

## Temafloracin のマウス実験的肺炎桿菌性肺炎に対する治療効果

谷 佳都・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所\*\*

(\*現 田辺製薬株式会社薬理研究所)

*Klebsiella pneumoniae* B-54 によるマウス肺炎モデルに対する temafloracin (TMFX) の抗菌効果を全身オートバクテリオグラフィーを用いて ofloxacin (OFLX) および ciprofloxacin (CPFX) と比較した。その結果, TMFX の 12.5 mg/kg および 3.13 mg/kg を1回経口投与後のマウス全身オートバクテリオグラムにおける感染菌の分布密度は無投与対照群に比べて著明に減少した。その分布密度から観察された TMFX の抗菌効果は OFLX と比べて同等もしくはやや優れ, CPFX よりも明らかに優れていた。肺炎マウスに TMFX の 12.5 mg/kg を1回経口投与後の肺内濃度は投与 30 分後では  $1.62 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$  で OFLX と同等であったが, 1時間後からは TMFX の方が高濃度に推移し, 4時間後でも  $0.95 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$  を維持した。また, 肺炎マウスにおける肺内殺菌作用および感染菌の *K. pneumoniae* B-54 に対する *in vitro* 殺菌作用において, TMFX は OFLX よりも強い殺菌作用を示した。

**Key words** : temafloracin, 肺炎モデル, 全身オートバクテリオグラフィー, 肺内濃度, 殺菌作用

臨床における抗菌剤の治療効果を予測するためには臨床により近い感染モデルを用いてその薬効を検討することが望まれる。松本ら<sup>1)</sup>は肺炎桿菌の噴霧吸入により, 致死性のマウス肺炎モデルを作成し, 抗菌剤の治療効果を解析している。我々は temafloracin の *in vivo* 抗菌作用として, マウス実験感染に対する治療効果を検討し, *Klebsiella pneumoniae* B-54 を用いたマウス肺炎モデルにおける治療効果についても報告した<sup>2)</sup>。前報では本モデルにおける TMFX の治療効果をマウス生存率によって ofloxacin および ciprofloxacin と比較したが, 今回, さらに詳しく全身オートバクテリオグラフィーを用いて検討し, また, 肺炎マウスでの肺内殺菌作用および肺内濃度についても検討したので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用動物

SLC : ddY 系雄マウス(4週齢, 体重  $20 \pm 1\text{g}$ )を用いた。

## 2. 使用薬剤

Temafloracin(TMFX, Lot. 17-817-AL) は Abbott 社の合成品を用いた。対照薬剤は ofloxacin(OFLX, 第一製薬)および ciprofloxacin(CPFX, バイエル薬品)を用い, 市販品より遊離塩に抽出精製して使用した。経口投与には TMFX および CPFX は滅菌水に溶解または

懸濁して用い, OFLX は 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム(ナカライテスク)に懸濁して用いた。*In vitro* 抗菌活性および濃度測定には各薬剤とも 1/10 量の 0.1N-水酸化ナトリウムを添加し溶解して使用した。

## 3. 使用菌株

マウスの噴霧感染には, 長崎大学熱研内科松本教授より分与された *K. pneumoniae* B-54 を用いた。マウス全身オートバクテリオグラム (ABGM) の作製には, マウス切片中の腸内細菌および操作中の汚染菌を抑えて感染菌のみを選択的に培養するためにリファンピシン耐性株 (RFP<sup>r</sup>) を誘導<sup>3)</sup>して用いた。

## 4. マウスの噴霧感染および薬剤投与

*K. pneumoniae* B-54 または *K. pneumoniae* B-54 RFP<sup>r</sup> をハートインフュージョン寒天(HIA, 栄研)斜面培地で 37°C, 18 時間培養後, 滅菌生理食塩液で約  $4 \times 10^9$  CFU/ml に懸濁し, その 10ml を噴霧感染装置(池本理化工業)内のマウスにネブライザーを用いて  $1\text{kg}/\text{cm}^2$  の圧力で約 40 分間噴霧した。薬剤は感染 18 時間後に1回経口投与した。

