

## Rokitamycin の *in vitro* 抗 *Chlamydia* 活性と実験的マウス *Chlamydia psittaci* 肺炎における治療効果の検討

二木 芳人・木村 雅司・窪田 好史・副島 林造  
川崎医科大学呼吸器内科\*

(平成6年8月24日受付・平成6年9月28日受理)

経口16員環系マクロライド薬 rokitamycin (RKM) の呼吸器系各種 *Chlamydia* 感染症に対する有用性を評価する目的で、各種 *Chlamydia* 標準株に対する MIC を測定し、あわせてマウス *Chlamydia psittaci* 肺炎モデルを用いた感染治療実験を行い他剤と比較した。その結果、RKM の MIC は 0.063~0.125  $\mu\text{g/ml}$  と、erythromycin, roxithromycin に勝る優れたものであったが、治療実験成績では他剤に劣る結果であった。さらに、RKM 投与時のマウス血漿中濃度を検討した結果、RKM は同血漿中では速やかに抗菌活性の低い代謝物に代謝されることが明らかとなり、MIC 値と治療効果における差はこれにもとづくものと結論された。ヒトにおける RKM の血漿中代謝は異なるものであり、ヒトでの臨床的有用性は期待しうるものであると考えられた。

**Key words:** rokitamycin, *C. psittaci* 肺炎モデル, 血漿中濃度, 血漿中代謝物

*Chlamydia* sp. は現在までに *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum* の4種が分離確認され、このうち、ヒトの呼吸器系感染症では、前3者の病原性が確認されている。特に *C. pneumoniae* は、最近の疫学調査で若年者から高齢者まで幅広く、咽喉頭炎、気管支炎、さらに肺炎など様々な感染を高頻度に原因することが明らかになっており、その市中感染症における重要性が再認識されている。

*Chlamydia* 感染症の治療には、erythromycin (EM), minocycline (MINO), doxycycline (DOXY) などが第一選択とされてきたが、1980年代後半から登場した rokitamycin (RKM) を初めとする clarithromycin (CAM), roxithromycin (RXM) のいわゆるニューマクロライドは、抗 *Chlamydia* 活性の向上、体内動態の改善などが評価され、その安全性も高いことから、*Chlamydia* 呼吸器感染症における経口治療薬の第一選択薬とされるに至っている。

本報では、RKM の抗 *Chlamydia* 活性を *in vitro*, *in vivo* で再評価し、あわせて動物における RKM の体内動態の特殊性と治療効果の相関についても、その血漿中代謝を中心に検討したので以下に報告する。

### I. 材料・方法

#### 1. 使用薬剤

RKM (旭化成工業株式会社), EM (ダイナポット株式会社), MINO (日本レダリー株式会社), CAM

(大正製薬), RXM (日本ルセル株式会社) を以下の各実験系で用いた。

#### 2. 使用菌株

今回使用した *Chlamydia* 標準菌株は以下のごとくである。

*C. psittaci* Budgerigar no 1 株は国立予防学研究所, Clifornia 10 株 (Cal 10) は川崎医科大学微生物学教室より各々分与を受けた。*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株, E/UW-5/Cx 株, L<sub>2</sub>/434/Bu 株および *C. pneumoniae* TW-183 株はワシントン大学より購入した。

#### 3. 最小発育阻止濃度

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定については日本化学療法標準法<sup>1)</sup>に従い行った。

すなわち HeLa 229 細胞を直径 14 mm のカバーグラスを入れた 24 穴プレートにて培養し、細胞が完全に単層となった状態で *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. trachomatis* をそれぞれ 10<sup>4</sup> IFU/well の菌量にて接種した。それぞれの株の至適条件にて培養し、*C. pneumoniae*, *C. trachomatis* は感染 72 時間、*C. psittaci* は感染 48 時間培養し、カバーグラスを 100% メタノールにて固定、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識クラミジア属特異的モノクロナル抗体 (カルチャーセット: オルソー) にて染色し判定を行っ

\* 倉敷市松島 577

た。判定はクラミジア封入体形成が完全に阻止された最小発育濃度をもって MIC 値とした。

#### 4. *C. psittaci* 感染マウスの治療効果

5 週齢 MCH マウス (日本クレア) を 1 群 10 匹ずつ用いた。マウスをクロロホルムにて吸入麻酔した後、*C. psittaci*  $10^6$  IFU/ml に調整した菌液 0.1 ml をマイクロピペットにて点鼻感染した。感染 24 時間後より 5% アラビアゴムに懸濁した各薬剤を 10 mg/kg, 20 mg/kg 治療の 2 群でそれぞれ 1 日 2 回経口投与を行った。薬剤の効果は感染 7 日目の生存率にて判定した。

#### 5. マウス血漿中の RKM 濃度測定

使用動物: マウスは Slc-ddY 雄性マウス (日本クレア, 7 週齢) を使用した。

薬剤および投与方法: RKM を 0.5% カルボキシメチルセルロースに懸濁し, その 0.5 ml を絶食下で経口投与した。薬剤投与量は, 200, 500, 1,000 mg/kg の単回投与とした。

