Levofloxacin 含有 albumin 被覆 Dacron 製人工血管の開発

藤本克博・桜井恒久^{*1)}, 山村恵子・長田孝司・林 哲夫・小安邦彦・鍋島俊隆^{*2)}*The development of levofloxacin-bonded albumin Dacron graft*

The highly porous Dacron graft fabricated from polyester filaments is generally considered to be one of the most suitable synthetic vascular prostheses in arterial reconstructive surgery. To prevent blood leakage through the pores during an operation, several sealing materials such as albumin (ALB), collagen and gelatin have been employed. As vascular graft infection is a disastrous complication on vascular surgery, great effort must be taken to avoid it.

To reduce the systemic effect while maintaining an increase in local resistance to graft infection, it seems reasonable that an antibiotic-loaded graft prolongs the release of antibiotics from the graft at the operated site. Common skin microorganisms, such as *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, have been associated with graft-related infection. Levofloxacin (LVFX) was used as a model drug since it shows a broad protective spectrum against Gram-positive and Gram-negative bacteria, particularly *staphylococci*.

To control the release rate of LVFX, ALB was bonded to the Dacron graft. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that the release rate of LVFX decreased in the presence of ALB. One LVFX-ALB disk (diameter : 1.2 cm) was implanted in the skin pocket made in a rat, and inoculated with *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus epidermidis* (0.1 ml of 10^8 CFU/ml). While all control grafts were infected at the time of removal, all LVFX-ALB Dacron grafts resisted infection, thus demonstrating their effectiveness.

These studies suggest that LVFX controlled-releasing Dacron delivery system can decrease graft infection at the operated site.

Katsuhiro Fujimoto・Tsune-hisa Sakurai^{*1)}

Keiko Yamamura・Takashi Osada・

Tetsuo Hayashi・Kunihiko Koyasu・

Toshitaka Nabeshima^{*2)}

key words : levofloxacin, albumin, Dacron graft, release, graft infection

多孔性 Dacron グラフトは、血行再建術においてもっとも多く用いられている人工血管の一つである¹⁾。

グラフト置換時に管壁からの血液漏出を防止するため、albumin(ALB), collagen および gelatin などが被覆剤として用いられている²⁾。手術時のグラフト感染は、敗血症から死に至る可能性の高い重篤な合併症であり、術中術後の初期感染予防は血管外科領域の重要な課題の一つである。そこで、全身的副作用を軽減し、局所に有効治療量の抗菌剤を持続的に送達することがグラフト感染予防に有効であると考えられる。

近年、gelatin 被覆グラフトへの rifampicin イオン結合が、グラフト感染予防に有効であるとの臨床報告がある³⁾。しかし、gelatin 被覆グラフトの副作用として発熱およびアレルギー反応があげられている⁴⁾。一方、ALB グラフト置換後の発熱の報告は見当たらない。また、薬物に rifampicin を使用した場合、その耐性菌の発現が速いことも報告されている⁵⁾。

そのため、本実験では Dacron 人工血管の被覆剤として ALB を用い、グラフト感染の主要原因菌である⁶⁾ *staphylococci* (*S. aureus*, *S. epidermidis*) に有効な levofloxacin (LVFX)⁷⁾ をモデル薬物とする LVFX-ALB グラフトを開発し、グラフト感染予防を目的とした臨床応用への可能性を検討した。

^{*1)} First Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine 名古屋大学医学部第一外科学教室

^{*2)} Department of Hospital Pharmacy, Nagoya University School of Medicine 名古屋大学医学部附属病院薬剤部

Offprint requests to : Katsuhiro Fujimoto, Ph. D., First Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466

材料と対象

(1) 試薬

albumin は山之内製薬(Tokyo, Japan) Albuminar® (25% w/v, 50 ml/vial)を使用した。LVFX 原末は第一製薬(Tokyo, Japan)から提供を受けた。trypticase soy agar(TSA), リン酸, メタノールおよびその他の試薬は試薬特級を用いた。

(2) 人工血管

人工血管は Bard Implants Inc.(Bard Europe Division, Murray Hill, NJ, USA)のシート状の knitted Dacron® を使用した。Dacron® の特性は、厚さ 0.7 mm, porosity 1,600 ml H₂O/cm²/min/120 mmHg である。実験に際しては、直径 1.2 cm の disk 状に切り取って使用した。

(3) 動物

10週齢の Sprague-Dawley(SD)rat, 雄を日本 SLC(Hamamatsu, Japan)より購入し、約1週間予備飼育したのち、11週齢(340~360 g)で実験に使用した。固形飼料は日本クレアより購入した。