## 5. 肺炎マウスの全身 ABGM の作製

肺炎マウスの全身 ABGM は佐久間ら<sup>4)</sup>および先に報告した方法<sup>3)</sup>に準じて作製した。すなわち, 感染 18 時間後に TMFX, OFLX または CPFX の 12.5

mg/kg および 3.13 mg/kg を経口投与し、薬剤投与 48 時間後にマウスをクロロホルムガスで麻酔死させ、 $-40^{\circ}\text{C}$  に調節したドライアイス-アセトン中で凍結した。凍結マウスから  $-15^{\circ}\text{C}$  クリオスタット内マイクローム(オートクライオトム, 中川製作所)を用い、滅菌生理食塩液に浸したガーゼを支持体として厚さ 50  $\mu\text{m}$  の全身水平縦切切片を作製した。マウス切片は肺の観察がしやすいように水平縦切断面とした。RFP 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  およびトリフェニールテトラゾリウムクロリド (TTC) 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む HIA 平板上にマウス切片をのせて  $37^{\circ}\text{C}$ 、18 時間培養した。TTC は生菌細胞内で還元されてトリフェニールホルマザンの赤色沈澱を生じるため、寒天平板上で赤色の細菌集落が観察出来る。各薬剤投与群および無投与対照群は一群 6 匹のマウスを用いて実施し、薬剤投与 48 時間後に生存したマウスの ABGM を作製した。マウス切片での感染菌の分布および密度は写真撮影により記録した。

#### 6. 肺炎マウスの臓器内生菌数の測定

肺炎マウスの肺、肝臓および脾臓の生菌数は一時点 6 匹のマウスについて測定した。感染 18 時間後に TMFX または OFLX の 12.5 mg/kg を 1 回経口投与したマウスの肺内生菌数は一時点 5 匹のマウスについて測定した。経時的にマウス臓器を無菌的に取り出し、滅菌生理食塩液を加えてホモジナイズした後、HIA を用いた混釈培養法により生菌数を測定し、全臓器あたりの対数平均値  $\pm$  SD で示した。

#### 7. 血清中および肺内濃度の測定

感染 18 時間後に TMFX または OFLX の 12.5 mg/kg を 1 回経口投与し、一時点 5 匹のマウスについて各濃度を測定した。血清は経時的に採血して遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3000rpm, 10分) し、肺は放血後採取して 1/15M PBS (pH 7.0, ヤトロン) で洗浄し、両試料は測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。血清試料は希釈せず、肺は 1/15 M PBS を加えてホモジナイズし、 $4^{\circ}\text{C}$ 、3000rpm, 10 分の遠心上清を測定試料とした。TMFX および OFLX の各濃度は武田ら<sup>9)</sup> の bioassay 法に準じ、検定菌 *Escherichia coli* Kp を用いてペーパーディスク法により測定し、平均値  $\pm$  SD で示した。なお、両剤の測定限界はいずれも血清が 0.16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、肺が 0.62  $\mu\text{g}/\text{g}$  であった。

#### 8. MIC および *in vitro* 殺菌作用の測定

*K. pneumoniae* B-54 に対する薬剤の MIC は日本化学療法学会標準法<sup>6)</sup> に従い、寒天平板希釈法により接種菌量  $10^6$  CFU/ml で測定した。*In vitro* 殺菌作用は感受性測定用ブイヨン(ニッスイ)に  $37^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養した *K. pneumoniae* B-54 を同ブイヨンで希釈し、

さらに振盪培養により対数期まで増殖させた後、6.0 log CFU/ml および 8.0 log CFU/ml 接種菌量液を調整し薬剤を添加して培養した。生菌数は経時的に培養液を採取し、滅菌生理食塩液で希釈後 HIA を用いた混釈培養法により測定し、対数値で示した。

## II. 実験結果

### 1. 肺炎マウスの臓器内生菌数推移

薬剤治療効果の全身 ABGM 作製に先立ち、薬剤投与時期および効果判定時期を設定するため肺炎マウスの臓器内生菌数推移を検討し、その結果を Fig. 1 に示した。感染 18 時間後では肺、肝臓および脾臓の生菌数は感染直後と同等であったが、42 時間後にはマウスに個体差が認められたものの、肺での菌数増加よりも肝臓および脾臓において著しい増加を認めた。また、66 時間後では生存マウスにおいて肺内菌数の著しい増加が認められ、肝臓および脾臓でも増加の傾向を示した。マウスの死亡は 66 時間後で 12 例中 4 例に認められ、18 および 42 時間後では認められなかった。

### 2. 全身 ABGM による治療効果の比較

噴霧感染 18 時間後のマウスに各薬剤 12.5 mg/kg および 3.13 mg/kg を 1 回経口投与し、薬剤投与 48 時間(感染 66 時間)後の各 6 例の ABGM を Fig. 2 に示した。

