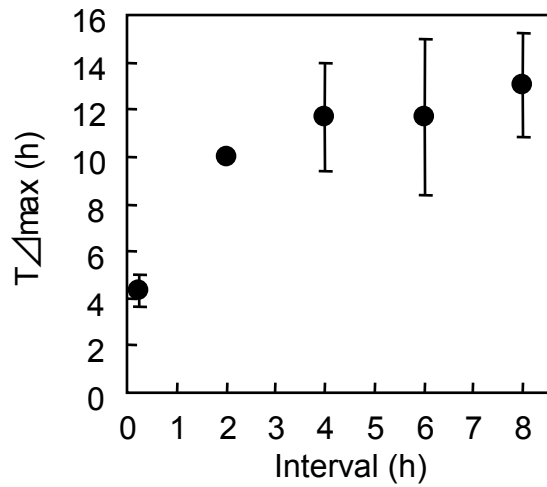


Figure 44 The relationship between dosing interval and time to reach maximum reduction of viable count (Δ_{\max}) (*S. aureus* G1449).

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–4).

3.2.3 投与間隔と抗菌効果の関係

得られた殺菌増殖曲線 (Figure 42) から、*E. faecalis* と同様に、投与間隔によって生菌数の経時的な推移が変化することが示された。そこで、ABBC を算出し、投与間隔と ABBC の関係を Figure 45 に示した。投与間隔が 0.25 時間より 6 時間までは、投与間隔の延長に伴って ABBC はなだらかに増加したが、8 時間間隔では減少に転じた。*E. faecalis* と比較すると緩やかではあるが、*S. aureus* の ABBC も *E. faecalis* と同様に、投与間隔の増加に伴って釣鐘型の推移を示すことが明らかとなった。この投与間隔と ABBC の関係について、一元配置分散分析を行った結果、投与間隔の違いが抗菌効果に対して統計学的に有意な影響を及ぼしていることが示され ($p < 0.05$)、*S. aureus* に対するガチフロキサシンの効果においても、投与回数固定時において、投与間隔が効果に有意な影響を及ぼすことが確認できた。さらに、異なる投与間隔群間で ABBC の比較を行なったところ、投与間隔 0.25 時間の ABBC に対し、投与間隔 4 時間及び 6 時間の ABBC が、統計学的に有意 ($p < 0.05$) に高値を示していることが明らかとなった。

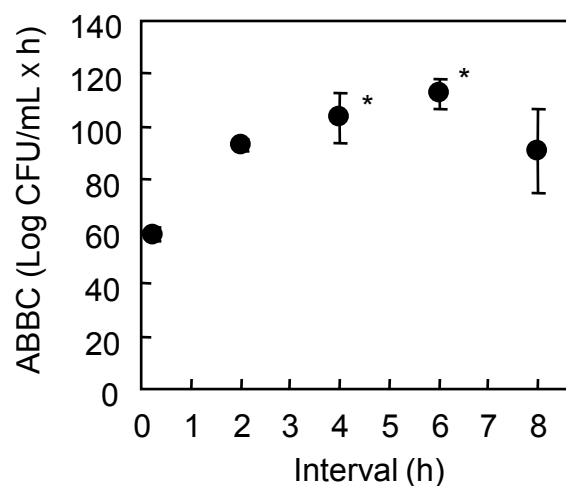


Figure 45 The relationship between the dosing interval and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *S. aureus* G1449.

The data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3-4$). *, $p < 0.05$, compared with 0.25-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided).

3.2.4 C_{max}/MIC 及び T>MIC と抗菌効果の関係

次に、各群における PK-PD パラメータ (C_{max}/MIC 及び T>MIC) と ABBC の関係性を評価した (Table 5)。ABBC と C_{max}/MIC の関係を検討した結果、ABBC は C_{max}/MIC が 7.1 でピークとなり、その後 C_{max}/MIC の増加に伴って減少することが明らかとなった (Figure 46)。単回帰分析の結果、*E. faecalis* と同様に負の相関が認められたが ($r^2 = 0.4519$, $p < 0.01$)、前述した様に、本来 C_{max}/MIC は抗菌効果と正の相関が期待されるパラメータであり、論理的に負の相関関係を説明することは困難であることから、*S. aureus* の場合においても、この負の相関関係は、見掛け上のものであり、真に影響している要因は、その背後にある別の因子であると推察された。

Table 5 PK-PD indices and antibacterial efficacy of gatifloxacin against *S. aureus* G1449 at various dosing regimens

Dosing interval (h)	PK-PD indices		ABBC (Log CFU/mL×h)
	T>MIC (h)	C _{max} /MIC	
0.25	5.91	20.70	58.94 (2.44)
2	8.65	10.90	93.17 (2.39)
4	12.43	7.70	103.16 (9.20)*
6	13.21	7.10	112.33 (5.77)*
8	13.17	7.00	90.50 (15.94)

Calculated AUC/MIC values are 57.3. ABBC values are expressed as the mean with (S.E.M.) in parentheses of 3 – 4 experiments. *, $p < 0.05$, compared with 0.25-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided).

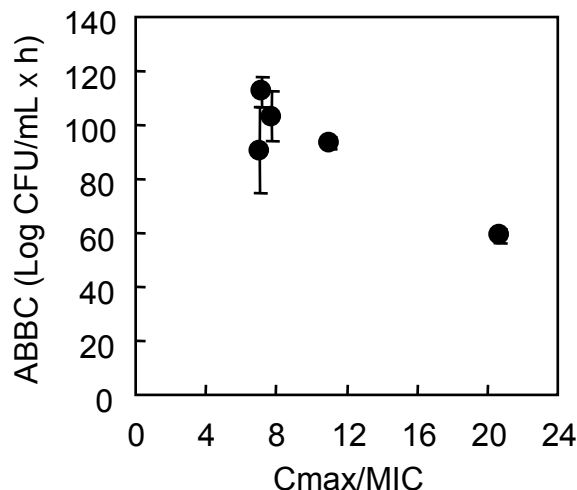


Figure 46 The relationship between Cmax/MIC and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *S. aureus* G1449.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–4).

次いで、ABBC と T>MIC の関係について単回帰分析を行った結果、統計学的に有意な正の相関関係が認められた ($r^2 = 0.3798$, $p < 0.05$, Figure 47)。しかし、T>MIC が 12 以上の場合、その相関性は大きく損なわれていることも同時に示された。これは、*E. faecalis* の場合においても認められた傾向であった。

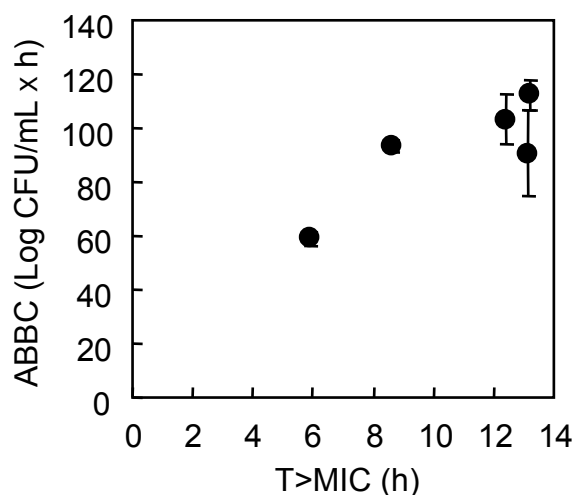


Figure 47 The relationship between T>MIC and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *S. aureus* G1449.

