

## 組織培養法および動物系を用いたTE-031の 抗クラミジア活性と他薬剤との比較

吉沢花子・橋爪 壮

千葉大学看護学部病態学講座

Tetracycline 系の 2 剤 (Minocycline, Doxycycline), Macrolide 系の 2 剤 (Erythromycin, TE-031) の 4 剤の抗生物質について *C. trachomatis* に対する増殖阻止最小濃度 (MIC) を組織培養系によって測定した。細胞は HeLa229 および McCoy 細胞を用い、*C. trachomatis* は D および E 株を用いた。各抗生物質の MIC 値は D・E 株間の差は殆ど認められず、HeLa 229 細胞における MIC 値は 4 剤ともほぼ同程度の成績であった。Erythromycin は McCoy 細胞では HeLa 229 細胞の 1/5~1/7 の感受性であったが、他の 3 剤は両細胞間の MIC 値に差はなかった。

マウスおよびラットにこれら 4 剤を経口投与した後、経時的に血清および組織抽出液中の抗 Chlamydia 活性を HeLa 229 細胞を用いて測定した。Minocycline, Doxycycline は血中への活性の移行は極めて早く、持続もよいが、肺および前立腺への活性の移行は遅く、活性も低い。TE-031 は血中への移行・持続は Tetracycline 系の 2 剤と殆ど同じ傾向であったが、肺・前立腺への活性の移行は早く、高い活性が長時間持続した。Erythromycin は血中への移行は早い、活性はや、低く、経時的低下も著しい。また肺・前立腺への移行は早い、TE-031 に比し活性は低く、低下も早い。

マウス・ラット投与実験は、細胞内増殖系の微生物に対する薬剤の臨床効果の予測を行う上で、有用な手段となり得ると考えられる成績であった。

Chlamydia は細胞内寄生体であり、従って薬剤を投与する場合、増殖抑制を示すためには薬剤は宿主細胞に取り込まれ、細胞質内で抗 Chlamydia 活性を示さなければならない。In vitro 系で抗生物質の抗 Chlamydia 活性を検討するには、HeLa 細胞・McCoy 細胞などの組織培養系を用い、細胞に Chlamydia を接種・吸着した後、培養液に抗生物質を添加して細胞培養を行い、Chlamydia による細胞質内封入体の形成を検出することによって抗生物質の感受性を比較している<sup>1-3)</sup>。

*C. trachomatis* 感染症の治療には Minocycline, Doxycycline などの Tetracycline 系の抗生物質が使用されており、また妊娠中の女性や乳幼児の治療には Macrolide 系の Erythromycin が主に用いられているが<sup>4,5)</sup>、これらの抗生物質の治療効果は in vitro 系での感受性試験の結果と必ずしも一致しない。

生体に抗生物質を投与した場合、生体内で酵素・pH その他による化学変化を受けることは当然考えなくてはならず、また標的組織への到達および標的細胞内への取り込みの差を考慮しなければならない。

今回、我々は抗生物質をマウスおよびラットに経口投与し、経時的に血液中および組織中の抗 Chlamydia 活性を測定することによって、治療効果により近い抗生物質の抗 Chlamydia 作用の評価を行うことを試みた。

### I. 材料と方法

#### 1. 抗生物質

Tetracycline 系の 2 剤 - Minocycline (Lederle)・Doxycycline (Pfizer) と Macrolide 系の 2 剤 - Erythromycin (Sigma)・TE-031 (大正製薬) の 4 剤について実験を行った。

#### 2. MIC 測定法

HeLa 229 細胞または McCoy 細胞  $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$  cells/ml の細胞浮遊液を直径 14 mm のカバースリップを入れた 24 穴培養トレーの各穴 (well) に 1 ml/well ずつ入れ、2 日間 5% 炭酸ガス培養器中で培養した。培養液を除去した後、30  $\mu$ g/ml DEAE-dextran 加 Hanks BSS 1 ml/well を加え、室温に 30 分静置し、前処理した。DEAE-dextran 液を除去した細胞に *C. trachomatis* D/UW-3 株または E/UW-5 株  $10^2 \sim 10^3$  ifu (inclusion-forming unit)/0.1 ml (希釈液 SPGA<sup>®</sup>) を 0.25 ml/well ずつ接種した後、室温で 1500 rpm (490 g) 1 時間遠心吸着し、さらに 37°C 炭酸ガス培養器中で 1 時間静置吸着した。接種液を除去した後、分離用培養液 (1  $\mu$ g/ml cycloheximide 加 Eagle MEM-5% 牛胎児血清) で段階希釈して調整した抗生物質液を 1 ml/well 加え、5% 炭酸ガス培養器中で 37°C, 72 時間培養した。