TMFX の 12.5 mg/kg 投与では 1 例が死亡した。生存 5 例のうち 3 例には肺で感染菌を認めず、4 例では肝臓および脾臓にも感染菌は認められなかった。1 例では肺で感染菌は少ないものの、肝臓および脾臓には密に菌が認められた。3.13 mg/kg 投与では 2 例が死亡し、生存した 4 例のうち 2 例では肺および胃と腸でわずかに感染菌を認め、他の 2 例では肺、肝臓および脾臓に密に菌が認められた。

OFLX の 12.5 mg/kg 投与では 2 例に全く感染菌を認めず、1 例では腸にのみ感染菌を認めた。しかし、他の 3 例では肝臓、脾臓に密に感染菌を認め、そのうち 2 例は全身の感染像を示した。3.13 mg/kg 投与では 3 例が死亡した。生存 3 例のうち 1 例は肺および腸に少数の感染菌を認めたが、他の 2 例は肺に密に菌を認め、このうち 1 例は全身の感染像を示した。

CPFx の 12.5 mg/kg 投与では 1 例が死亡した。1 例で肺および胃と腸に少数の感染菌を認め、4 例は全身の感染像を示した。3.13 mg/kg 投与では 5 例が死亡し、生存 1 例も全身の感染像を示した。なお、感染対照群は 4 例が死亡し、2 例が全身の感染像を示した。

### 3. 肺内殺菌効果

噴霧感染 18 時間後のマウスに TMFX および OFLX の 12.5 mg/kg を 1 回経口投与した場合の肺内

生菌数推移を Fig. 3 に示した。肺炎マウスの薬剤投与前の肺内菌数は  $5.1 \pm 0.4 \log \text{CFU}$  であったが、薬剤投与 1 時間後には TMFX は  $3.9 \pm 0.4 \log \text{CFU}$ 、OFLX は  $3.2 \pm 0.4 \log \text{CFU}$  に菌数を減少させた。その後 12 時間まで両剤は感染対照群に比べ菌数の減少を持続した。投与後 2 時間までは OFLX の方が TMFX よりも低い肺内菌数を示したが、4 時間以降では TMFX の方が低い菌数を推移し、8 時間後の両群の菌数間には統計学的に有意差を認めた。また、TMFX は投与 8 時間後まで殺菌的に肺内菌数を減少させたが、OFLX は 30 分以降 12 時間後まで静菌的作用しか示さなかった。

#### 4. 肺炎マウスにおける血清および肺内濃度

噴霧感染 18 時間後のマウスに TMFX および OFLX の  $12.5 \text{ mg/kg}$  を 1 回経口投与した場合の血清および肺内濃度推移を Fig. 4 に示した。血清中濃度は薬剤投与 30 分後では OFLX の方が約 1.3 倍高い値を示したが、1 時間後で同等、2 時間および 4 時間後では TMFX の方が 1.6 倍および 3.3 倍高い値を示し、6 時間以降でも TMFX の方が高く推移した。肺内濃度は投与 30 分後では TMFX :  $1.62 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$  および OFLX :  $1.61 \pm 0.38 \mu\text{g/g}$  と両剤同等であったが、1 時間後には TMFX の方が 1.3 倍高い値を示した。2

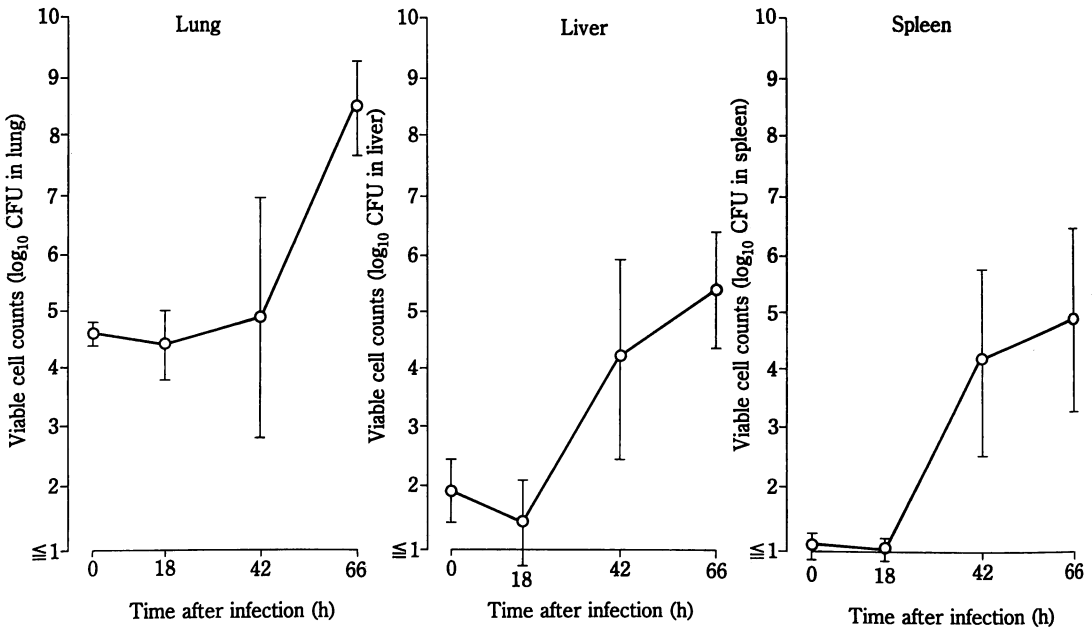
時間以降には OFLX の肺内濃度は測定限界以下となったが、TMFX は 4 時間後でも  $0.95 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$  と高濃度で推移した。