The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 3–4).

3.2.5 $iT>MIC$ 及び $T<MIC$ と抗菌効果の関係

次に、 $T>MIC$ が連続している投与間隔 0.25 から 4 時間までの $T>MIC$ と ABBC の関係を解析したところ、両者には高い相関関係が認められた ($r^2 = 0.7210$, $p < 0.01$)。相関係数は、先に示した全ての投与間隔で得られた $T>MIC$ と ABBC の関係 (Figure 47) よりも高いものであり、この傾向も Figure 34、Figure 35 で示した *E.faecalis* で得られた結果によく類似したものであった。そこで、 $iT>MIC$ 及び $T<MIC$ を算出し (Table 6)、上記、投与間隔 0.25 時間から 4 時間まで ($iT>MIC = T>MIC$) の相関関係解析より得られた回帰直線を用いて、6 時間間隔及び 8 時間間隔の ABBC を外挿した (Figure 48)。2 つの投与間隔のみであるため、正確な相関関係は評価できなかったが、算出した外挿値と実測値の差 (Δ ABBC) は、 $T<MIC$ の延長に伴い、増加する傾向を示した (Figure 49)。

Table 6 PK-PD indices and antibacterial efficacy of gatifloxacin against *S. aureus* G1449 at various dosing regimens

Dosing interval (h)	PK-PD indices				ABBC	
	$T>MIC$ (h)	$iT>MIC$ (h)	$T<MIC$ (h)	C_{max}/MIC	(Log CFU/mL×h)	
0.25	5.91	5.91	0.00	20.70	58.94	(2.44)
2	8.65	8.65	0.00	10.90	93.17	(2.39)
4	12.43	12.43	0.00	7.70	103.16	(9.20)*
6	13.21	16.39	3.18	7.10	112.33	(5.77)*
8	13.17	20.39	7.22	7.00	90.50	(15.94)

Calculated AUC/MIC values are 57.3. ABBC values are expressed as the mean with (S.E.M.) in parentheses of 3 – 4 experiments. *, $p < 0.05$, compared with 0.25-h dosing interval (Dunnett's test, 2-sided).

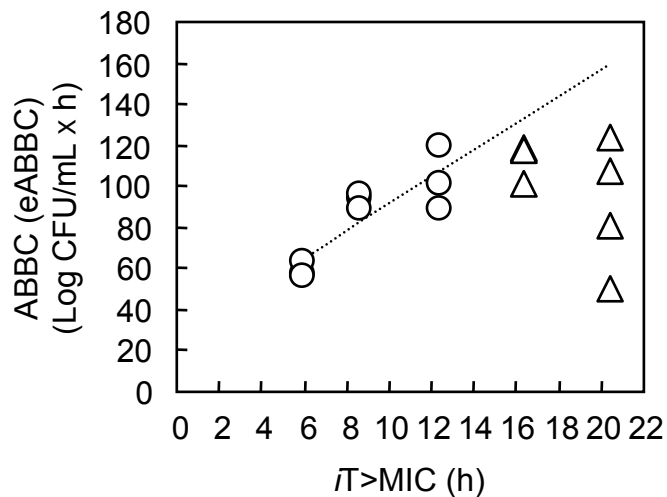


Figure 48 The relationship between ABBC and $iT > MIC$.

The relationship between ABBC and $iT > MIC$ (circles) was extrapolated to yield the differences of the regression function (dotted lines) from the actual values (triangles). The difference was termed $\Delta ABBC$.

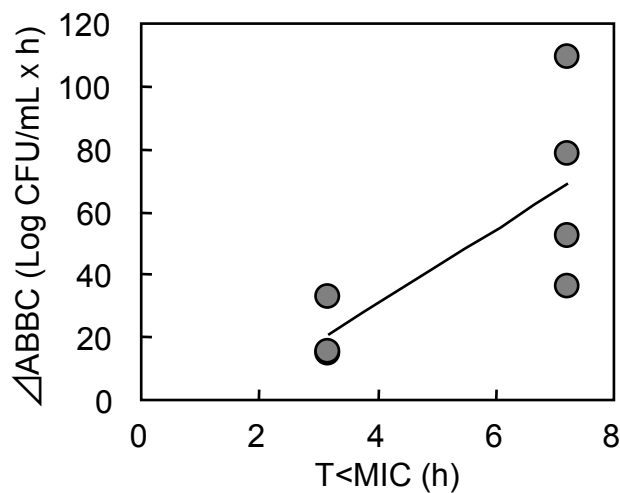


Figure 49 The relationship between $\Delta ABBC$ and $T < MIC$.

そこで、ABBC と投与間隔の関係について、ABBC を目的変数、 $iT > MIC$ と $T < MIC$ を説明変数として重回帰分析を行った結果、ABBC の変化は $iT > MIC$ と $T < MIC$ を説明変数とすることで有意に説明できること ($r^2 = 0.4863$, $p < 0.05$)、 $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ は、統計学的に有意な説明変数であることが確認できた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。さらに、この関係を示す式として、Equation 12 が得られた。

Equation 12 : $ABBC = 7.21 \times iT > MIC - 10.51 \times T < MIC + 21.35$

また、Equation 12により算出した ABBC の理論値は実測値を良好に描写するものであり、投与間隔に基づく ABBC の変化が $iT > MIC$ と $T < MIC$ によって、推測可能であることが示された。このことは、*E. faecalis* で認められた *in vitro* AHPK model の有用性、及び PK-PD パラメータとしての $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ の有用性が *S. aureus* においても認められたことを示しており、本解析法の妥当性、応用性が示された (Figure 50)。

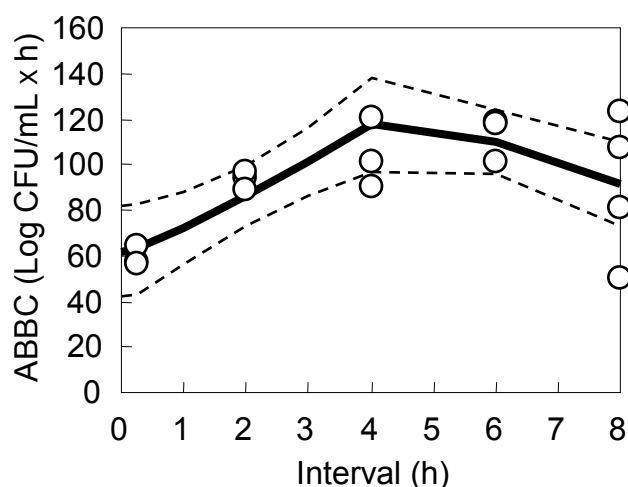


Figure 50 The relationship between the dosing interval and antimicrobial effect (ABBC) of gatifloxacin against *S. aureus* G1449.

Individual results of ABBC (open circles) were plotted against dosing interval. The solid line represents the theoretical line obtained by multiple regression analysis described by eq. 10: $ABBC = 7.21 \times iT > MIC - 10.51 \times T < MIC + 21.35$ ($p < 0.05$). Dotted lines represent the 95% confidence limits.

