

Chlamydia trachomatis に対する sparfloxacin の作用

中村信一・中田勝久・柏本茂樹・梶川文恵
 岡崎欣正・飯田晶敏・大西久美雄・橋本昌久
 大日本製薬株式会社総合研究所*

尿道炎患者から分離された *Chlamydia trachomatis* に対する sparfloxacin (SPFX) の抗菌作用を ofloxacin (OFLX) および minocycline (MINO) と比較検討すると共に、培養細胞を用いて、SPFX および MINO 作用時の本菌の発育環に及ぼす影響について、透過型電子顕微鏡観察を行ない、下記の結果を得た。

1. 臨床分離株 37 株に対する SPFX の MIC₉₀ は 0.063 μg/ml であり、OFLX (MIC₉₀ : 1 μg/ml) の 1/16, MINO (MIC₉₀ : 0.031 μg/ml) の 2 倍であった。

2. *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx に対する SPFX 最小致死濃度 (MLC) は MIC の 2 倍の 0.125 μg/ml であり、OFLX (MLC : 2 μg/ml) の 1/16, MINO (MLC : 0.25 μg/ml) の 1/2 であった。

3. 透過型電子顕微鏡による観察では HeLa 細胞にクラミジア接種直後より SPFX 2 MIC を作用させた場合、封入体の形成は完全に阻害された。これに対して、既に形成された封入体 (接種後 48 時間) に SPFX 2 MIC を 24 時間作用させた場合、封入体内の原始体は変性あるいは崩壊したが、基本小体はほとんど変化しなかった。MINO の 2 MIC を作用させた場合も SPFX とほぼ同様の結果が得られたが、一部の原始体は正常なままであった。従って、SPFX および MINO はいずれも基本小体には作用せず、原始体に作用してクラミジアの増殖を阻害すると考えられる。また、原始体に対する作用は 2 MIC では SPFX の方が MINO より強かった。

これらの結果より SPFX は MINO に匹敵する優れた抗クラミジア剤であると思われる。

Key words : Sparfloxacin, *Chlamydia trachomatis* MIC, MLC, 電子顕微鏡

Chlamydia trachomatis は非淋菌性尿道炎、子宮頸管炎、前立腺炎、卵管炎、封入体性結膜炎、新生児の肺炎、性病性リンパ肉芽腫などを引き起こす病原菌として知られている^{1, 2)}。これら感染症の治療薬として従来からテトラサイクリン系の minocycline (MINO), doxycycline (DOXY) やマクロライド系の erythromycin が主に用いられているが³⁾、最近フルオロキノロン系抗菌剤にも抗クラミジア作用のあることが報告されている^{3-6, 8, 12)}。新規キノロン薬 sparfloxacin (SPFX) は強い抗菌力と広い抗菌スペクトルを有する抗菌剤であるが^{8, 9)}、そのクラミジアに対する作用は強く、MINO および DOXY とほぼ同等の効果を示すことが報告されている¹⁰⁾。今回、SPFX, ofloxacin (OFLX) および MINO の臨床分離 *C. trachomatis* 株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) ならびに標準株の最小致死濃度 (MLC) を調べると共に、*C. trachomatis* の発育環におよぼす薬剤の作用について透過型電子顕微鏡を用い

て調べたので報告する。

I. 実験材料および方法

1. *C. trachomatis* 株

尿道炎患者より分離された *C. trachomatis* 37 株および国立予防衛生研究所より分与された標準株 *C. trachomatis* D/UW-3/Cx を用いた。これらの株は HeLa 229 細胞で増殖後、クラミジア保存液 (sucrose 75 g, KH₂PO₄ 0.52 g, Na₂HPO₄ 1.22 g, glutamic acid 0.72 g, 蒸留水 1,000 ml) に懸濁し、使用時まで -70°C で凍結保存した。

2. 細胞培養

HeLa 229 細胞は国立予防衛生研究所より分与されたものを使用した。培養液は Eagle's essential minimum medium (Eagle's MEM, Flow Lab., USA) に 8% の熱非働化 fetal bovine serum, 0.03% の L-glutamine を添加したものをを用いた。75 cm² の組織培