培養液を除去した後、りん酸緩衝食塩液 (PBS) で 2 回洗滌し、methanol で固定した。5% ヨード液または抗

Chlamydia FITC 標識血清で細胞を染色し、鏡検によって封入体の検索を行った。封入体の形成を完全に阻止した抗生物質の最小濃度をもって MIC 値とした。

### 3. マウス投与実験

マウスは ICR 6 週齢の雄を用いた。各抗生物質を 2 mg/ml の濃度で 5% アラビアゴム水溶液に懸濁し、カテーテルを用いて 50 mg/kg ずつ経口投与した。投与後 1・2・3・5 時間に 1 群 3 匹ずつ全採血した後、肺を摘出した。

肺は、重量の 4 倍量の methanol を加え、ホモジナイザーによって細切した後、さらに超音波処理を行って細切組織を破碎した後、2000 rpm 10 分遠心して、その遠心上清を肺組織抽出液として -20°C に保存した。

### 4. ラット投与実験

ラットはウイスター系 8 週齢の雄を用いた。各抗生物質を 5% アラビアゴム水溶液中に懸濁し、100 mg/kg ずつ経口投与した。投与後 2・4・8 時間に 1 群 3 匹ずつ全採血した後、肺と前立腺を摘出した。

肺および前立腺はマウスと同様に重量の 4 倍量の methanol を加えて組織抽出液を作成し、-20°C に保存した。

### 5. 血清および組織抽出液中の抗 Chlamydia 活性の測定

HeLa 229 細胞  $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$  cells/ml の浮遊液を直径 14 mm カバーグラス入り 24 穴培養トレーに 1 ml/well ずつ入れ、2 日間培養した。DEAE-dextran 液で前処理した細胞に *C. trachomatis* D/UW-3 株  $10^2 \sim 10^3$  ifu/0.1 ml を 0.25 ml/well ずつ接種し、1500 rpm 1 時間遠心吸着、さらに 37°C、1 時間静置吸着した後、接種液を除去した。

被検血清は分離用培養液で 50 倍希釈した後、分離用培養液で 2 倍段階希釈した。組織抽出液は PBS で 10 倍希

釈した後分離用培養液で希釈して 100 倍希釈液とし、これを分離用培養液で 2 倍段階希釈した。

吸着後の細胞に上記の希釈血清または希釈組織抽出液を 1 ml/well 加え、37°C、72 時間培養した。細胞を PBS で洗滌し、methanol 固定した。

ヨード染色を行い、鏡検によって封入体の検索を行い、封入体の形成を完全に阻止した血清もしくは組織抽出液の最高希釈倍率をもって血清または組織の抗 Chlamydia 活性値とした。

## II. 成 績

### 1. MIC 値の比較

HeLa 229 細胞および McCoy 細胞を用いて Tetracycline 系の 2 剤 (Minocycline・Doxycycline) と Macrolide 系の 2 剤 (Erythromycin・TE-031) について組織培養系における Chlamydia の増殖阻止濃度を測定した。*C. trachomatis* は D/UW-3 株および E/UW-5 株を用いた。

*C. trachomatis* を組織培養細胞に接種し、吸着 2 時間後に各抗生物質を加えた培養液を加えて 72 時間培養した後、*C. trachomatis* の細胞質内封入体の検索を行い、封入体形成を阻止し得た抗生物質の最小濃度を求めた (Table 1)。

HeLa 229 細胞を用いた場合は、Macrolide 系の 2 剤は Tetracycline 系の 2 剤とほぼ同程度の MIC 値であった。しかし、McCoy 細胞を用いた場合は、TE-031 は Tetracycline 系の 2 剤と同様 HeLa 229 細胞を用いた成績と一致したが、Erythromycin は HeLa 229 細胞を用いた成績の 5~7 倍の高濃度で封入体の形成を阻止し得た。McCoy 細胞と HeLa 229 細胞の抗生物質の感受性差は他の Macrolide 系抗生物質 (Miomycamine) においても認められた。各抗生物質ともに D 株と E 株の株間の感受性

Table 1 Minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antimicrobial agents against *Chlamydia trachomatis* in HeLa 229 and McCoy cell cultures