3.3 考察

抗菌剤の評価のために様々な動物を用いた感染モデルが構築されているが、動物モデルの場合、組織中薬物濃度推移や免疫反応がヒトと異なる可能性がある。特に、健常動物を用いたモデルでは、免疫反応による殺菌効果が加わるため、効果を過大評価する可能性が考えられる。これは、第1章で行った *in vivo* ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいては、接種24時間後の菌量は、初期値と同程度であったのに対し、*in vitro* AHPK model における *E. faecalis* の検討では、いずれの投与方法においても24時間後の生菌数が初期値よりも増加したことからも裏

付けられる (Figure 29)。また、免疫だけでなく、第1章で述べた通り、前房においては、眼房水の排出とともに細菌が眼外へ排出される可能性が考えられるが、実際にはこれらの生体反応が正常に機能していない可能性がある。従って、感染後の病態により、免疫等も含めた生体機能が正常に動作していない状況を想定して評価することが、より正確で、効果的な治療につながると考えられる。そのため、*in vitro* AHPK model を用いることで、そのような生体機能に左右されることなく、純粋に薬剤が持つ抗菌効果のみを評価し、有効な用法の決定を可能とすると考えられる。

E. faecalis 及び *S. aureus* に対するガチフロキサシンの効果 (ABBC) は、投与間隔に対して3時間又は4時間でピークを迎え、その後減少するという釣鐘型を示した。一般に、キノロン系抗菌薬の殺菌作用は C_{max}/MIC に依存することが報告されている^{64,66,69-71)}。しかし、本研究で用いたいずれの菌においても、ABBC は C_{max}/MIC とは負の相関を示し、生菌数の減少と C_{max}/MIC の間に、論理的な相関関係は確認できなかった (Figures 33 and 46)。 C_{max}/MIC が7以下においては、 C_{max}/MIC と効果の関連性は見出し難いことが報告されており^{2,69)}、*E. faecalis* においては、 C_{max}/MIC の範囲が1.81–5.40と、この条件に当てはまるため、 C_{max}/MIC と効果の関係性が明確でなかった可能性が考えられる。しかしながら、*S. aureus* においては、 C_{max}/MIC の範囲が7.0–20.7であり、十分に C_{max}/MIC と効果の間に正の相関が期待できるものであった。MacGowan ら⁷¹⁾ は、*in vitro* model を用いて C_{max}/MIC が殺菌速度、 $T > MIC$ が再増殖の開始時間に関与することを示しており、再増殖が起こるモデルでは ABBC に対する $T > MIC$ の影響が大きくなることを考察している。*In vitro* AHPK model においても、再増殖が生じるために ABBC には C_{max}/MIC よりも $T > MIC$ 影響が影響したものと考えられた。一方、Coyle ら⁷²⁾ は、ガチフロキサシンを含む様々なキノロン系抗菌薬において、 AUC/MIC が31.7、 C_{max}/MIC が3.1を超えるときに、*S. pneumoniae* の再増殖を抑制できることを示している。また、Lister ら⁷³⁾ は、 AUC/MIC が44、 C_{max}/MIC が5のとき、複数のキノロン系抗菌薬が *S. pneumoniae* を完全に死滅させることを報告している。さらに、*S. aureus* に対しては、Blaser ら⁶⁴⁾ によって、 C_{max}/MIC が2以上のときに (AUC/MIC は不明)、再増殖を抑制できることが報告されている。*In vitro* AHPK model において、ガチフロキサシンの *S. aureus* に対する PK-PD パラメータは、これらの条件に当てはまっているにも関わらず (AUC/MIC : 57.3, C_{max}/MIC : 7.0–20.7)、全ての投与間隔で再増殖が認められた。この再増殖が認められた原因を明らかにするために、これら既報^{72,73)}の濃度推移と *in vitro* AHPK model で再現した濃度推移を比較したところ、*in vitro* AHPK model における消失 ($T_{1/2}$: 約1時間) は、これらの報告における消失 ($T_{1/2}$: 約3–8時間)^{74,75)}と比較して、明らかに速いことが確認できた。また、

in vitro AHPK model で再現した濃度推移の消失は、経口投与後の血漿中からの消失 ($T_{1/2}$: 約 5–8 時間)⁷⁶⁻⁸²⁾と比較しても速いことが明らかである。これらのことから、点眼投与後の眼房水中ガチフロキサシン濃度の消失が経口投与後の血漿中濃度の消失と比較して速いことが、眼房水中でのガチフロキサシンの抗菌効果と C_{max}/MIC が論理的な相関を示さない原因であると推察された。つまり、消失が速いと、薬物濃度が MIC 以下になる確率が上がるとともに濃度が MIC を下回る時間 ($T < MIC$) が長くなるために、細菌の再増殖が発生し、効果の低下につながる。そのため、効果は、 C_{max}/MIC ではなく、再増殖に影響を与えると考えられる $T > MIC$ に関連したパラメータである $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ の影響を受けたものと考えられた。

先に述べた通り、他のキノロン系抗菌点眼剤を点眼投与したときの眼房水中濃度推移は、ガチフロキサシンを点眼投与したときの眼房水中濃度推移とほぼ等しいことから^{57,58)}、今回得られた投与間隔と効果の関係及び効果に関与する PK-PD パラメータ理論は、少なくとも他のキノロン系抗菌点眼剤にも適応できるものと推察される。しかしながら、本研究において算出した理論式の問題点として、 C_{max}/MIC が組み込まれていないことが挙げられる。本試験では、術後眼内炎を模擬するために眼房水中濃度を模擬するモデルを用いて検討したが、眼組織はその部位によって濃度推移が大きく異なる^{34,83,84)}。例えば、角膜や結膜などの前眼部組織の消失は、眼房水と比較して非常に緩やかである^{85,86)}。加えて、これらの組織における AUC や C_{max} は非常に高く、角膜は AUC 及び C_{max} のいずれも眼房水の約 20–30 倍となる^{83,84)}。このような濃度推移を示す組織においては、どのような投与間隔で投与した場合にも、 MIC 以上の濃度を維持でき、 $T < MIC$ が存在しないと考えられることから、一般的に報告されているように、ガチフロキサシンの抗菌効果は、 $T > MIC$ よりも C_{max}/MIC に強く影響されると推察される。このように、本理論式は点眼投与された抗菌剤の前房内 (眼房水) における抗菌効果の推定に適用可能であるが、その他の部位における効果の推定にも適用可能とするためには、今後、 C_{max}/MIC 等の濃度に関するパラメータを組み込む必要があると考えられる。

本試験で用いた細菌はいずれもグラム陽性菌の正常ヒト結膜由来株であるが、*in vitro* AHPK model で得られた殺菌増殖曲線より算出したそれぞれの世代時間は、*S. aureus* が約 35 分、*E. faecalis* が約 47 分と、わずかではあるが *E. faecalis* の方が長かった。さらに、培養開始後 24 時間における最高生菌数は、*S. aureus* が約 8.0 Log CFU/mL であり、*E. faecalis* の方が 9.3 Log CFU/mL と多かった。いずれの差も僅かではあるが、このような相違点があるにも関わらず、ガチフロキサシンの抗菌効果は、いずれの細菌に対しても投与間隔に対して釣鐘型を示し、さらには同じ PK-PD パラメータによって説明可能であった。このことから、このような細菌の増殖に関わる性質の違いは、今回導いた理論に影響しないと推察された。つまり、