*〒564 大阪府吹田市江の木町 33-94

養用フラスコ (Flow Lab.) に HeLa 229 細胞を 5% CO₂ 下、37°C で培養し、単層形成を確認後、EDTA-トリプシン溶液で処理することにより、細胞を剝離、遠心洗浄して、 2×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液を 24 穴の平底培養プレート (各穴に直径 14 mm の円形カバーガラスをいれる) に 1 ml ずつ分注し、前記条件で 24 時間前培養したものを実験に供した。

3. 使用薬剤

SPFX および OFLX は大日本製薬(株)総合研究所で合成された原末を用い、MINO は市販品 (Sigma chemical Co., USA) を用いた。

4. MIC の測定

MIC の測定は日本化学療法学会標準法に準じて次のように行なった。HeLa 229 細胞の単層を 1/15 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1 回洗浄し、0.25 ml の *C. trachomatis* 希釈液 [(4×10^4 inclusion forming units (IFU)/ml)] を接種後、日立 05 PR-22 遠心機を用い、室温 (25°C) で 900 g, 60 分間遠心後、5% CO₂ 下、37°C で 60 分間静置培養した。その後、接種液を吸引除去し、ただちに種々の濃度の薬剤を含む培地 (Eagle's MEM に 8% の熱非働化 fetal bovine serum, 0.03% の L-glutamine, 1 μ g/ml の cycloheximide を加えたもの) を各々の穴に 1 ml ずつ分注し、37°C, 5% CO₂ 下で 72 時間培養した。培養後培地を吸引除去し、メタノールで固定、モノクローナル抗体 Micro Trak (Syva, USA) で染色を行ない、蛍光顕微鏡 (倍率 100~200) で封入体の有無を観察し、封入体の全く認められない最小薬剤濃度を MIC とした。

5. MLC の測定

2 系列の HeLa 229 単層培養細胞に *C. trachomatis* 1×10^4 IFU を接種、遠心吸着後、薬剤添加培地に置換、37°C, 5% CO₂ 下で 72 時間培養した。2 系列の一方は封入体形成の有無により MIC を調べ、他方は MLC 測定に用いた。すなわち培地を除去し、PBS で 1 回洗浄後、クラミジア保存液を 0.25 ml ずつ加え、ゴムスパチュラにて細胞を剝離し、-70°C で凍結、融解した。凍結融解液を単層 HeLa 229 細胞に 0.25 ml ずつ接種し、薬

剤を含まない培地で 72 時間培養を行なった。そして同一操作を 5 回繰り返し、封入体形成の全く認められない場合、*C. trachomatis* は死滅していると判断した。*C. trachomatis* を死滅させる最小薬剤濃度を MLC とした。

6. 電子顕微鏡観察

HeLa 229 の単層形成を確認後、*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 1×10^4 IFU を各穴に接種し、上述の方法で一連の操作を行ないクラミジア培養用培地に各薬剤の 2 MIC すなわち SPFX 0.125 μ g/ml および MINO 0.063 μ g/ml を培養直前または培養 48 時間後に添加し、72 時間後迄培養を行なった。対照は薬剤を含まない同一培地で 72 時間培養した。培養終了後、培養液を除去し、0.1 M リン酸緩衝液で 2~3 回洗浄し、ただちに 2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 に溶解) にて 4°C, 1~2 時間固定、次いで 8% ショ糖加 0.1 M リン酸緩衝液で洗浄し、1% オスミウム酸溶液で 1 時間固定した後、アルコールで脱水し、プロピレンオキシドで置換して、エポキシ樹脂に包埋した。MT 2-B ウルトラマイクロトーム (Ivan Sorvall Inc., USA) で超薄切片を作製し、2% 酢酸ウラン、クエン酸鉛による 2 重染色を行ない、日立 H 7000 透過型電子顕微鏡にて 75 KV の加圧電圧で観察を行なった。

7. 蛍光抗体染色検査

培養終了後、培地を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄後、メタノールで固定、*C. trachomatis* 用の Micro Trak で染色し、オリンパス製の蛍光顕微鏡にて観察を行なった。

II. 実験結果

1. 薬剤感受性

尿道炎患者より分離された *C. trachomatis* 37 株に対する MIC を Table 1 に示す。SPFX の MIC は 0.031~0.063 μ g/ml の範囲で MIC₅₀, MIC₉₀ はともに 0.063 μ g/ml であり、SPFX 耐性株は認められなかった。OFLX の MIC は 0.5~1 μ g/ml の範囲で MIC₅₀ は 0.5 μ g/ml, MIC₉₀ は 1 μ g/ml, また MINO の MIC