Antimicrobial agent	Cell	<i>C. trachomatis</i>	
		Strain D ( $\mu$ g/ml)	Strain E ( $\mu$ g/ml)
Doxycycline	HeLa	0.02	0.02~0.03
	McCoy	0.02	0.02~0.03
Minocycline	HeLa	0.01	0.005~0.01
	McCoy	0.01	0.01
Erythromycin	HeLa	0.03	0.02
	McCoy	0.14	0.14
TE-031	HeLa	0.005~0.01	0.01
	McCoy	0.01	0.01

差は認められなかった。

2. マウス投与実験

各抗生物質を5%アラビアゴム水溶液中に懸濁し、50 mg/kgをマウスに経口投与した。投与後1・2・3・5時間に1群3匹ずつ全採血し、肺を摘出した。血清および肺抽出液中の抗 Chlamydia 活性を *C. trachomatis* D株接種 HeLa 229細胞の封入体形成阻止によって測定した。

Fig. 1 に各抗生物質を経口投与したマウスの血清の *C. trachomatis* 増殖抑制効果を示した。Doxycycline・Minocycline は投与1時間から5時間後まで殆ど同程度の活性が認められた。TE-031も個体間のバラツキは認められたものの、5時間後まで殆ど同程度の活性であった。Erythromycin はこれら3剤にくらべ血中の活性の低下は極めて早かった。

肺抽出液中の抗 Chlamydia 活性を Fig. 2 に示した。Doxycycline は投与2時間以降に活性が認められ、5時間まで活性が検出できた。Minocycline はさらに肺への移行は遅く、3時間以降に活性が検出され、徐々に活性が上昇する傾向であった。Erythromycin はこの実験に用いた投与量では肺への移行は検出されなかった。一方、

TE-031は肺への移行は極めて早く、1時間後にはすでに活性は peak に達し、Minocycline・Doxycycline 投与マウスの約10倍の活性価で、5時間後も同程度の活性が保持されていた。

3. ラット投与実験

各抗生物質を5%アラビアゴム水溶液中に懸濁し、100 mg/kgをラットに経口投与した。投与後2・4・8時間に1群3匹ずつ全採血した後、肺および前立腺を摘出した。

血清中および肺・前立腺の methanol 抽出液中の抗 Chlamydia 活性を *C. trachomatis* D株を接種した HeLa 229細胞において封入体形成を阻止し得た血清または組織抽出液の最高希釈倍率で示し、比較した。

Fig. 3 に血清の抗 Chlamydia 活性を示した。Minocycline は血清中の活性が最も高く、2時間で peak に達し、8時間後も高い活性を保持していた。Doxycycline・TE-031は同程度の活性で、Minocycline の1/4程度の活性が認められ、2時間で peak 値を示し、以後8時間まで徐々に活性は低下した。一方、Erythromycin はこれら3剤に比し活性は低く、2時間で peak 値を示し、急激

Fig. 1 Anti-chlamydial activity in sera of mice after oral administration of antimicrobial agents

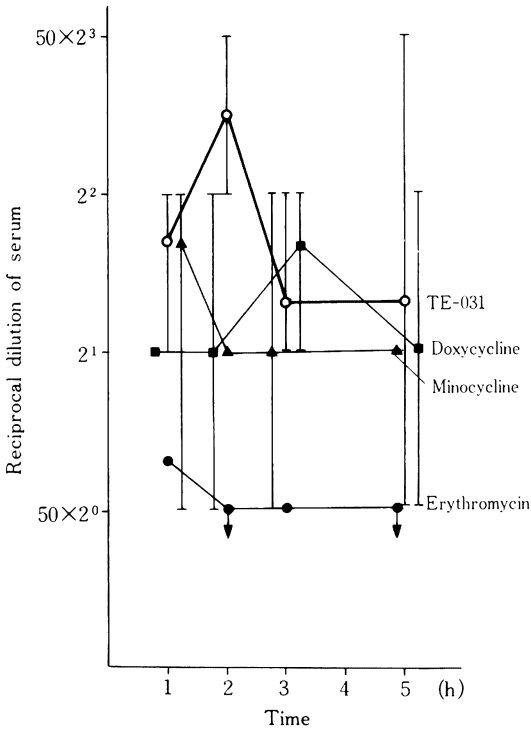
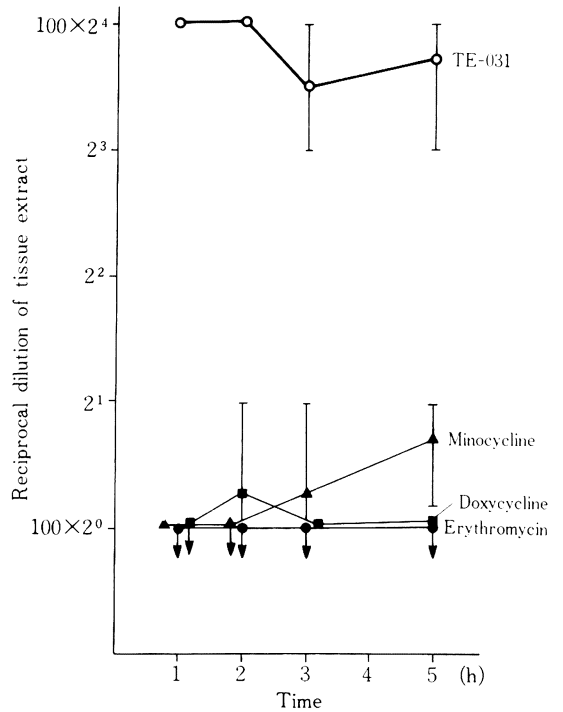