これらの相違点にかかわらず、他の類似する細菌に対して、本理論は適応可能と考えられた。グラム陽性菌とは比較的性質の異なるグラム陰性菌においては、追加検討が必要であると考えているが、グラム陰性菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*: *P. aeruginosa*) にガチフロキサシンを一定濃度曝露したときの殺菌増殖曲線は *S. aureus* に同様の処理をした場合に類似していることから⁸⁷⁾、同様に $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ により効果を評価、推定できる可能性があると考えている。

投与間隔の設定に関して、術後の予防的投与の場合、標的とすべき菌の MIC が不明であることが、本理論を臨床に適応するための課題となる。眼内炎の起因菌は眼表面に存在する常在菌との相関関係が認められていることから^{18,21,22)}、例えば、術前にその患者が眼表面に保持している常在菌の MIC を測定し、投与間隔を決定することが有効であろう。可能であれば菌種も特定し、眼内炎発症後の視力低下リスクの高い菌を優先的に標的 MIC に設定することができれば、より有効な予防・治療につながると考えられる。しかし、施設によってはそのような測定が困難である場合が考えられ、そのような場合には、 MIC_{50} や MIC_{90} のような疫学的統計量を用いる必要があるだろう。しかし、実際に標的とすべき MIC よりも高い MIC を指標として評価した場合、 $iT > MIC$ は短く、 $T < MIC$ は長く見積もられることになる。したがって、これらを基に算出される至適な投与間隔は、実際に適した投与間隔よりも短い値を提示することとなる。MIC は対数正規分布するため、 MIC_{90} に近似した MIC を示す株が分離される確率は、 MIC_{50} に近似した MIC を示す株が分離される確率よりも低い。そのため、仮に MIC_{90} を指標とし、投与设计を立てると、実際に感染している菌を静菌・殺菌できない可能性が高くなると考えられる。そのため、本研究結果のように効果とパラメータ (投与間隔) の関係が釣鐘型の場合に投与間隔を求めるにあたっては、分布の中心であり、分離頻度が高くなる MIC_{50} が有用であると考えられる。本試験で用いた株に対するガチフロキサシンの MIC は、各菌種の MIC_{50} の文献値とほぼ等しい^{19,87,88)}。さらに、*E. faecalis* 及び *S. aureus* はいずれも視力予後の悪い術後眼内炎の起因菌であることが知られていることから、MIC の測定及び菌種の同定が不可能な場合に、術後眼内炎による視力低下を予防する方法として、今回の検討結果は臨床的に利用価値のあるものと考えられる。ただし、今後の課題としては、今回用いた MIC 以外の MIC においても同様の理論が適用できるか否かを検討する必要があると考える。

ガチフロキサシン点眼液においては、点眼投与後の眼房水中濃度推移が明らかとなっているため、 $iT > MIC$ や $T < MIC$ を導くことは、上述の通り MIC さえ設定できれば容易である。一方で、両細菌共に、 $T < MIC$ が効果を減少させること、 $iT > MIC$ が連続することで効果が増強されることが示されており、投与間隔と効果の関係は、単回投与時の $T > MIC$ (以下、

T>MICquaque die : T>MICqd) とほぼ等しい投与間隔を頂点として釣鐘型を示した (Figures 30 and 39)。つまり、投与間隔が T>MICqd よりも短縮することにより連続している $t > MIC$ は短縮され、また、投与間隔が T>MICqd よりも延長することにより $T < MIC$ が生じ、いずれの場合においても ABBC は低下する。これらのことから、ABBC は下記の様にも表すことが可能である。

Equation 13 : $ABBC \propto -|\text{interval} - T > MICqd|$

この簡易な数式は、臨床現場において速やかに投与間隔を設定するために、Equation 10 及び Equation 12 と同様に有用性が高いと考えられる。

最後に、近年、術後眼内炎の視力予後に、菌の存在ではなく菌の産生する毒素等が影響している可能性が示されている³⁵⁾。In vitro AHPK model を用いることで、細菌の経時的な変化と同時にこれら毒素の評価も可能となることから、今後は投与間隔と毒素の関係にも着目し、その影響を解析することが重要であると考えられる。

結論

以上、著者は三章にわたり、白内障術後眼内炎に対するガチフロキサシン点眼液の予防用法の最適化及び前房内汚染に対するガチフロキサシン点眼液の効果に關与する PK-PD パラメータの解析を目的とした基礎的研究を行い、以下の結論を得た。

ウサギ腸球菌眼内炎モデルにおいて、接種から点眼投与開始までの時間が短いほど、ガチフロキサシン点眼液の前房及び硝子体内の細菌に対する抗菌効果及び炎症症状の抑制効果は高く、細菌混入後、早期より点眼投与を行うことの重要性が示された。さらに、前房内汚染に対するガチフロキサシン点眼液の効果は、投与回数、すなわち、AUC/MIC に影響を受けることが示された。

ウサギに 0.3%ガチフロキサシン点眼液を 50 μ L 点眼投与した後の眼房水中ガチフロキサシン濃度を模擬する *in vitro* aqueous humor pharmacokinetic model の構築に成功した。本モデルにより、単回投与のみならず、反復投与後の眼房水中濃度推移を理論通りに再現できることが明らかとなった。

In vitro aqueous humor pharmacokinetic model を用いて、ガチフロキサシンの *E. faecalis* 及び *S. aureus* に対する効果を評価した結果、投与回数 (AUC) を一定とした条件において、ガチフロキサシンの抗菌効果 (ABBC) は、投与間隔の影響を受けて変化し、投与間隔に対して釣鐘型を示した。また、投与間隔による ABBC の変化は、 C_{max}/MIC では説明できず、 $T > MIC$ に關連する新規パラメータである $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ により推測可能であることが示された。

以上、本研究結果より、前房内汚染に対するガチフロキサシン点眼液の点眼投与において、AUC/MIC が一定のとき、投与間隔が効果に大きな影響を与えること、新たに定義した $iT > MIC$ 及び $T < MIC$ が新規パラメータとして有用であることを異なる 2 種の菌種において証明することができた。本研究で得られた結果は、ガチフロキサシン点眼液による白内障術後眼内炎の発症予防、さらには、投与条件が制限される点眼投与による他の感染症治療の最適化において、有用な情報を提供するものと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導及び御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部・檜垣 和孝 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成に際して、有益なる御助言と御校閲を賜りました岡山大学薬学部・勝 孝 教授、合葉 哲也 准教授、並びに須野 学 准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

また、有益なる御助言及び御指導を賜りました岡山大学薬学部・大河原 賢一 准教授に衷心より感謝致します。

本研究の機会を与えてくださり、多くの御助言及び御指導を賜りました千寿製薬株式会社専務取締役 山村 文雄 氏、研究本部 本部長 東 光佳 博士、副本部長 大鳥 聡 博士、安全性研究室 室長 榊 秀之 博士に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益なる御助言及び御協力を賜りました愛媛大学医学部・大橋 裕一 教授 並びに 鈴木 崇 助教に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大な御指導及び御協力を賜りました千寿製薬株式会社 開発研究所 所長 徳重 秀樹 博士、喜田 徹郎 氏、多鹿 哲也 博士に深く感謝致します。