Table 1. *In vitro* antichlamydial activity of sparfloxacin and reference compounds against 37 clinically isolated strains of *C. trachomatis*

Drugs	MIC (μ g/ml)		
	range	50%	90%
Sparfloxacin	0.031~0.063	0.063	0.063
Ofloxacin	0.5~1.0	0.5	1
Minocycline	0.016~0.063	0.016	0.031

Table 2. Minimal lethal concentrations (MLC) of sparfloxacin, ofloxacin and minocycline against *C. trachomatis* D/UW-3/Cx

Drug	MIC (μ g/ml)	MLC ₅₀ (μ g/ml)
Sparfloxacin	0.063	0.125
Ofloxacin	1	2
Minocycline	0.031	0.25

は $0.016 \sim 0.063 \mu\text{g/ml}$ の範囲で MIC_{90} は $0.016 \mu\text{g/ml}$, MIC_{50} は $0.031 \mu\text{g/ml}$ であった。SPFX の MIC_{90} は OFLX の $1/16$ であり、MINO の 2 倍であった。

2. 最小致死濃度

C. trachomatis D/UW-3/Cx に対する SPFX, OFLX および MINO の MIC と MLC を Table 2 に示す。SPFX の MLC は 2 MIC に相当する $0.125 \mu\text{g/ml}$ であり、OFLX の MLC も MIC の 2 倍に相当する $2 \mu\text{g/ml}$ であった。MINO の MLC は MIC の 8 倍に相当する $0.25 \mu\text{g/ml}$ であった。従って SPFX 殺クラミジア作用は MINO よりも強く、その MLC は 3 剤中最も低かった。

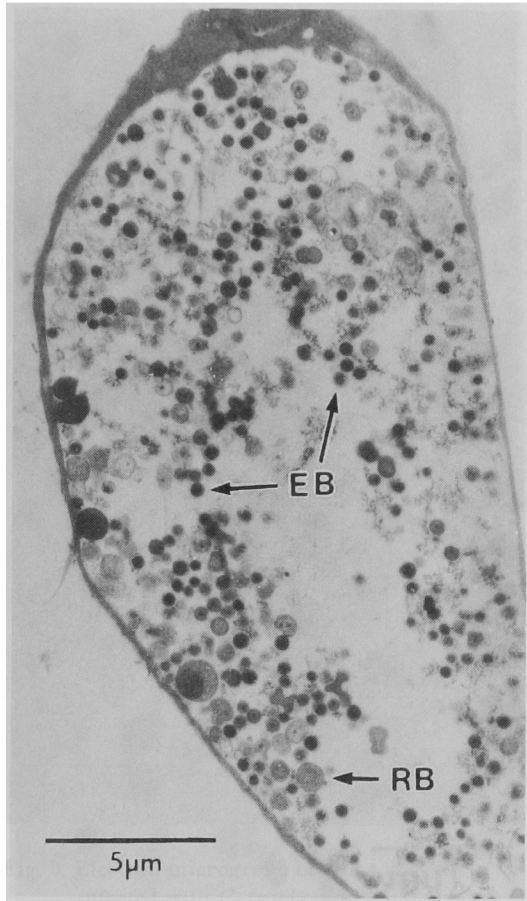


Fig. 1. Electron micrograph of HeLa 229 cells cultured for 72 h after infection with *C. trachomatis*
EB : elementary body, RB : reticulate body

3. 電子顕微鏡による観察

Fig. 1 は薬剤無添加の *C. trachomatis* D/UW-3/Cx の培養 72 時間後の封入体の弱拡大像である。封入体内部は多数の基本小体 (EB) で充満しており、原始体 (網状体ともいう、RB) も認められた。また、封入体内部の間隙はグリコゲンと思われる物質で満たされていた。