薬剤濃度測定: 薬剤投与後, 経時的にマウスを屠殺し, 心臓採血を行った。採取した血液はディイソプロピルフルオロリン酸 (7.5 mM) 処理を行い, 氷冷下保存後 3,000 rpm, 10 分間遠心分離を行って得た血漿を森下らの方法<sup>2)</sup>によりアセトニトリルを用いて抽出した。得られたアセトニトリル層を減圧下乾固し, 20% アセトニトリル含有 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で溶解した液を試料とした。この試料を用いて抗菌活性から血漿中濃度を測定した。

#### 6. 血漿中代謝物の検索

経時的に採血した血漿については thin-layer chromatography (TLC)/Bio-autography を用いて抗菌活性物質の検索を行った。試料の調製は森下らの方法<sup>2)</sup>に従い行った。クロロホルム-メタノール (1:2) 溶液に溶解して silica gel 60 art. 5721 (メルク社製) にスポットした。展開溶媒はクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (70:11:8:2) を用いて 15 cm 展開した。展

開後, 抗菌活性物質の検出は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用いて, 普通寒天培地 (pH 8.0) 37°C, 18 時間培養して行った。

## II. 成 績

### 1. 最小発育阻止濃度

MINO の MIC 値は 3 株すべて 0.015  $\mu$ g/ml, EM は TW-183, Budgerigar 0.25  $\mu$ g/ml, D 株は 0.5  $\mu$ g/ml, RKM は TW-183, Budgerigar 株 0.063  $\mu$ g/ml, D 株 0.125  $\mu$ g/ml, CAM は 3 株すべて 0.015  $\mu$ g/ml, RXM は TW-183, Budgerigar 0.125  $\mu$ g/ml, D 株 0.25  $\mu$ g/ml であった (Table 1)。

### 2. *C. psittaci* 感染マウスの治療効果

20 mg/kg 治療群では, 未治療マウスが感染 7 日目までに全例死亡したのに対して, MINO, CAM, RXM 治療マウスの感染 7 日目の生存率は 100% で, 感染 14 日目においても同様であった。EM は 7 日目では 100%, 14 日目で 70% の生存率であった。RKM は感染 3 日目で 80%, 7 日目で 40%, 12 日目で全例死亡した (Fig.1)。

10 mg/kg 治療群の 7 日目の生存率では未治療群は全例死亡したのに対し, 7 日の治療群の生存率は各々 MINO, CAM, RXM, 100%, EM 70%, RKM 60% であった。EM, RKM はそれ以降も死亡数の増加がみられ, EM は 10 日目で全例死亡し, RKM は感染 14 日目で 10% の生存率であった (Fig.2)。

### 3. マウス血漿中の RKM 濃度測定

RKM を 200, 500 または 1,000 mg/kg 経口投与したときの血漿中濃度の推移を Fig.3 に示した。いずれの投与量においても投与後 15 分には血漿中濃度は最高値を示し, その値は各々 2.4, 10.6, 14.4  $\mu$ g/ml であった。また, 時間の経過とともに減少し, 投与後 4 時間では検出限界以下, 0.31, 1.96  $\mu$ g/ml であった。

### 4. 血漿中代謝物の検索

RKM を 500 mg/kg 経口投与したときの血漿中

Table 1. Anti-chlamydial activities (MICs) of rokitamycin and related antibiotics

Drugs	MICs ( $\mu$ g/ml)		
	<i>D. psittaci</i> (Bud no 1)	<i>C. trachomatis</i> (D)	<i>C. pneumoniae</i> (TW)
Rokitamycin	0.063	0.125	0.063
Erythromycin	0.25	0.5	0.25
Roxithromycin	0.125	0.25	0.125
Clarithromycin	0.015	0.015	0.015
Minocycline	0.015	0.015	0.015

D, D, TW-183, Budgerigar, D, D/TW-183, TW, TW-183

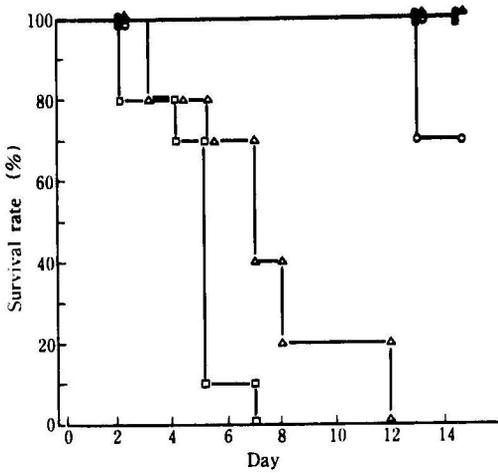


Fig. 1. Survival rates of mice infected with *Chlamydia psittaci* and treated with 20 mg/kg of minocycline(●), clarithromycin(▲), roxithromycin(■), erythromycin(○), or rokitamycin(△) twice daily for seven days. Control (□) received 5% gum arabic.