#### 5. *K. pneumoniae* B-54 に対する *in vitro* 殺菌作用

*K. pneumoniae* B-54 に対する TMFX および OFLX の *in vitro* 殺菌作用を Fig. 5 に示した。様々な状態の感染肺における殺菌効果を想定し、接種菌量  $6.0 \log \text{CFU/ml}$  (A, B) および  $8.0 \log \text{CFU/ml}$  (C, D) について検討した。 $6.0 \log \text{CFU/ml}$  接種では  $1 \mu\text{g/ml}$  で TMFX および OFLX とも強い殺菌作用を示した。 $0.1 \mu\text{g/ml}$  では TMFX は 4 時間後まで殺菌的に作用したが、それ以降は静菌的に作用した。これに対して、OFLX は 4 時間後まで静菌的に作用し、それ以降には再増殖が認められた。 $8.0 \log \text{CFU/ml}$  接種では  $10 \mu\text{g/ml}$  および  $1 \mu\text{g/ml}$  で両剤ともに殺菌作用を示したが、6 時間以降に TMFX の方が強い殺菌作用を示した。 $0.1 \mu\text{g/ml}$  では両剤とも静菌的に作用した。

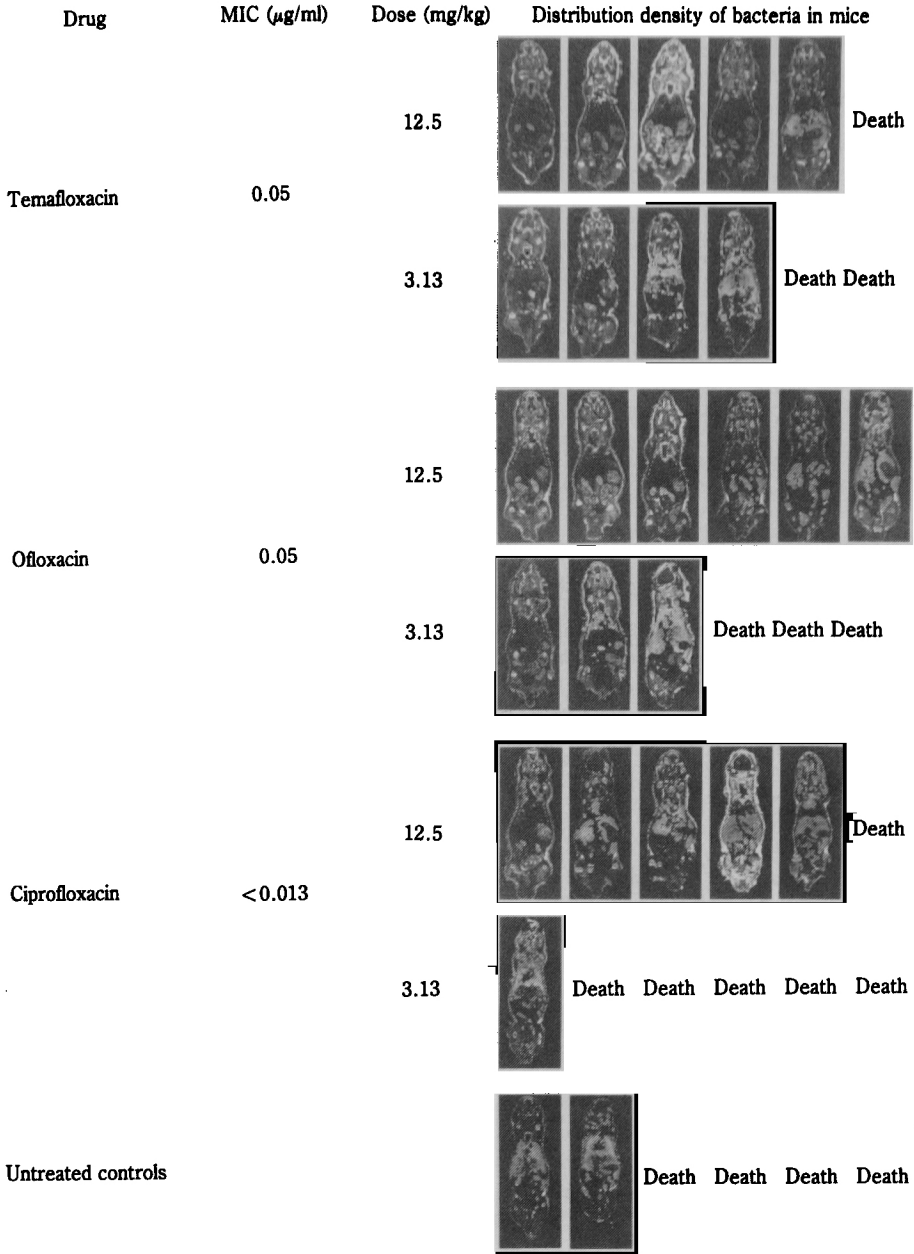
### III. 考 察

マウスの *K. pneumoniae* B-54 による肺炎モデルでは噴霧感染 12 時間後から肺に肉眼的肺炎病巣が出現し、24 時間以降その病巣が明瞭となり、36 時間以降には多発性膿瘍が形成され、48~72 時間後にはマウス全例が肺炎死すると報告されている<sup>1)</sup>。そこで、



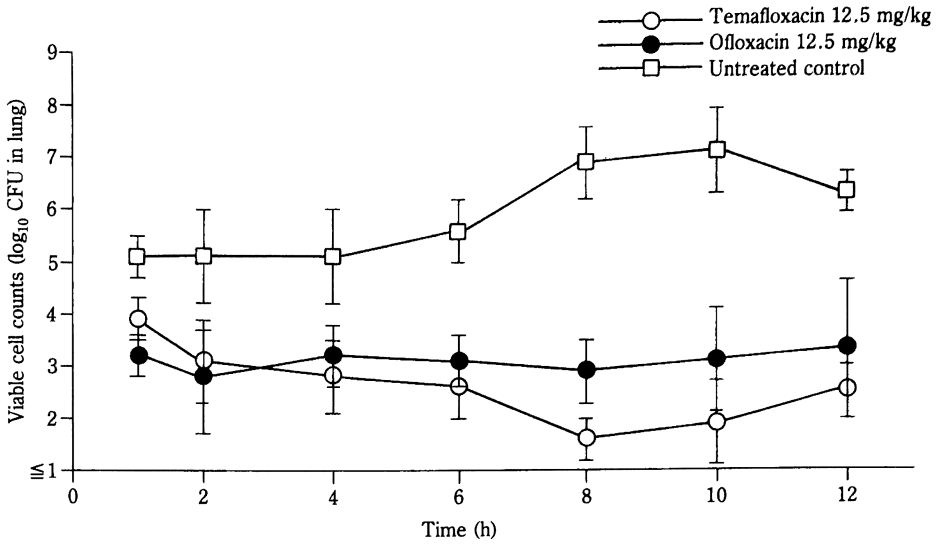
Each point and bar represents the mean and standard deviation of six mice.

Fig. 1. Bacterial cell counts in lung, liver and spleen of mice infected with *Klebsiella pneumoniae* B-54.