Fig. 2 は同一材料の強拡大所見を示す。基本小体は中央に電子密度の高い核を有し、周囲は膜で囲まれていた。原始体は基本小体よりやや大きく電子密度はやや低かった。培養直前に SPFX $0.125 \mu\text{g/ml}$ (2MIC) または MINO $0.063 \mu\text{g/ml}$ (2MIC) を加え、72 時間培養した場合には HeLa 細胞内には封入体の形成は全く認められなかった。

Fig. 3 は培養後 48 時間に SPFX $0.125 \mu\text{g/ml}$ (2

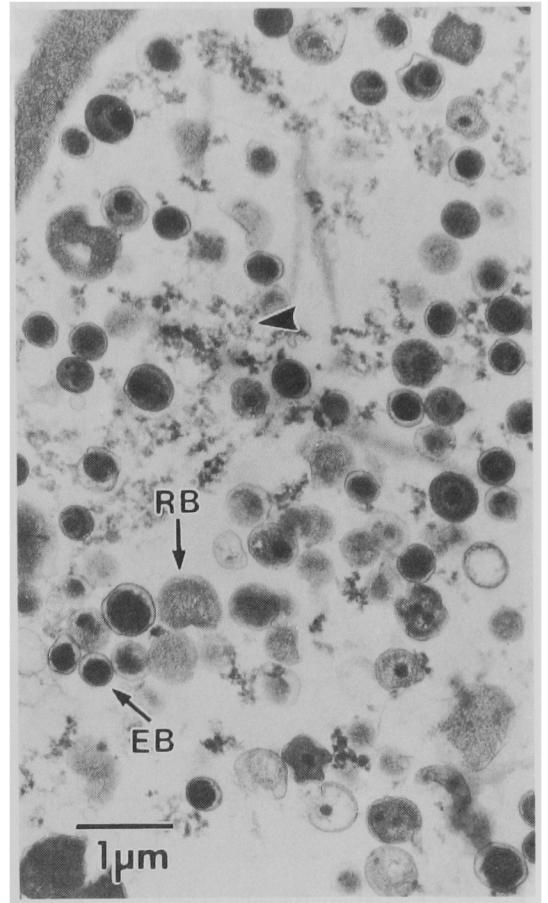


Fig. 2. Higher magnification of Fig. 1
EB : elementary body, RB : reticulate body,
arrow head : glycogen granules

MIC)を加え、更に24時間培養した後の像である。基本小体は対照とはほぼ同じ像であるが、原始体は対照で見られたような電子密度のものは全くなき、変形あるいは空洞化していた。

Fig. 4はFig. 3の強拡大像を示す。原始体は内部構造が崩壊し、空虚となり、著しく膨化していた。

Fig. 5はMINO 0.063 $\mu\text{g/ml}$ (2 MIC)を作用させた場合の強拡大像である。基本小体には変化は見られなかった。原始体の大部分は崩壊していたが、一部正常な原始体も見られた。

4. 蛍光抗体染色所見

Fig. 6は対照の培養細胞を蛍光抗体染色した所見を示す。HeLa 229細胞内に形成された多数の封入体はク

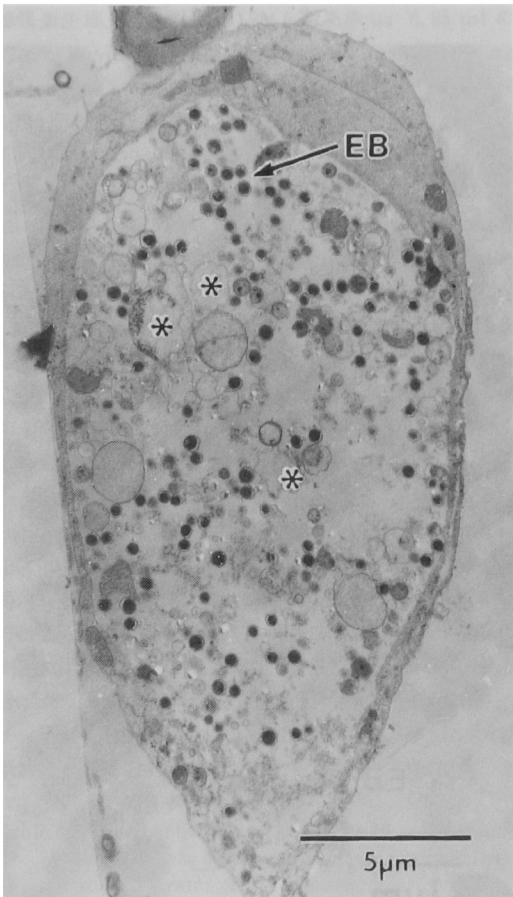


Fig. 3. Electron micrograph of HeLa 229 cells infected with *C. trachomatis* and treated with 0.125 $\mu\text{g/ml}$ sparfloxacin for 24 h (48–72 h after infection)
EB : elementary body
asterisk : reticulate body shadow