Fig. 2 Anti-chlamydial activity in lung extracts of mice after oral administration of antimicrobial agents



に活性は減少し、8時間では活性は検出できなかった。

肺抽出液中の抗 Chlamydia 活性を Fig. 4 に示した。肺への活性の移行は TE-031 が極めて早く、活性も非常に高く、peak 時の投与 4 時間後では Erythromycin の 30 倍の活性が認められ、8 時間後も高い活性を保持していた。Erythromycin も肺への移行は早く、2 時間で peak に達し、以後活性は速やかに低下し、8 時間では活性は検出されなかった。Doxycycline は Macrolide 系の 2 剤に比し肺への移行は遅く、4 時間以降に活性が認められた。Minocycline は肺組織中の活性は低く、2・4・8 時間後に 3 匹中各 1 匹に低い活性が認められるのみであり、これは血清中の極めて高い活性の持続を反映しているものと考えられる。

Fig. 5 に前立腺抽出液についての成績を示した。Minocycline・Doxycycline は前立腺への活性の移行は遅く、4 時間で活性が検出され、8 時間では活性は 2 倍に上昇した。Erythromycin は 2 時間で活性が検出され、4 時間まではほぼ同程度の活性を保持していたが、8 時間では活性は検出されなかった。一方、TE-031 は前立腺への移行も早く、2 時間で peak 値に達し、他の 3 剤

の 10~20 倍の活性が認められ、8 時間では活性は低下する傾向であったが、高い活性を保持していた。

### Ⅲ. 考 察

Chlamydia に対する抗生物質の効力の評価を、組織培養細胞を用いた *in vitro* の実験系と、抗生物質を経口投与したマウスおよびラットの組織中の抗 Chlamydia 活性を経時的に測定する *semi in vivo* の実験によって行った。*In vitro* 系実験の組織培養法による Chlamydia に対する最小増殖阻止濃度の測定は、HeLa 229 細胞および McCoy 細胞を用いて行った。Monolayer の細胞に *C. trachomatis* D 株または E 株を接種し、吸着 2 時間後に抗生物質入り細胞培養液を加えて培養し、封入体の形成を阻止し得た抗生物質の最小濃度を求めた。Kuo ら<sup>7)</sup>・RIDGWAY ら<sup>3)</sup>の成績と同様各抗生物質の MIC 値は D・E 株間の差は殆ど認められなかったが、使用細胞による感受性差が TE-031 を除く Macrolide 系抗生物質 (Erythromycin・Mioamycin) では認められた。HeLa 229 細胞を用いて測定した MIC 値は Tetracycline 系の 2 剤 (Minocycline・Doxycycline) と Macrolide 系 2 剤

Fig. 3 Anti-chlamydial activity in sera of rats after oral administration of antimicrobial agents