方法

(1) LVFX-ALB Dacron グラフトの調製

LVFX 含有量は、Dacron disk 10枚を蒸留水に浸漬し、浸漬後の重量と浸漬前の重量差から disk 1枚当りの含水量(0.0517 g/disk)より計算した。含有量の異なる LVFX-ALB Dacron グラフト(LVFX: 200-300 µg/disk)は各 LVFX-25% ALB 溶液(LVFX: 3.87-5.80 mg/ml)に浸漬したのち、高圧蒸気滅菌操作(30 min, 115°C)を行い作成した。

LVFX Dacron グラフトは LVFX 水溶液から円盤の方法で作成した。

高圧蒸気滅菌操作による LVFX の安定性の影響は、HPLC で測定し 100%の安定性を確認した。

(2) LVFX の放出速度測定 (*in vitro*)

放出速度測定のための拡散セルを図1に示した。セルのジャケットは2重になっているため、恒温層の温湯を流すことによってセル内を 37°C に一定に保持できる。回転子は 15×8 mm を、マグネチックスターラーは AS-2T(Tokyo Scientific Co., Tokyo, Japan)を使用した。拡散セルの

図1 A diffusion cell for drug release measurement

水相(20 ml)中に disk を静かにつり下げ、水相を回転子で攪拌し、経時的に水相を 20 µl 採取し、disk より放出した LVFX を HPLC で測定した。HPLC 測定条件は、column: µ-Bondapak C18 10 µm, column dimensions: 30 cm×3.9 mm i. d.(Waters Co.), mobile phase: 70% methanol-0.025 M 1-pentansulfonate, flow rate: 1.0 ml/min, absorbance: 330 nm で行った。disk からの薬物放出測定時の回転数は 300 rpm とした。

(3) LVFX 残存量 (*in vivo*)

エーテル麻酔下で、SD ラットの腹部皮下にポケットを4個作成し、それぞれのポケットに LVFX-ALB disk (LVFX: 248 µg/disk) を1個埋植した。埋植後、0.5, 1, 3, 5, 8, 24 hr に disk を取り出し、蒸留水に遮光、5°C下で3日間浸漬した。溶液中に放出した LVFX を HPLC で測定し、disk 中の残存量とした。LVFX disk も同様の操作を行った。

(4) LVFX の血中濃度

予め中心静脈カテーテル留置処置を施した SD ラットの腹部皮下にポケットを1個作成し、LVFX-ALB disk (LVFX: 248 µg/disk) 1個を埋植した。埋植後、5, 15, 30 min および 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 hr に約 400 µl 採血し、遠心分離(3,000 rpm)後、血清中の LVFX 濃度を測定した。静脈注射(*i. v.*)との比較を行うため、250 µg/rat を *i. v.* 投与し、血清中 LVFX 濃度を測定した。

図2 Release rates of levofloxacin (LVFX) *in vitro* from LVFX-ALB disks and LVFX disks of various concentrations into receiving fluid consisting of phosphate buffer (pH 7.4)

(—) LVFX-ALB disk, (---) LVFX disk. LVFX concentration: (●) 200 µg, (○) 250 µg, (△) 300 µg. Each plot represents the average value for three samples.

図3 Remaining (%) of levofloxacin (LVFX) in the disks implanted in rat abdominal subcutaneous tissues at various time intervals

(○) LVFX-ALB disk (LVFX: 248 µg/disk), (●) LVFX disk (LVFX: 251 µg/disk). Values are expressed as mean $\pm$ SE (n=8).

(5) LVFX の組織内濃度

腹部皮下に作成した4個のポケットに LVFX-ALB disk (LVFX: 248 µg/disk) をそれぞれ1個埋植した。0.5, 1, 3, 5, 8, 48 hr 後に disk 周囲の組織を約 0.7~1.0 g 切り取り、リン酸バッファー 2 ml 中に浸漬し、4°C下でホモジナイズ (30,000 rpm) した。さらに遠心分離 (12,000 rpm, 5 min) したのち、上清中の LVFX を HPLC で測定した。LVFX disk (LVFX: 251 µg/disk) においても同様の操作を行った。

(6) LVFX-ALB disk の抗菌活性

SD ラットの腹部皮下にポケットを1個作成し、埋植した LVFX-ALB disk (LVFX: 248 µg/disk) 上に *S. aureus* ATCC 25923 あるいは *S. epidermidis* ATCC 14990 の菌液 0.1 ml (1×10^8 CFU/ml) を接種した。disk に付着した菌を測定するため、Solomon et al.⁸⁾の方法に従い、2日後に無菌的に摘出した disk を滅菌生理食塩水 5 ml に浸漬し、約 3 min ソニケーションした。つぎに、溶液を 10, 100, 1,000 倍に希釈し、TSA 上で培養 (37°C, 48 hr) 後、disk 中の菌数を測定した。

control グラフトには、LVFX および ALB を含有しない Dacron disk を用いた。

結果

(1) LVFX-ALB disk からの LVFX 放出挙動 (*in vitro*)