リアーに染色されていた。

Fig. 7はSPFX 0.125 $\mu\text{g/ml}$ を培養後48時間より72時間までの24時間作用させた後の写真である。蛍光物質の量は対照と比べて大差はないが、染色されている封入体に変形が見られた。

Fig. 8は同一条件でMINO 0.063 $\mu\text{g/ml}$ を作用させたものである。蛍光物質の量は対照と比べてやや少なかった。

III. 考 察

尿道炎患者より分離された *C. trachomatis* 37株に対するSPFX, OFLXおよびMINOのMIC₉₀はそれぞれ0.063, 1および0.031 $\mu\text{g/ml}$ であり、SPFXのMIC₉₀はOFLXの1/16, MINOの2倍であった。一

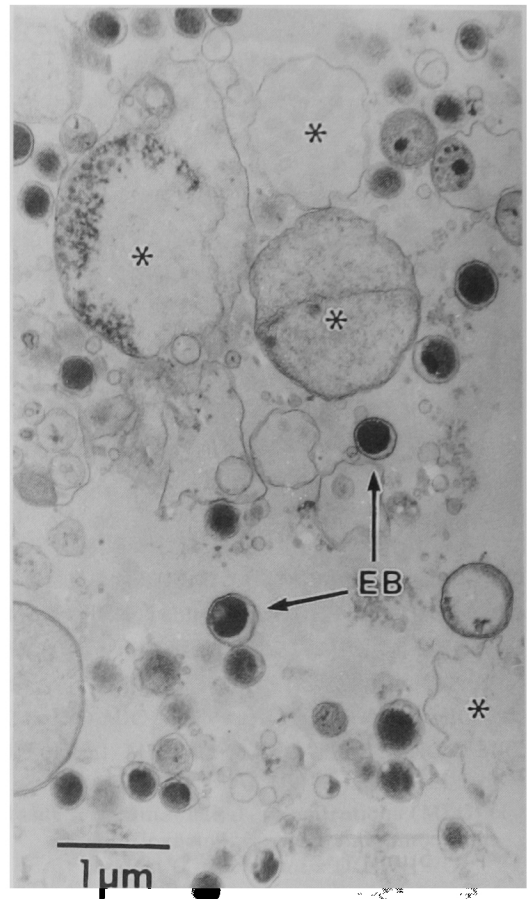


Fig. 4. Higher magnification of Fig. 3
EB : elementary body, asterisk : reticulate body shadow

方、標準株で調べた SPFX, OFLX および MINO の MLC はそれぞれ 0.125, 2 および 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、SPFX および OFLX では MIC の 2 倍、MINO では MIC の 8 倍であった。MINO の MLC については細村らも MIC の 10 倍であると報告しており¹³⁾、我々の成績とよく一致している。この結果は MLC を見る限り、SPFX はこの 3 剤中最も抗クラミジア作用が強いことを示している。

次に SPFX および MINO の *C. trachomatis* 発育環に及ぼす影響を電子顕微鏡で観察した。*C. trachomatis* の発育環は一般に次の如くであると考えられている¹³⁾。