また、有益なる御助言及び御協力を賜りました千寿製薬株式会社 山本 悟史 氏、福士 国弘 氏に深く感謝致します。

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、終始大変丁寧な御指導及び熱心な議論をしてくださいました千寿製薬株式会社 和田 智之 博士に深く感謝致します。

実験に御協力くださいました千寿製薬株式会社 坂根 由利子 氏、樽井 毅 氏、多大な御理解と温かい御協力をくださいました千寿製薬株式会社 薬物動態グループ 研究員の皆様、並びにコーベクリエイティブセンターの皆様に、心より感謝致します。

最後に、終始健康に留意し、温かく見守ってくれた家族に感謝致します。

実験の部

第 1 章 実験の部

1.1 検体

ガチフロ[®]0.3%点眼液 (0.3%ガチフロキサシン点眼液) (千寿製薬 (株))

1.2 菌株

Enterococcus faecalis (ヒト正常結膜由来 A-2-7 株) を使用した。ガチフロキサシンの MIC は 0.39 µg/mL (寒天平板法) であった⁴⁶⁾。

1.3 BHI 液体培地

Brein Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson and Company) を 37 g/L となるように秤量し、精製水と混合した後、オートクレーブ (120°C, 20 min) にて滅菌した。滅菌終了後は冷蔵保存した。

1.4 滅菌生理食塩液の調製

塩化ナトリウム (ナカライテスク (株)) を 0.9%になるように秤量し、精製水で溶解した後、オートクレーブ (120°C, 20 min) にて滅菌した。滅菌終了後は冷蔵保存した。

1.5 接種菌液の調製

BHI 液体培地 10 mL に、血液寒天培地で培養した菌株を 1-µL loop 植菌した。植菌した液体培地を 37°C で約 18 時間培養した後、遠心 (3000 rpm, 10 min) した。上清を除去した後、滅菌生理食塩液で洗浄し、この洗浄操作を 2 回繰り返した。滅菌生理食塩液で希釈して、約 2×10^5 CFU/mL を目標として再懸濁し、接種菌液を調製した。接種菌液は接種まで氷水中に保存した。接種菌液 0.1 mL を BHI 寒天培地に塗布し、恒温器 (35°C) で 24 時間培養した後に生菌数を測定した。

1.6 動物

北山ラベス (株) で生産された日本白色種ウサギ (雄性) を用いた。

1.7 腸球菌眼内炎モデルの作製

動物にあらかじめ5%塩酸ケタミン(ケタラール[®]50、三共(株))及び2%塩酸キシラジン(セラクター[®]2%注射液、バイエルメディカル(株))の等量混合液を筋肉内投与(1 mL/kg)し、全身麻酔を施した。ウサギの右眼前房より眼房水を約0.1 mL吸引除去した後、続いて菌液50 µL(約 2×10^4 CFU)を接種した。なお、眼房水の吸引除去及び菌液の接種には、30Gのディスポーザブル注射針を装着した1 mLディスポーザブルシリンジを用いた。

1.8 投与

マイクロピペットを用いて検体50 µLを点眼した。

1.9 眼検査

細隙灯顕微鏡(SL-14, 興和(株))を用いて、接種6、24、48、72及び96時間後に観察し、採点した(1.2.1項においては、接種24時間後のみ)。

1.10 生菌数の測定

接種24又は96時間後に、過剰のペントバルビタール(ネンブタール[®]、大日本製薬(株))を静脈内に投与して安楽死させ、クリーンベンチ内で右眼の前房内容物(眼房水及び滲出物)及び硝子体内内容物を採取した。各内容物に滅菌生理食塩液を加えて、前房内容物は3.0 mL、硝子体内内容物は5.0 mLとした。攪拌後、1000 rpmにて5分間遠心して、上清を原液とした。各原液を段階希釈後、原液及び希釈液をエンテロココセル寒天培地に塗布(0.1 mL)し、37°Cの恒温器で培養後、発育したコロニーをカウントした。

1.11 データの算出及び取り扱い

データは、Microsoft Excel 2000にて算出した。

1.12 統計解析

SAS前臨床パッケージ(Version 5.0、Release 8.2、SAS Institute Japan)を使用した。群間の比較はSteel検定(片側、有意水準5%)を行った。

第 2 章 実験の部

2.1 点眼投与後の眼房水中ガチフロキサシン濃度測定

2.1.1 検体

ガチフロ[®]0.3%点眼液 (0.3%ガチフロキサシン点眼液)(千寿製薬 (株))

2.1.2 標準物質

ガチフロキサシン水和物 (杏林製薬 (株))

2.1.3 検量線用標準溶液の調製

ガチフロキサシンを 100 µg/mL になるように移動相 (2.1.8) に溶解し、さらに 0.9–5000 ng/mL となるように移動相で希釈した。

2.1.4 使用動物

北山ラベス (株) で生産された日本白色種ウサギ (雄性) を用いた。

2.1.5 投与

マイクロピペットを用いて検体 50 µL を点眼した。

2.1.6 眼房水採取

単回投与後 15 分、30 分、1、2、4 及び 8 時間後に、0.4%塩酸オキシブプロカイン点眼液 (ベノキシール点眼液、参天製薬 (株)) を 1 滴点眼投与して局所麻酔を施した。その後、27G のディスポーザブル注射針を取り付けた 1 mL のディスポーザブルシリンジを用いて経角膜的に眼房水を採取した。

2.1.7 HPLC 測定試料の調製

採取した眼房水はフィルター (0.45 µm, Millex-HV, Millipore) で濾過し HPLC 試料とした。ただし、投与後 30 分から 2 時間に採取した眼房水については生理食塩液 ((株) 大塚製薬工場) で 5–10 倍希釈した。

2.1.8 HPLC 分析条件

HPLC システムはいずれも (株) 島津製作所製を使用した。

インターフェース :	CBM-10A
ポンプ :	LC-10AD
オートサンプラー :	SIL-10A
サンプルクーラー :	SAMPLE COOLER S
カラムオーブン :	CTO-10AC
検出器 :	RF-10AXL
デガッサ :	DGU-14A

以下の条件で測定した。

カラム	Shim-pack CLC-ODS、4.6 mm I.D. × 250 mm
カラム温度	50°C
流速	1.0 mL/min
移動相	アセトニトリル/0.04 M リン酸水溶液 (20:80、v/v)
サンプルクーラー	4°C
励起波長 (Ex) 及び蛍光波長 (Em)	Ex 280 nm、Em 495 nm

2.2 *In vitro* AHPK model の構築及び濃度測定

2.2.1 *In vitro* AHPK model の作製

全ての材料は作成後又は使用前に、70%エタノールに浸した後、12 時間以上 UV 照射して滅菌し、Figure 24 の通り、組み立てた。培地は DMEM/F-12 (Invitrogen) を用いた。

2.2.2 添加薬液の調製

ガチフロキサシンは 191 µg/mL になるように生理食塩液に溶解し、0.22 µm のフィルター (Millipore® GV, Millipore) にて濾過滅菌した。