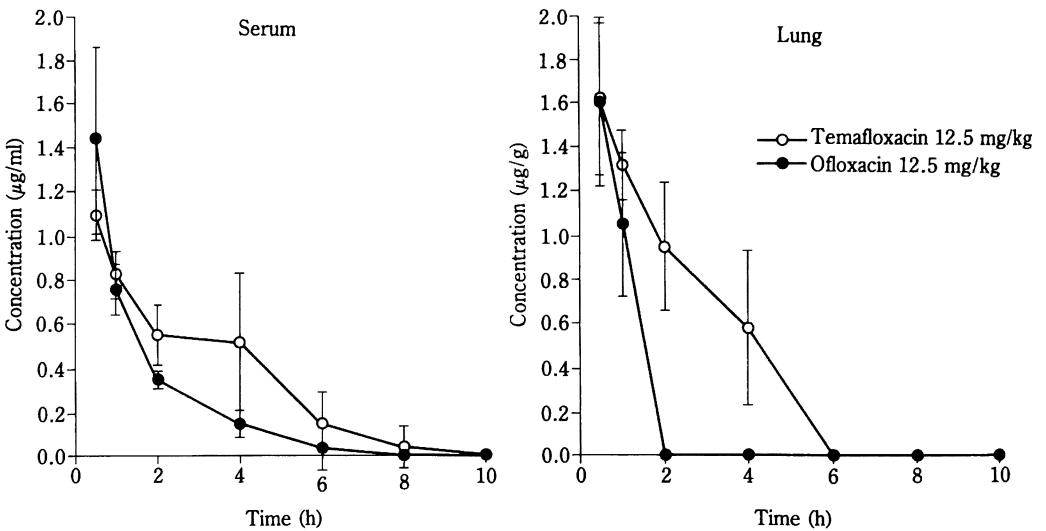
Drugs were administered orally 18 hours after infection. Mice were frozen for autobacteriography 48 hours after drug administration.

Fig. 2. Comparison of the antibacterial effects of temafloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin by whole body autobacteriography in mice infected with *Klebsiella pneumoniae* B-54 RFP<sup>r</sup>.



Drugs were administered orally 18 hours after infection.  
 Each point and bar represents the mean and standard deviation of five mice.

Fig. 3. Bacterial cell counts in the lung after a single 12.5 mg/kg administration of temafloxacin or ofloxacin to mice infected with *Klebsiella pneumoniae* B-54.



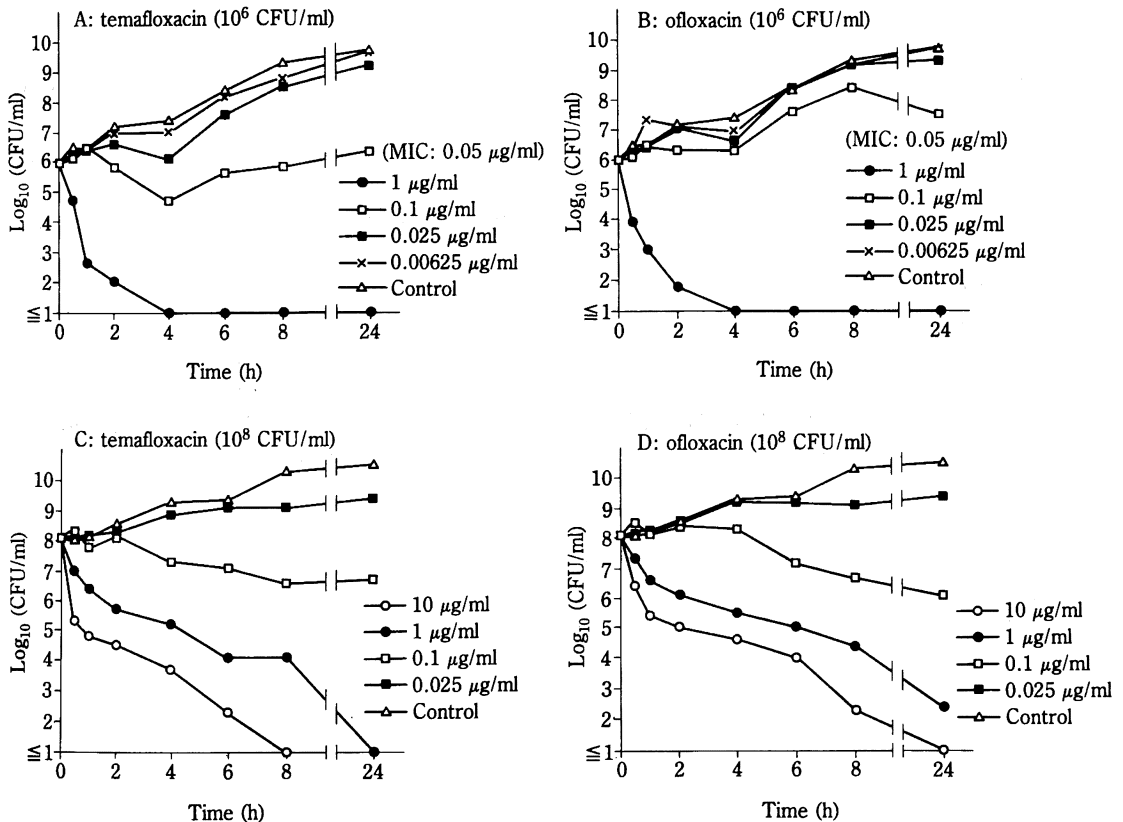
Drugs were administered orally 18 hours after infection.  
 Each point and bar represents the mean and standard deviation of five mice.