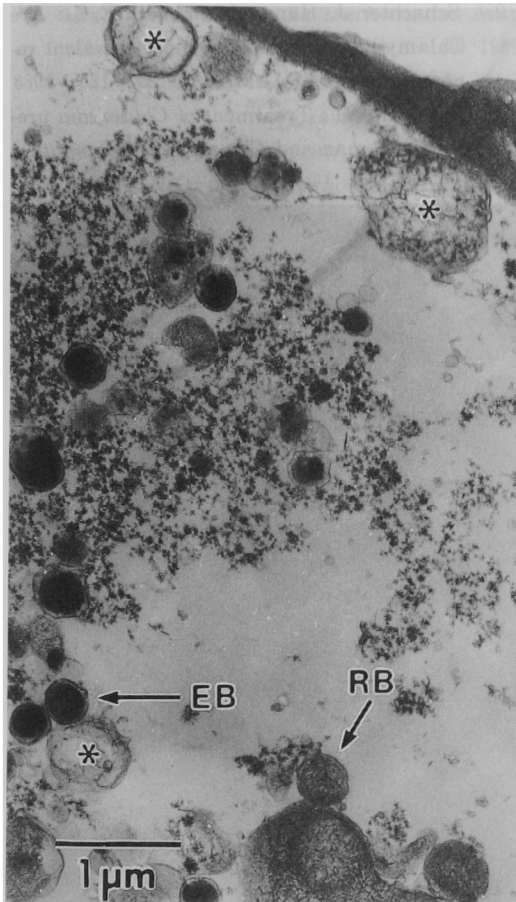


Fig. 5. Electron micrograph of HeLa 229 cells infected with *C. trachomatis* and treated with 0.063 $\mu\text{g}/\text{ml}$ minocycline for 24 h (48–72 h after infection)
EB : elementary body, RB : reticulate body, asterisk : reticulate body shadow

C. trachomatis 接種 1 時間位迄に基本小体は細胞表面に吸着し、エンドサイトーシスにより細胞内に入り、数時間で細胞質深部に達し、8–12 時間で基本小体はその数倍の大きさの原始体に成長し、内部構造も網状に変化して分裂増殖を繰り返し、48–72 時間後には基本小体が充満した大きな封入体が完成し、その後、次第に封入体が破壊し、感染性のある基本小体が細胞外に放出される。今回の観察でも、接種 72 時間後の対照では、多数の基本小体と原始体を含む大きな封入体が認められた。クラミジア接種直後に、2 MIC 濃度の SPFX または MINO を添加すると封入体の形成は全く認められなかった。クラミジアが分裂増殖中と思われる接種 48 時間後に SPFX (2 MIC) を添加すると、72 時間後には全ての原始体の内部構造は崩壊し、空虚化していたが、基本小体には変化は見られなかった。MINO (2 MIC) では大部分の原始体の内部構造は崩壊したが、一部正常な原始体も認められ、また基本小体はほぼ正常であった。すなわち SPFX は 2 MIC で全ての原始体を崩壊させるが、MINO は 2 MIC では原始体の崩壊は不完全で

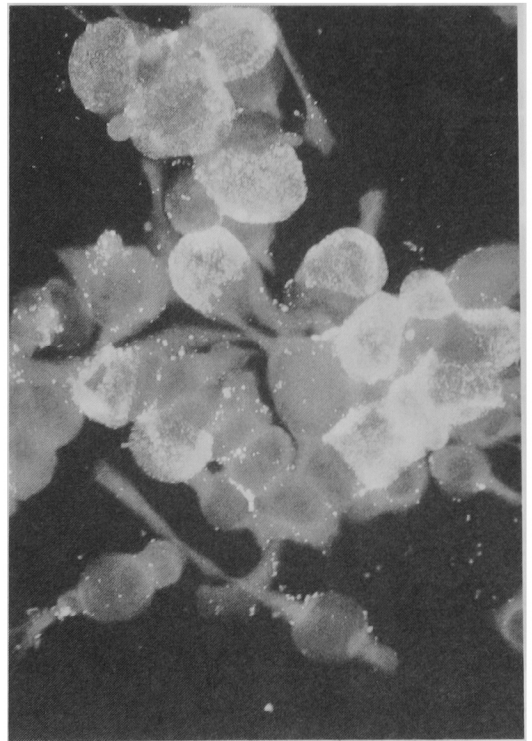


Fig. 6. Microscopic findings in immunofluorescence-stained HeLa 229 cells cultured for 72 h after infection with *C. trachomatis*

あった。この結果は SPFX の 2 MIC は MLC に、MINO の 2 MIC は 1/4 MLC に相当することと対応しているように思われる。また、既に完成された基本小体にはほとんど変化が見られないことから、両剤共、原始体の増殖過程でのみ作用を発揮し得るものと思われる。この結果は OFLX で三井らが報告している結果¹⁴⁾とほぼ同じである。