2.2.3 薬液添加及びサンプリング

薬液添加ポート (Figure 24、A) からカテラン針を装着した 100 µL マイクロシリンジで 191 µg/mL の添加薬液を単回又は 3 回 (15 分間隔及び 2 時間間隔) で 35 µL 添加した。薬物希釈セル (B) と培養セル (D) 間を繋ぐチューブの容量により、薬物希釈セルに添加した薬物が、培養セルに移行するまでに約 17 分間かかったため、薬剤添加後 17 分を評価開始時間とした。

濃度測定用試料はサンプリングポート (Figure 24、C) より、カテラン針を装着した 1 mL ディスポーザブルシリンジで経時的に約 50 μ L 採取した。採取時点は、単回投与では 0.5、1、2、3、4、5 及び 6 h、15 分間隔反復投与では 0.5、1.25、2、3、5 及び 8 h、2 時間間隔反復投与では 0.5、1、2.75、4.2、4.75、6、8 及び 12 h とした。

2.2.4 濃度測定

2.2.4.1 検量線用標準溶液の調製

添加薬液 (2.2.2) を DMEM/F-12 (Invitrogen) で 5–1000 ng/mL となるように希釈した。

2.2.4.2 HPLC 分析条件

2.1.8 項と同様に実施した。

2.3 データ及びパラメータの算出、取り扱い

データ及びパラメータは、それぞれ Microsoft Excel 2000 又は 2003 にて算出した。PK パラメータの算出は Winnonlin (version. 2.1、Pharsight)を使用した。

2.4 統計解析

JMP 9.0 software (SAS Institute) を使用し、実測値と理論値の相関評価には、直線回帰を用いた。

第 3 章 実験の部

3.1 *In vitro* AHPK model の作製

2.2.1 項と同様に組み立てた。

3.2 菌株

Enterococcus faecalis (ヒト正常結膜由来 A-2-7 株) 及び *Staphyrococcus aureus* (ヒト正常結膜由来 G1449 株) を使用した。これら菌株に対するガチフロキサシンの MIC はそれぞれ 0.39 µg/mL 及び 0.10 µg/mL (寒天平板法) であった⁴⁶⁾。

3.3 BHI 寒天培地の調製

Brein Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson and Company) を 37 g/L、寒天 (和光純薬工業 (株)) を 15 g/L となるように秤量し、精製水と混合した後、オートクレーブ (120°C, 20 min) にて滅菌した。滅菌終了後は、約 50°C に加温した水浴中で保存し、24 時間以内に使用した

3.4 菌液の調製

ウマ血液寒天培地で培養した *E. faecalis* 又は BHI 寒天培地で培養した *S. aureus* のコロニーを 1-µL loop で採取し、10 mL の BHI 液体培地 (1.3) に植菌した。恒温振とう機にて 37°C、150 rpm で一晩培養した菌液の吸光度を測定し、菌液濃度を算出した。滅菌生理食塩液で約 3×10^6 CFU/mL (*E. faecalis* 及び *S. aureus*) 又は約 3×10^9 CFU/mL (*S. aureus*) を目標として希釈したものを添加菌液とした。

3.5 菌液添加

サンプリングポート (Figure 24、C) よりカテラン針を装着した 100 µL のマイクロシリンジで 35 µL の菌液を添加した。

3.6 添加薬液の調製

2.2.2 と同様に実施した。

3.7 薬液添加

薬液添加ポート (Figure 24、A) からカテラン針を装着した 100 µL マイクロシリンジで

191 µg/mL の添加薬液 35 µL を 1 回又は 3 回添加した。3 回添加時の投与間隔は、*E. faecalis* では 0.25、1、2、3、4、6 及び 8 時間、*S. aureus* では 0.25、2、4、6 及び 8 時間とした。さらに、*E. faecalis* では 3 回添加時の 0 時間間隔群として、573 µg/mL の添加薬液を 1 回添加した。

3.8 サンプルング

試料はサンプルングポート (Figure 24、C) より、カテラン針を装着した 1 mL ディスポーザブルシリンジで 0、3、5、7、10、14、18 及び 24 時間に採取した。

3.9 生菌数測定

3.9.1 *E. faecalis*

試料を滅菌生理食塩液で適宜希釈し、希釈した試料 1 mL と BHI 寒天培地 10 mL を混釈した。37°C で一晩以上培養した後にコロニーをカウントし、生菌数を算出した。生菌数の変化率は、初期生菌数からその時点における生菌数を引いて算出した。

3.9.2 *S. aureus*

試料を滅菌生理食塩液で適宜希釈し、希釈した試料 20 µL を BHI 寒天培地上に滴下した。37°C で一晩以上培養した後にコロニーをカウントし、生菌数を算出した。生菌数の変化率は、*E. faecalis* と同様に算出した。

3.10 MIC の測定

3.8 と同様にこの方法で、コントロール群より 0、8、16 及び 24 時間に、2 時間間隔投与群より 16 及び 24 時間、8 時間間隔投与群より 8、16 及び 24 時間にサンプルングを行った。適量の滅菌生理食塩液で菌液中の薬剤を洗浄し、日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法に準じて測定及び判定を行った⁸⁹⁾。

3.11 データ及びパラメータの算出及び取り扱い

データ及びパラメータは、それぞれ Microsoft Excel 2000 又は 2003 にて算出した。

3.11.1 T>MIC の算出

Microsoft Excel 2003 のソルバー機能により、Equations 5-7 を用いて算出された濃度が各菌株の MIC となる時間を算出し、MIC 以上の濃度を維持する時間を T>MIC とした。

3.11.2 ABBC の算出

各時点の生菌数の変化比から、台形法を用いて24時間における生菌数の総変化量を算出し、コントロール群と薬剤添加群の相変化量の差を ABBC とした。

3.12 統計解析

JMP 9.0 software (SAS Institute) を使用し、投与間隔の ABBC に対する影響は一元配置分散分析、ABBC の群間比較には Dunnett 検定 (両側, 有意水準 0.05%)、パラメータの妥当性評価には重回帰分析を用いた。