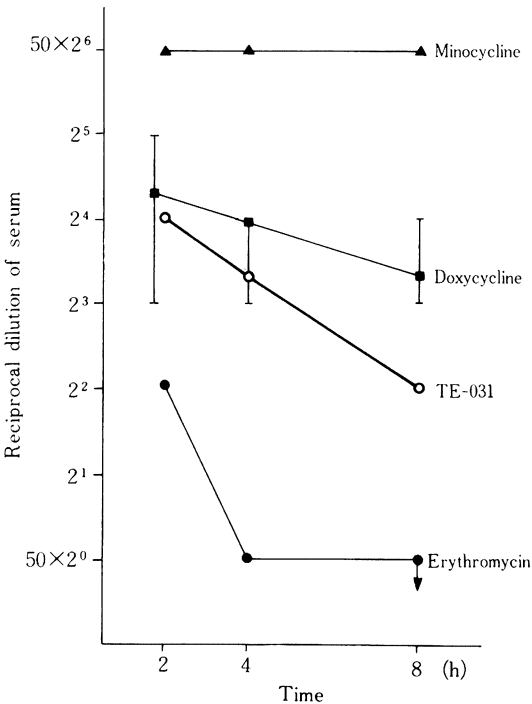
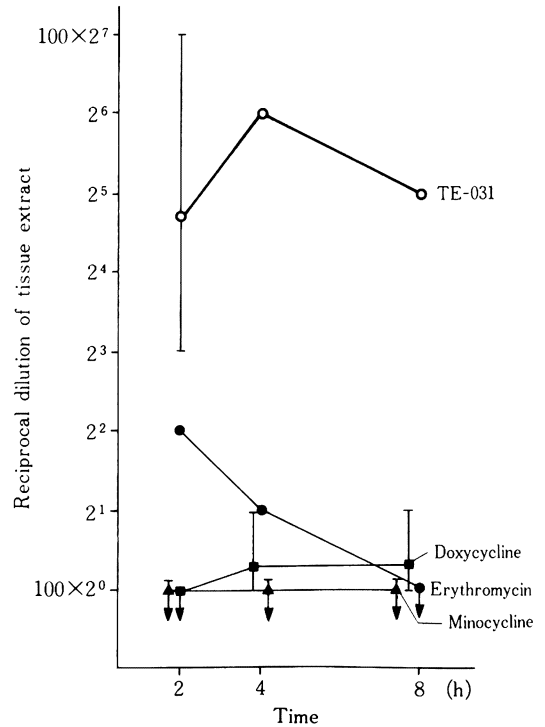


Fig. 4 Anti-chlamydial activity in lung extracts of rats after oral administration of antimicrobial agents

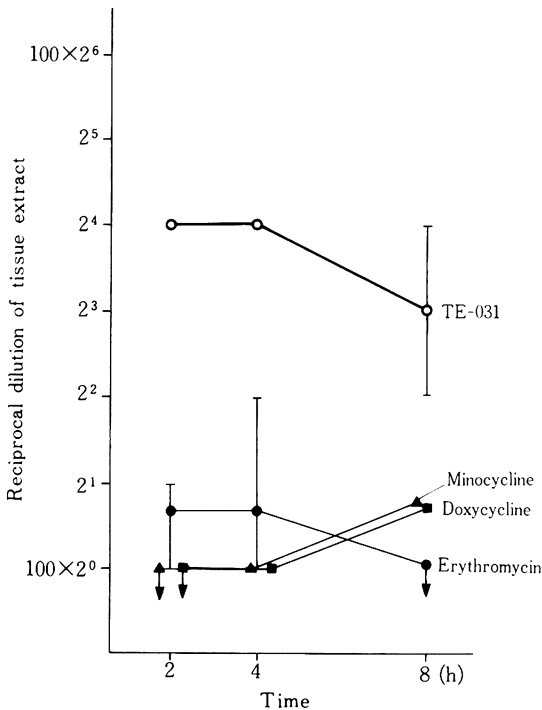


(Erythromycin・TE-031)とは殆ど同程度の成績であった。

Semi *in vivo* 実験では、抗生物質をマウスまたはラットの胃の中にカテーテルで投与し、消化管内での酸・酵素の影響を経た後吸収された抗生物質の Chlamydia の Target 組織たる肺・前立腺などの組織中および血中への移行を経時的に追った。MIC 値測定の結果 Tetracycline 系にも Macrolide 系にも同様に感受性の高かった HeLa 229細胞を用いて、組織抽出液および血清中の抗 Chlamydia 活性を測定し、組織・血液中に移行した活性型の抗生物質の量を比較した。