蛍光顕微鏡による観察では、接種 48 時間後に SPFX (2 MIC) を添加した場合、72 時間後には抗クラミジア抗体による蛍光は対照と大差なかったが、MINO (2 MIC) を添加した場合、蛍光量はやや少なかった。これは MINO の作用機作が蛋白合成阻害¹¹⁾であり、クラミジア抗原の合成が抑制されたためではないかと思われる。SPFX の作用機作は DNA ジャイレース阻害⁹⁾なので、クラミジア抗原の産生には大きな影響を与えなかったであろう。

クラミジア感染症に対し、テトラサイクリン系抗生物

質は最も優れた薬剤であると考えられている。今回、新規キノロン薬 SPFX の抗クラミジア作用を MINO と比較のもとに調べた結果、SPFX は MINO と同等若しくはやや優れた抗クラミジア作用を示すことが明らかになった。SPFX はクラミジア感染症に臨床使用し得る価値のある薬剤であると思われる。

文 献

- 1) Taylor-Robinson D and Thomas B J : The role of *Chlamydia trachomatis* in genital-tract and associated disease. *J Clin Pathol* 33 : 205~233, 1980
- 2) Schachter J, Hanna L and Hill E C : Are *Chlamydia* infections the most prevalent venereal disease ? *JAMA* 231 : 1252~1255, 1988
- 3) Scheibel J H : Treatment of *Chlamydia* urethritis in man and *Chlamydia trachomatis*-

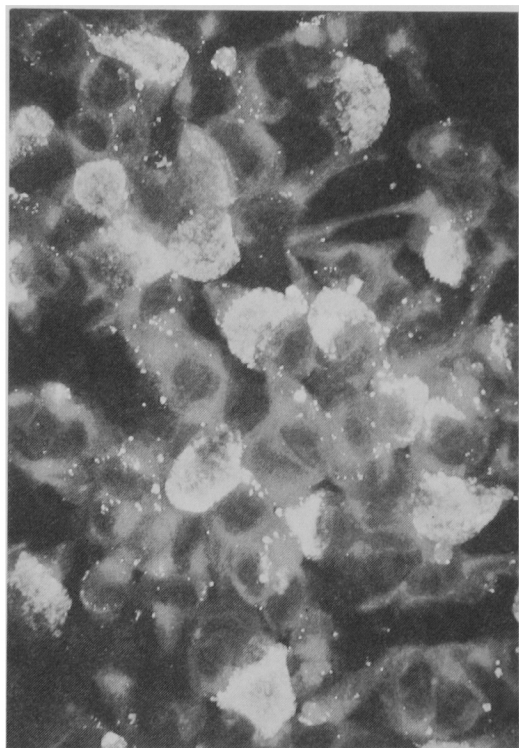


Fig. 7. Microscopic findings in immunofluorescence-stained HeLa 229 cells infected with *C. trachomatis* and treated with 0.125 μ g/ml sparfloxacin for 24 h (48-72 h after infection)

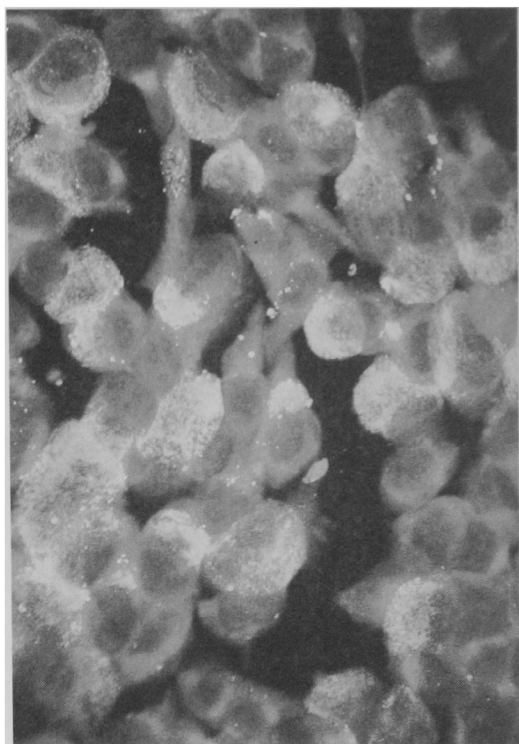


Fig. 8. Microscopic findings in immunofluorescence-stained HeLa 229 cells infected with *C. trachomatis* and treated with 0.063 μ g/ml monocyline for 24 h