Fig. 4. Concentrations of temafloxacin and ofloxacin in serum and lung after a single 12.5 mg/kg administration to mice infected with *Klebsiella pneumoniae* B-54.

本モデルにおける TMFX の治療効果の検討は、薬剤の投与時期を肺病変は進行しているが膿瘍形成のまだ認められない感染 18 時間後に設定し、また、全身 ABGM の観察時点は薬剤投与後のマウス体内からの薬剤の消失および感染菌の再増殖の時間を考慮し、各薬剤間に差が出ると推定される薬剤投与後 48 時間を設定した。その結果、TMFX、OFLX および CPFXX の 12.5 mg/kg および 3.13 mg/kg 投与において生存数および全身 ABGM で各薬剤間に差が認められ、治療効果の差を明確に示すことができた。すなわち、TMFX は OFLX と同等もしくはやや優れた治療効果を示し、CPFXX よりもきわめて優れた治療効果を示すことが確認された。CPFXX の *K. pneumoniae* B-54 に対する MIC は  $<0.013 \mu\text{g/ml}$  で、TMFX および OFLX (いずれも MIC :  $0.05 \mu\text{g/ml}$ ) に比べて抗菌力が強い。しかし、各薬剤のマウス体内動態では、TMFX と OFLX の肺への移行性が CPFXX に比べてきわめて優

れていることが知られており<sup>7)</sup>、全身 ABGM から観察された TMFX および OFLX の良好な治療効果は両剤の肺内移行性を反映した結果と考えられた。

肺炎マウスの臓器内生菌数推移から感染菌が肺で増加したのち肝臓および脾臓に移行することが推測され、これは全身 ABGM において死亡直前のマウスが全身性の致死感染を呈していることから裏付けられた。また、肝臓および脾臓に約  $10^4$  CFU の感染菌が認められた場合、肺ではそれ以上の感染菌が存在すると推測されるが、TMFX の 12.5 mg/kg 投与で 1 例、OFLX の 12.5 mg/kg 投与で 2 例の ABGM で肝臓および脾臓に密な菌分布を示すが、肺には少数の感染菌しか観察されない例を認めた。これは肺が含気性組織であるため噴霧吸引された感染菌が肺内で一様に分布せず、散在性の病巣形成が考えられることや、また肺炎桿菌性肺炎では肺内に水腫および薄い繊維組織の空洞が形成されることなど<sup>8)</sup>から、マウス肺の障害の差が



Time-kill analyses were performed at inocula of  $10^6$  (A, B) and  $10^8$  (C, D) CFU/ml.

Fig. 5. *In vitro* bactericidal activities of temafloxacin and ofloxacin against *Klebsiella pneumoniae* B-54.

ABGMにも影響を与えたものと推察された。

全身 ABGM の観察から TMFX の抗菌効果は CPFX よりは優れたが、OFLX と同等もしくはやや優れる結果であった。そこで、TMFX および OFLX の治療効果を感染肺内濃度推移、肺内殺菌効果および *in vitro* 殺菌作用により考察した。TMFX の肺内濃度は投与 30 分以降には OFLX よりも高濃度を推移したにもかかわらず、投与 1 時間後の肺内生菌数の減少は OFLX よりも少なかった。これは OFLX 投与において初期 (30 分以前) にみられる高い血清中濃度が肺内濃度にも反映し、肺内殺菌効果に影響を与えることが考えられる。しかし、4 時間以降では TMFX の方が肺内菌数の減少がより大きく、両剤の肺内濃度の差を反映していた。また、両剤の *in vitro* 殺菌作用を検討した結果 6.0 log CFU/ml 接種菌量では 0.1  $\mu$ g/ml 濃度で、8.0 log CFU/ml 接種菌量では 10  $\mu$ g/ml および 1  $\mu$ g/ml 濃度で TMFX の方が強い殺菌作用を示しており、感染菌に対する殺菌作用の差も肺内殺菌効果に反映していることが示唆された。