Tetracycline 系の2剤は、マウス・ラットともに血中への活性の移行は早く、高い活性を長時間維持していたが、肺・前立腺などの組織への活性の移行は遅い。Erythromycin は血中への活性の移行は早いですが速やかに活性は下がり、活性価も Tetracycline 系の2剤に比し低かった。また肺・前立腺への活性の移行は Tetracycline 系のこれら2剤に比し早いですが、経時的活性の低下は著しい。TE-031は血中活性の上昇は Tetracycline 系の2剤と殆ど差がなく、高い活性が認められた。肺・前立腺な

Fig. 5 Anti-chlamydial activity in prostate extracts of rats after oral administration of antimicrobial agents



どの組織への移行は極めて早く、活性も4剤中最も高く、持続もよい。従来の Macrolide 系の抗生物質は活性の持続が Tetracycline 系に比し劣るため、産婦人科・小児科両域では安定性の高い Macrolide 系の抗生物質の開発が待たれていたが、TE-031はこの期待に応え得ることが予測される。

細胞内増殖系の微生物に対する抗生物質の評価を行う場合、*in vitro* の測定方法のみならず、実験動物を用いた評価を行うことが必要と考えられ、動物系を用いた本方法は臨床成績を予測する上で有効な手段となり得てであろう。

## 文 献

- 1) RIDGWAY, G. L. ; J. M. OWEN & J. D. ORIEL : A method for testing the antibiotic susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in a cell culture system. J. Antimicrob. Chemother. 2 : 71~76, 1976
- 2) LEE, C. K. ; W. R. BOWIE & E. R. ALEXANDER : *In vitro* assays for the efficacy of antimicrobial agents in controlling *Chlamydia trachomatis* propagation. Antimicrob. Agents Chemother. 13 : 441~445, 1978
- 3) RIDGWAY, G. L. ; J. M. OWEN & J. D. ORIEL : The antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in cell culture. Br. J. Vener. Dis. 54 : 103~106, 1978
- 4) U. S. Department of Health and Human Services : *Chlamydia trachomatis* infections, Policy Guidelines for Prevention and Control. MMWR suppl. (3s) : 64s~69s, 1985
- 5) BEEM, M. O. ; E. SAXON & M. A. TIPPLE : Treatment of chlamydial pneumonia of infancy. Pediatrics 198~203, 1979
- 6) LENNETTE, E. H. ; A. BALOWS, W. J. HAUSLER & JR. H. J. SHADOMY : Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed., Amer. Soc. Microbiol. Chlamydia (Psittacosis-Lymphogranuloma, Venereum-Trachoma Group) (J. Schachter) 856~862, 1985
- 7) KUO, C. C. ; S. P. WANG & J. T. GRAYSTON : Antimicrobial activity of several antibiotics and sulfonamide against *Chlamydia trachomatis* organisms in cell culture. Antimicrob. Agents Chemother. 12 : 80~83, 1977

## ANTI-CHLAMYDIA ACTIVITY OF TE-031 (A-56268) COMPARED WITH OTHER DRUGS BY TISSUE CULTURE AND *IN VIVO* STUDY

HANAKO YOSHIZAWA and SO HASHIZUME

Department of Pathobiology, School of Nursing, Chiba University, Chiba

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of 4 antibiotics — 2 tetracyclines (minocycline and doxycycline) and 2 macrolides (erythromycin and TE-031) — against *C. trachomatis* were measured by tissue culture. Test cell lines were HeLa 229 and McCoy cells, and strains of *C. trachomatis* were D and E strains. The MIC of each antibiotic against the D strain differed little from that against the E strain. The MICs of 4 antibiotics in HeLa 229 cells were almost the same. While erythromycin was one fifth to one seventh as sensitive to McCoy cells as to HeLa 229 cells, the other 3 antibiotics were equally sensitive to both, i.e., showed little difference in MIC.

After oral administration of the 4 antibiotics to mice and rats, anti-chlamydial activity in serum and tissue extract was measured using HeLa 229 cells at regular intervals. The activity of minocycline and doxycycline appeared very quickly in serum and persisted, while activity appeared only slowly in the lung and prostate and was low. The activity of TE-031 (A-56268) appeared in serum and persisted in almost the same way as those of the two tetracyclines, but appeared earlier and persisted longer in lung and prostate. The activity of erythromycin appeared quickly in serum, but was rather low and decreased markedly with time. Though activity appeared early in lung and prostate, it was lower and decreased faster than that of TE-031.

The results of the administration test in mice and rats suggest this method would be useful for testing the clinical effect of drugs against intracellularly growing organisms such as *Chlamydia*.