- positive female partners : Comparison of erythromycin and tetracycline in treatment courses of one week. *Sex Transm Dis* 10 : 128~131, 1982
- 4) Frans W, Heessen A and Muytjens H : *In vitro* activity of ciprofloxacin, norfloxacin, pipemidic acid, cinoxacin and nalidixic acid against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 25 : 123~124, 1984
 - 5) Segreti J, Kessler H A, Kapell K S and Trenholme G M : *In vitro* activities of temafloxacin (A-62254) and four other antibiotics against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 33 : 118~119, 1989
 - 6) Talobot H and Romanowski B : *In vitro* activities of lomefloxacin, tetracycline, penicillin, spectinomycin, and ceftriaxone against *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 33 : 2049~2051, 1989
 - 7) Maeda H, Fujii A, Nakata K, Arakawa S and Kamidono S : *In vitro* activities of T-3262, fleroxacin (AM - 833 ; Ro 23 - 6240), and other new quinolone agents against clinically isolated *Chlamydia trachomatis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 32 : 1080~1081, 1988
 - 8) Nakamura S, et al. : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AT-4140, a new broad-spectrum quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 33 : 1167~1173, 1989
 - 9) Kojima T, Inoue M and Mitsuhashi S : *In vitro* activity of AT-4140 against clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 33 : 1980~1988, 1989
 - 10) Nakata K, Maeda H, Fujii A, Arakawa S, Umezu K and Kamidono S : *In vitro* and *in vivo* activities of AT-4140 and six new quinolone antimicrobial drugs against *Chlamydia trachomatis*. 29th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother abstr no 1200, 1989
 - 11) 上田 泰, 清水喜八郎 : 化学療法ハンドブック。P 166~174, 永井書店, 大阪, 1986
 - 12) Nagayama A, Nakao T and Tane H : *In vitro* activities of ofloxacin and four other new quinolone-carboxylic acids against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 32 : 1735~1737, 1988
 - 13) 石井英昭 : McCoy 細胞における生殖器由来 *Chlamydia trachomatis* 増殖環の超微形態学的研究。感染症学雑誌 62 : 85~95, 1989
 - 14) 三井幸彦, 大黒成夫, 藤本道正, 東堤 稔 : フルオロキノロンのクラミディアトラコマチスに対する効果とその作用機序。日眼会誌 92 : 91~98, 1989
 - 15) 細村泰夫 : McCoy 細胞における生殖器由来 *Chlamydia trachomatis* 増殖環に対する mynocyline の阻害効果に関する研究。感染症学雑誌 64 : 310~320, 1990

ANTICHLAMYDIAL ACTIVITY OF SPARFLOXACIN

Shinichi Nakamura, Katsuhisa Nakata, Shigeki Kashimoto, Fumie Kajikawa,
Yoshimasa Okazaki, Masatoshi Iida, Kumio Ohnishi and Masahisa Hashimoto
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.
Enoki-cho 33-94, Suita, Osaka 564, Japan

Antichlamydial activity of sparfloxacin (SPFX) was examined in comparison with that of ofloxacin (OFLX) and minocycline (MINO) with the following results.

1. The MIC_{90} of SPFX for 37 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* was $0.063 \mu\text{g/ml}$, while the MIC_{90} s of OFLX and MINO were 1 and $0.031 \mu\text{g/ml}$, respectively.

2. The minimum lethal concentration of SPFX for *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx was $0.125 \mu\text{g/ml}$, twice the MIC ($0.063 \mu\text{g/ml}$), while that of OFLX was $2 \mu\text{g/ml}$, twice the MIC ($1 \mu\text{g/ml}$), and that of MINO was $0.25 \mu\text{g/ml}$, 8 times the MIC ($0.031 \mu\text{g/ml}$).

3. Transmission electron microscopic observation revealed that SPFX and MINO specifically disrupted reticulate bodies but not elementary bodies. The degree of disruption of reticulate bodies was more marked under SPFX treatment (2 MIC) than under MINO treatment (2 MIC).

These results indicate that SPFX is as potent as MINO as an antichlamydial agent.