引用文献

- 1) Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-10.
- 2) Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Rotschafer JC. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 669-683.
- 3) Totsuka K. Overview of new dosage and administration of levofloxacin, 500 mg once a day. *Jpn J Chemotherapy* 2009; 57: 1-14.
- 4) Kanda H, Chiba M, Inoue K, Hoshino K, Tanaka M, Otani T, et al. Evaluation of levofloxacin dosage regimens to prevent the appearance of resistant mutants in *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* using an *in vitro* simulation model. *Jpn J Chemotherapy* 2009; 57: 411-422.
- 5) Sugaya M. Kinetics of topical pilocarpine in the human eye. *Jpn J Ophthalmol* 1978; 22: 127-141.
- 6) 長滝 重智. 点眼薬の眼内挙動. *臨床眼科* 1978; 32: 1057-1066.
- 7) Kamalarajah S, Silvestri G, Sharma N, Khan A, Foot B, Ling R, et al. Surveillance of endophthalmitis following cataract surgery in the UK. *Eye* 2004; 18: 580-587.
- 8) Miller JJ, Scott IU, Flynn HW Jr, Smiddy WE, Newton J, Miller D. Acute-onset endophthalmitis after cataract surgery (2000-2004): incidence, clinical settings, and visual acuity outcomes after treatment. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 983-987.
- 9) Nagaki Y, Hayasaka S, Kadoi C, Matsumoto M, Yanagisawa S, Watanabe K, et al. Bacterial endophthalmitis after small-incision cataract surgery. Effect of incision placement and intraocular lens type. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 20-26.
- 10) Patwardhan A, Rao GP, Saha K, Craig EA. Incidence and outcomes evaluation of endophthalmitis management after phacoemulsification and 3-piece silicone intraocular lens implantation over 6 years in a single eye unit. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 1018-1021.
- 11) Wong TY, Chee SP. The epidemiology of acute endophthalmitis after cataract surgery in an Asian population. *Ophthalmology* 2004; 111: 699-705.
- 12) Scott IU, Loo RH, Flynn HW Jr, Miller D. Endophthalmitis caused by *Enterococcus faecalis*: antibiotic selection and treatment outcomes. *Ophthalmology* 2003; 110: 1573-1577.
- 13) The Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Microbiologic factors and visual outcome in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Am J Ophthalmol* 1996; 122: 830-846.
- 14) Oshika T, Hatano H, Kuwayama Y, Ogura Y, Ohashi Y, Oki K, et al. Incidence of endophthalmitis after cataract surgery in Japan. *Acta Ophthalmol Scand* 2007 ; 85: 848-851.
- 15) Hara J. Relation between causative organism and inflammation onset in pseudophakic endophthalmitis following cataract surgery. *Atarashii Ganka (Journal of the Eye)* 2003; 20: 657-660.

- 16) Shimizu N, Shimizu K. Incidence and prevention of endophthalmitis following cataract surgery. *Jpn J Clin Ophthalmol* 1997; 51: 211-214.
- 17) 鈴木 崇. 腸球菌眼内炎ワーキンググループによる白内障術後腸球菌眼内炎調査. 大橋 裕一編. 眼科プラクティス 東京; 分光堂 2009; p.177.
- 18) Ariyasu RG, Nakamura T, Trousdale MD, Smith RE. Intraoperative bacterial contamination of the aqueous humor. *Ophthalmic Surg* 1993; 24: 367-374.
- 19) Hosaka M, Yasue T, Fukuda H, Tomizawa H, Aoyama H, Hirai K. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2108-2117.
- 20) Wada T, Sakaki H, Hatano H. Gatifloxacin Ophthalmic Solution for Experimental *Enterococcus faecalis* Endophthalmitis in Rabbits. *Atarashii Ganka (Journal of the Eye)* 2004; 21: 1525-1529.
- 21) Speaker MG, Milch FA, Shah MK, Eisner W, Kreiswirth BN. Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* 1991; 98: 639-649.
- 22) Iwasaki Y, Koyama S. Bacterial flora in conjunctival sacs before cataract surgery. *Atarashii Ganka (Journal of the Eye)* 2006; 23: 541-545.
- 23) Meredith TA, Trabelsi A, Miller MJ, Aguilar E, Wilson LA. Spontaneous sterilization in experimental *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 181-186.
- 24) Jett BD, Jensen HG, Atkuri RV, Gilmore MS. Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 9-15.
- 25) Park SS, Samiy N, Ruoff K, D'Amico DJ, Baker AS. Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1324-1329.
- 26) 宮永 将、宮田 和典. 2) 術前減菌法. 大橋 裕一編. 眼科プラクティス 東京; 分光堂 2009; p.314-315.
- 27) Inoue Y, Usui M, Ohashi Y, Shiota H, Yamazaki T. Preoperative disinfection of the conjunctival sac with antibiotics and iodine compounds: a prospective randomized multicenter study. *Jpn J Ophthalmol* 2008; 52: 151-161.
- 28) Ciulla TA, Starr MB, Masket S. Bacterial endophthalmitis prophylaxis for cataract surgery: an evidence-based update. *Ophthalmology* 2002; 109: 13-24.
- 29) Matsuura M, Suto C, Inoue Y, Saeki Y, Miyamoto T, Mori T, et al. A Japanese Survey of Perioperative Antibiotic Prophylaxis in Cataract Surgery. *Asia-Pac J Ophthalmol* 2012; 1: 283-286.
- 30) John T, Sims M, Hoffmann C. Intraocular bacterial contamination during sutureless, small incision, single-port phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 1786-1791.

- 31) Bausz M, Fodor E, Resch MD, Kristóf K. Bacterial contamination in the anterior chamber after povidone-iodine application and the effect of the lens implantation device. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 1691-1695.
- 32) Samad A, Solomon LD, Miller MA, Mendelson J. Anterior chamber contamination after uncomplicated phacoemulsification and intraocular lens implantation. *Am J Ophthalmol* 1995; 120: 143-150.
- 33) Callegan MC, Booth MC, Jett BD, Gilmore MS. Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun* 1999; 67: 3348-3356.
- 34) Tajika T. Ocular tissue distribution in rabbits after instillation of gatifloxacin ophthalmic solution. *Pharmacometrics* 2004; 67: 323-333.
- 35) Suzuki T, Wada T, Kozai S, Ike Y, Gilmore MS, Ohashi Y. Contribution of secreted proteases to the pathogenesis of postoperative *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 1776-1784.
- 36) Donnenfeld ED, Comstock TL, Proksch JW. Human aqueous humor concentrations of besifloxacin, moxifloxacin, and gatifloxacin after topical ocular application. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37: 1082-1089.
- 37) Price MO, Quillin C, Price FW Jr. Effect of gatifloxacin ophthalmic solution 0.3% on human corneal endothelial cell density and aqueous humor gatifloxacin concentration. *Curr Eye Res* 2005; 30: 563-567.
- 38) Teshigawara T, Hata S, Hayashi T, Watanabe Y, Itoh Y, Hitoi K, et al. Penetration of gatifloxacin eye drops into the aqueous humor in humans. *Ocul Immunol Inflamm* 2007; 15: 309-313.
- 39) Liu X, Wang NL, Wang YL, Ma C, Ma L, Gao LX, et al. Determination of drug concentration in aqueous humor of cataract patients administered gatifloxacin ophthalmic gel. *Chin Med J* 2010; 123: 2105-2110.
- 40) Arto U, Lotta S. 6 Animal Pharmacokinetic Studies. In: Ashim KM, editor. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2003. p.135-179.
- 41) Schoenwald RD. 5 Ocular pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Ashim KM, editor. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1993. p.121-136.
- 42) Macha S, Mitra AK, Hughes PM. 1 Overview of Pcular Drug Delivery. In: Ashim KM, editor. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2003. p.1-12.
- 43) Chastain JE. 3 General considerations in ocular drug delivery. In: Ashim KM, editor. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2003. p.59-107.
- 44) 新家 真. 2. 点眼薬の吸収と動態 (眼内移行, 流出など). 本田 孔士編. 東京; 文光堂. 1994; p.387-392.
- 45) Andes D, Craig WA. Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh

- and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1665-1670.
- 46) Uno T, Hatano H, Ohashi Y. Antibacterial Activity of Gatifloxacin against Ocular Clinical Isolates. *Atarashii Ganka (Journal of the Eye)* 2004; 21: 1547-1553.
 - 47) Grasso S, Meinardi G, Carneri ID, Tamassia V. New *In Vitro* Model to Study the Effect of Antibiotic Concentration and Rate of Elimination on Antibacterial. Activity *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 570–576.
 - 48) Satta G, Cornaglia G, Foddìs G, Pompei R. Evaluation of ceftriaxone and other antibiotics against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pneumoniae* under *in vitro* conditions simulating those of serious infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 552–560.
 - 49) Löwdin E, Odenholt I, Bengtsson S, Cars O. Pharmacodynamic effects of sub-MICs of benzylpenicillin against *Streptococcus pyogenes* in a newly developed *in vitro* kinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2478–2482.
 - 50) Bonapace CR, Friedrich LV, Bosso JA, White RL. Determination of antibiotic effect in an *in vitro* pharmacodynamic model: comparison with an established animal model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3574-3579.
 - 51) Garrison MW, Vance-Bryan K, Larson TA, Toscano JP, Rotschafer JC. Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1925-1931.
 - 52) Wang W, Sasaki H, Chien DS, Lee VH. Lipophilicity influence on conjunctival drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration. *Curr Eye Res* 1991; 10: 571-579.
 - 53) Schoenwald RD, Ward RL. Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci* 1978; 67: 786-788.
 - 54) Huang HS, Schoenwald RD, Lach JL. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions. *J Pharm Sci* 1983; 72: 1272-1279.
 - 55) Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci* 1998; 87: 1479-1488.
 - 56) Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, et al. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1181-1185.
 - 57) Fukuda M, Sasaki H. Measurement of AQC_{max} of five different ophthalmic solutions and discussion of its new application. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25: 351-356.
 - 58) Satia MC, Mody VD, Modi RI, Kabra PK, Khamar M. Pharmacokinetics of topically applied sparfloxacin in rabbits. *Indian J Ophthalmol* 2005; 53: 177-181.
 - 59) Leibowitz HM, Ryan WJ, Kupferman A, DeSantis L. Bioavailability and corneal

- anti-inflammatory effect of topical suprofen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 628-631.
- 60) Agata M, Tanaka M, Nakajima A, Fujii A, Kuboyama N, Tamura T, et al. Ocular penetration of topical diclofenac sodium, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in rabbit eye. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 1984; 88: 991-996.
- 61) 多鹿 哲也、香西 聖子、榊 秀之、大鳥 聡、笠井 英史. ラタノプロスト点眼液 0.005%「セ
ンジュ」のウサギ眼房水中薬物濃度を用いた生物学的同等性試験. *医学と薬学* 2010; 63:
435-440.
- 62) 岩田 修造. 14.1 眼. 社団法人日本生化学会編. *生化学データブック I*. 東京; 東京化学同
人 1979; p.1617-1633.
- 63) Firsov AA, Vostrov SN, Shevchenko AA, Cornaglia G. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1281-1287.
- 64) Blaser J, Stone BB, Groner MC, Zinner SH. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1054-1060.
- 65) Karlowsky JA, Zhanel GG, Davidson RJ, Zieroth SR, Hoban DJ. *In vitro* postantibiotic effects following multiple exposures of cefotaxime, ciprofloxacin, and gentamicin against *Escherichia coli* in pooled human cerebrospinal fluid and Mueller-Hinton broth. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1154-1157.
- 66) Lister PD. Pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model: impact of area under the curve/MIC ratios on eradication. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 69-74.
- 67) Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinner SH. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1604-1613.
- 68) Zinner SH, Lubenko IY, Gilbert D, Simmons K, Zhao X, Drlica K, et al. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 616-622.
- 69) Bowker KE, Wootton M, Rogers CA, Lewis R, Holt HA, MacGowan AP. Comparison of *in-vitro* pharmacodynamics of once and twice daily ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 661-667.

- 70) Booker BM, Smith PF, Forrest A, Bullock J, Kelchlin P, Bhavnani SM, et al. Application of an *in vitro* infection model and simulation for reevaluation of fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype typhi. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1775-1781.
- 71) MacGowan AP, Rogers C, Holt HA, Wootton M, Bowker KE. Pharmacodynamics of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 2916-2921.
- 72) Coyle EA, Kaatz GW, Rybak MJ. Activities of newer fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1654-1659.
- 73) Lister PD, Sanders CC. Pharmacodynamics of trovafloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1118-1123.
- 74) Israel D, Gillum JG, Turik M, Harvey K, Ford J, Dalton H, et al. Pharmacokinetics and serum bactericidal titers of ciprofloxacin and ofloxacin following multiple oral doses in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2193–2199.
- 75) Wise R, Mortiboy D, Child J, Andrews JM. Pharmacokinetics and penetration into inflammatory fluid of trovafloxacin (CP-99, 219). *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 47–49.
- 76) Ebisu H, Kishii R, Takei M, Fukuda H. The effect of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters of gatifloxacin on its bactericidal activity and resistance selectivity against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Chemother* 2003; 9: 210-214.
- 77) Mignot A, Guillaume M, Brault M, Gualano V, Millérioux L, Göhler K, Stahlberg HJ. Multiple-dose pharmacokinetics and excretion balance of gatifloxacin, a new fluoroquinolone antibiotic, following oral administration to healthy Caucasian volunteers. *Chemotherapy* 2002; 48: 116-121.
- 78) Saravolatz LD, Leggett J. Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1210-1215.
- 79) Tasso L, Bettoni CC, Oliveira LK, Dalla Costa T. Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. *Int J Pharm* 2008; 358: 96-101.
- 80) Nakashima M, Uematsu T, Kosuge K, Kusajima H, Ooie T, Masuda Y, Ishida R, Uchida H. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2635-2640.
- 81) Lutsar I, Friedland IR, Wubbel L, McCoig CC, Jafri HS, Ng W, et al. Pharmacodynamics of gatifloxacin in cerebrospinal fluid in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2650-2655.
- 82) Zinner SH, Firsov AA, Gilbert D, Simmons K, Lubenko IY. The pharmacodynamics of

- gatifloxacin and ciprofloxacin for pneumococci in an *in vitro* dynamic model: prediction of equiefficient doses. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 821-826.
- 83) Tajika T, Isowaki A, Sakaki H. Ocular distribution of difluprednate ophthalmic emulsion 0.05% in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2011; 27: 43-49.
- 84) Higaki K, Kamata K, Takeuchi M, Inazawa K, Chikai T, Hamaguchi T, et al. Ocular absorption, distribution, and systemic absorption of a novel antiglaucoma medication, prostaglandin derivative, in male white rabbits. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 35-43.
- 85) Durairaj C, Kadam RS, Chandler JW, Hutcherson SL, Kompella UB. Nanosized dendritic polyguanidylated translocators for enhanced solubility, permeability, and delivery of gatifloxacin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 5804-5816.
- 86) Proksch JW, Ward KW. Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics of besifloxacin, moxifloxacin, and gatifloxacin following topical administration to pigmented rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26: 449-458.
- 87) Wakabayashi E, Mitsuhashi S. *In vitro* antibacterial activity of AM-1155, a novel 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 594-601.
- 88) Mather R, Karenchak LM, Romanowski EG, Kowalski RP. Fourth generation fluoroquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 463-466.
- 89) 日本化学療法学会. 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法) - 日本化学療法学会標準法 -. *Chemotherapy* 1990; 38: 102-105.