図2に、LVFX の含有量を変化させたときの LVFX-ALB disk からの LVFX 放出挙動を示した。200~300 µg の含有量においては、いずれの場合も同様の放出パターンを示した。ALB を含有しない LVFX disk からの LVFX は、15 min で 100% の放出を示した。一方、LVFX-ALB disk では初期の 15 min で約 40%、3 hr 後に 90% と、ALB による明らかな放出制御効果が観察された。

(2) LVFX-ALB disk からの LVFX 放出挙動 (*in vivo*) (ラット腹部皮下ポケット埋植)

図3にそれぞれラット腹部皮下ポケットに埋植した LVFX-ALB disk (LVFX: 248 µg/disk) および LVFX disk (LVFX: 251 µg/disk) を経時的に摘出したときの残存 LVFX 量を全含有量との比較であらわした。

LVFX disk からの LVFX 放出は 1 hr 後に 100% を示し、*in vitro* 実験の結果と比較し放出速度は遅延していた。一方、LVFX-ALB disk では 1 hr 後に LVFX 放出は 65% を示し、LVFX disk に比較し放出は制御された。*in vitro* 実験では 1 hr 後に約 80% の放出を示していることより、*in*

図4 Levofloxacin(LVFX) serum levels
One LVFX-ALB disk(LVFX : 248 $\mu\text{g}/\text{disk}$) was implanted in rat abdominal subcutaneous tissues (●). Free LVFX(250 $\mu\text{g}/\text{rat}$) was administered *i. v.* (○). Values are expressed as mean $\pm$ SE (n = 5-6).

図5 Levofloxacin(LVFX) levels in the surrounding tissues of the implanted LVFX-ALB disks(LVFX : 248 $\mu\text{g}/\text{disk}$) and LVFX disks(LVFX : 251 $\mu\text{g}/\text{disk}$) (○)LVFX-ALB disk, (●)LVFX disk. Values are expressed as mean $\pm$ SE (n=12). ND : Not detected.

表1 Bacteriologic evaluation of infection in LVFX-ALB Dacron grafts

Inoculated strain	Number of infected grafts/ Total number of grafts		Viable counts(CFU/graft) mean $\pm$ SE	
	Control	LVFX-ALB	Control	LVFX-ALB
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6/6	0/6 ^{*1)}	$4.6 \pm 2.3 \times 10^7$	0 ^{*2)}
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	6/6	0/6 ^{*1)}	$5.1 \pm 3.2 \times 10^7$	0 ^{*2)}

Values represent mean $\pm$ SE (n=6). Statistical differences were analyzed by student's t-test on viable counts and Fisher's exact probability test on number of infected grafts. ^{*1)} P<0.01 vs control. ^{*2)} P<0.05 vs control.

Control : colonized grafts implanted for 2 days without levofloxacin, LVFX-ALB : colonized grafts implanted for 2 days with levofloxacin-albumin.

*vivo*での放出が制御されていることが観察されたが、3 hr 後には90%放出と同様の値を示した。

(3) LVFX 血中濃度および組織内濃度

図4に、LVFX-ALB disk (LVFX : 248 $\mu\text{g}/\text{disk}$)埋植後および *i. v.* 投与後(LVFX : 250 $\mu\text{g}/\text{rat}$)の、血中濃度の経時的推移を示した。

i. v. 投与群は投与後5 minの0.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から速やかに減少し、7 hr 後に検出限界以下になった。一方、LVFX-ALB 埋植群では30 min後に最高血中濃度を示し、そののち緩やかに血中より消失し、7 hr 後には検出限界以下になった。

図5に、LVFX-ALB disk および LVFX disk 埋植後の LVFX 組織内濃度を示した。

LVFX disk は埋植後1 hr で約50 $\mu\text{g}/\text{g}$ を示し、5 hr 後には検出限界以下になった。一方、LVFX-ALB disk では5 hr 後に25 $\mu\text{g}/\text{g}$ を示し、8 hr 後もわずかに検出された。LVFX 残存量の結果と同様、LVFX-ALB disk からの LVFX 放出も LVFX disk と比較して ALB による放出制御効果が観察された。また、LVFX-ALB disk および LVFX disk の埋植において control disk のみを埋植した場合と比較し、非特異的炎症反応を示す指標の一つとなる白血球数の変動に差は認められなかった。