最近、Azoulay-Dupuis ら<sup>9)</sup>は肺炎球菌のマウス亜急性肺炎モデルを用いて TMFX の治療効果を OFLX および CPFX と比較している。種々の感染段階で治療を行い、いずれの感染段階でも TMFX は他の 2 剤に比べて有意に良好な治療効果を示したと報告している。また、マウスのマイコプラズマ<sup>2)</sup>、ハムスターのマイコプラズマ<sup>10)</sup>およびモルモットのレジオネラ<sup>11)</sup>の各種呼吸器感染モデルを用いて、ニューキノロン剤の治療効果を検討し、TMFX が他剤に比べてきわめて優れた効果を示すことが報告されている。今回、肺炎桿菌性肺炎モデルを用いて検討した結果、TMFX は OFLX および CPFX よりも優れた治療効果を示すことを明らかにすることができた。臨床の肺炎治療における TMFX の効果が期待される。

#### 文 献

- 1) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武 毅, 宍戸春美, 鈴木 寛, 野口行雄, 玉置公俊, 羅 士易, 井手正利: 噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。日本胸部疾患学会誌 16: 581~588, 1978
- 2) 谷 佳都, 芝田和夫, 恩田時男, 山口東太郎: Temafloxacin のマウス実験感染症に対する治療効果。Chemotherapy 41 (S-5): 89~101, 1993
- 3) 谷 佳都, 遠藤幸夫, 山口東太郎, 藤居美智子, 高橋忠男: 全身オートバクテリオグラフィーによる実験的腹腔感染マウスにおける感染菌の消長および TA-058 の *in vivo* 抗菌作用の観察。Chemotherapy 32 (S-2): 158~165, 1984
- 4) 佐久間真理, 栗田口重美, 佐藤善重: 体内における細菌の分布と治療効果判定に用いる新技法, Whole body bacteriography。薬学雑誌 89: 1740~1742, 1969
- 5) 武田勝男, 佐久間由光, 矢野 茂, 小山八重子, 山口東太郎: Temafloxacin の bioassay 法による体液内濃度測定法。Chemotherapy 41 (S-5): 116~121, 1993
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 7) 武田勝男, 矢野 茂, 佐久間由光, 小山八重子, 山口東太郎: Temafloxacin の各種実験動物における吸収, 分布および排泄。Chemotherapy 41 (S-5): 128~139, 1993
- 8) 武村民子: 細菌性肺炎の病理。呼吸器感染症 (小林宏行編), 医典社, 東京, p27~48, 1983
- 9) Azoulay-Dupuis E, Bedos J P, Vallee E, Hardy, D J, Swanson D J, Pocardalo J J: Antipneumococcal activity of ciprofloxacin, ofloxacin, and temafloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. J. Infect. Dis. 163: 319~324, 1991
- 10) 荒井澄夫, 合原幸子: *In vitro*, *in vivo* での temafloxacin の抗 *Mycoplasma pneumoniae* 活性。Chemotherapy 41 (S-5): 81~88, 1993
- 11) Michihiro Gaja: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of four newly developed quinolone agents against *Legionella* infection. Chemotherapy 40: 1~10, 1992

Therapeutic effect of temafloxacin on experimental pneumonia  
induced by *Klebsiella pneumoniae* in mice

Kato Tani and Toutaro Yanaguchi

Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

2-2-50 Kawagishi, Toda 335, Japan

The antibacterial effect of temafloxacin (TMFX) was compared with those of ofloxacin (OFLX) and ciprofloxacin (CPFX) in experimental pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* B-54 in mice by means of whole body autobacteriography. Upon treatment with 12.5 mg/kg or 3.13 mg/kg of TMFX in mice with the pneumonia, the bacterial distribution on autobacteriograms was significantly reduced as compared with untreated controls. The antibacterial effects of TMFX observed in the distribution density of the autobacteriograms was comparable to or greater than that of OFLX and remarkably greater than that of CPFX. At 30 minutes after administration of 12.5 mg/kg to mice with pneumonia, the concentration of TMFX in the lung was  $1.62 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$  which was comparable to that of OFLX. From 1 hour after administration, the concentration of TMFX was considerably higher than that of OFLX. The concentration of TMFX was  $0.9 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$  even at 4 hours after administration. The bactericidal activity in the lungs of mice with pneumonia at the time of treatment with 12.5 mg/kg of TMFX was more potent than that of OFLX. TMFX also showed a good effect in terms of *in vitro* bactericidal activity against *K. pneumoniae* B-54.