(4) LVFX-ALB disk の抗菌効果

control disk 埋植後に *S. aureus* および *S. epi-*

dermidis の菌液を接種した結果、いずれの菌種においても菌の増殖が観察され、周囲組織の変化からもグラフト感染であると考えられた。一方、LVFX-ALB disk ではいずれの菌種も培養されず、グラフト感染予防効果が示された(表1)。

考 察

in vitro, *in vivo* における LVFX 放出はともに ALB によって制御され、両者の間に良好な相関性が認められた。しかしながら、1 hr 後の放出が *in vitro* に比較し、*in vivo* において制御されているにもかかわらず、その後 3 hr でほぼ同値を示したことは、生体内のプロテアーゼによる ALB の分解が LVFX 放出の促進に影響を与えたものと考えられた。

さらに、LVFX-ALB disk より放出された LVFX は血中および組織中から約 8 hr で消失し、放出挙動と良好な相関を示した。

Dacron グラフトからの LVFX 放出が ALB 存在下で制御された理由として、加熱によって形成した変性 ALB 中に LVFX が取り込まれたためと考えられた⁹⁾。本製剤の副作用発現の観点からは、同用量の LVFX を投与したときの *i. v.* 投与群に比較し、LVFX-ALB disk 群では最高血中濃度が低値を示したことより、全身的副作用の軽減を期待できると考えられた。control disk と比較し、埋植部位における非特異的炎症反応を示す指標の一つとなる白血球数の変動に差は認められなかったことから、局所投与部位での安全性が示唆された。

初期のグラフト感染予防を目的として今回の実験に使用した、LVFX-ALB disk 中に含有される LVFX 量(250 μ g/disk)によってグラフト埋植時の感染を予防することが、*S. aureus* および *S. epidermidis* の二つの菌種で確認された。

ALB の使用が³⁾ Dacron disk からの薬物放出を

コントロールすること、また、ALB が人工血管壁からの血液漏出を防止するための被覆剤として用いられることを考慮すれば、ALB-グラフトデリバリーシステムは初期の局所感染予防を目的とした薬物担体として有用であると考えられた。

さらに、臨床分離株に有効性を示す薬物の選択や、MIC を考慮した薬物含有量の最適化、放出コントロールの精密化によって応用範囲は広がると思われる。

文 献

- 1) Sydner, R. W., Botzko, K. M. : Woven, Knitted, and externally supported dacron vascular prostheses. In *Biologic and Synthetic Vascular Prostheses*. (ed. Stanley, J. C.), Grune & Stratton, NY., 1982, p 485-494.
- 2) McGree, G. S., Shuman, T. A., Atkinson, J. B., Weaver, F. A., Edwards, W. H. : Longterm assessment of a damp-stored, albumin coated, knitted vascular graft. *Am. J. Sur.* 55 : 174-176, 1989.
- 3) Gahtan, V., Esses, G., Bandyk, D., Nelson, R. T., Dupont, E., Milis, J. L. : Antistaphylococcal activity of rifampicin-boned gelatin-impregnated Dacron grafts. *J. Surg. Res.* 58 : 105-110, 1995.
- 4) Norgen, L., Hotas, S., Persson, G., Pibbe, E., Saxne, T., Thorne, J. : Immune response to collagen-impregnated Dacron double velour grafts for aortic and aorto-femoral reconstruction. *Eur. J. Vasc. Surg.* 4 : 379-384, 1990.
- 5) Avramovic, J. R., Fletcher, J. P. : Rifampicin impregnation of a protein-sealed Dacron graft : An infection-resist and prosthetic vascular graft. *Aust. NZJ. Surg.* 61 : 436-440, 1991.
- 6) Schmitt, D. D. : Antibiotic usage in the prevention and treatment of graft infection. *Semin. Vasc. Surg.* 3 : 77-80, 1990.
- 7) Tanaka, M., Otsuki, M., Une, T., Nishino, T. : *In vitro* and *in vivo* activity of DR-3355, an optically active isomer of ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 26 : 659-666, 1990.
- 8) Solomon, D. D., Sheretz, R. J. : Antibiotic releasing polymers. In *Advances in Drug Delivery System*, 3rd ed. (ed. Anderson, J. M.), Elsevier Science Publishers B. V., NY., 1987, p 343-352.
- 9) Novotny, J., Zinek, K. : Application of epirubicin containing albumin microspheres in the experimental therapy of breast cancer. *Neoplasma* 41 : 201-204, 1994.