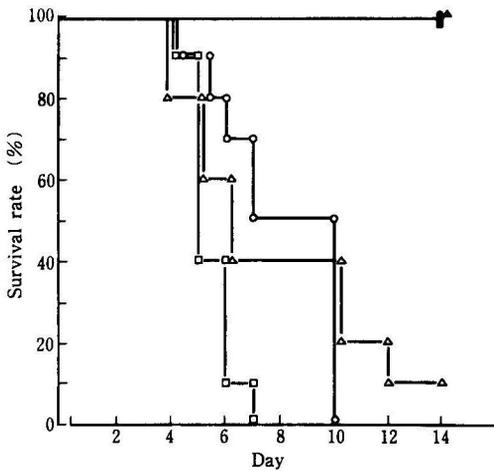


Fig. 2. Survival rates of mice infected with *Chlamydia psittaci* and treated with 10 mg/kg of minocycline(●), clarithromycin(▲), roxithromycin (■), erythromycin (○), or rokitamycin(△) twice daily for seven days. Control (□) received 5% gum arabic.

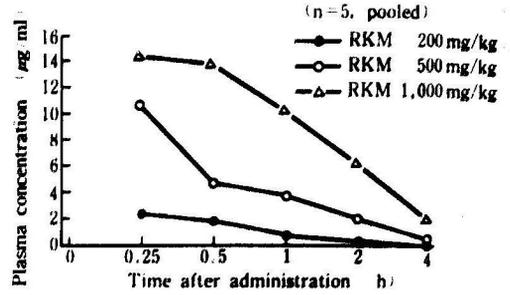


Fig. 3. Plasma concentration of rokitamycin (RKM) after oral administration in fasted mice. Mice received 200 mg/kg (●), 500 mg/kg (○), or 1,000 mg/kg (△) of RKM.

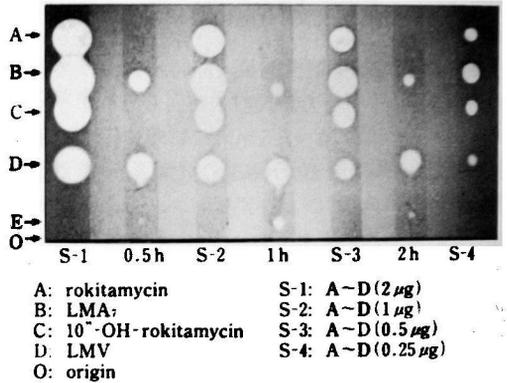


Fig. 4. Bio-autogram of plasma after oral administration of rokitamycin (500 mg/kg) in fasted mice.

RKM およびその代謝物を経時的に検討した TLC/Bio-autogram を Fig.4 に示した。RKM 投与後 15 分, 1, 2 時間において未変化体である RKM は検出されず, leucomycin A<sub>7</sub> (LMA 7) および leucomycin V (LMV) が主要代謝物として検出された。LMV より, さらに rate of flow (Rf) 値の小さなスポットが投与後 1 時間を最高に, わずかであるが認められた。

### III. 考 察

クラミジア呼吸器感染症の中で特に *C. pneumoniae* は, 成人において広く抗体保有が認められ<sup>3,4)</sup>, また, 集団内流行も報告されていることより呼吸器感染症の普遍的な病原微生物と考えられる。

現在, これらクラミジア呼吸器感染症の治療を評価

するうえで、我々はマウスを用いた *C. psittaci* 感染モデルを作成し、各種薬剤の同肺炎に対する治療効果を報告してきた<sup>9)</sup>。new quinolone 剤の薬効評価では sparfloxacin, tosusfloxacin として OPC-17116 は MINO には若干治療効果は劣るが ofloxacin よりは良好な効果が確認された。今回我々はマクロライド剤についても同様に検討を行い、roxythromycin, clarithromycin は MINO と同等の効果があることを認めた。一方、16 員環マクロライドである RKM は、MIC 値は良好な結果であるにもかかわらず、マウス感染治療実験ではその治療効果は EM より若干劣る結果を示した。

マウスにおいては RKM は投与直後より速やかに代謝され、抗菌活性を有する RKM は速やかに消失し、LMA7 や LMV 等の抗菌活性の低い代謝物のみ血漿中に存在することが今回の検討で明らかとなった。この現象は酒井<sup>9)</sup>、鈴木<sup>7)</sup>らのラットを用いた動物実験において、投与直後より血漿中 RKM 濃度の減少が認められた成績と同様である。これらの事実より RKM をげっ歯類に投与した場合、血中エステラーゼによる分解を受け治療効果が減ずることとなると考えられた。一方、ヒトにおける検討ではげっ歯類と異なり、RKM は比較的長時間血漿中に存在することが認められており<sup>8)</sup>、臨床における治療効果も *Chlamydia* 感染症に限らず優れた成績が報告されている<sup>9,10)</sup>。

病原微生物の治療効果の指標として種々の動物モデルが用いられているが、病原菌の感受性が良好である動物や、またヒトに近い動物モデルを作成することは必要条件であるが、薬物の代謝様式もヒトに近い系を慎重に選択する必要があると考えられた。

#### 謝 辞

研究の薬物濃度測定に技術協力していただきました、旭化成工業株式会社に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 熊本悦明, 松本 明, 副島林造, クラミジア MIC 測定法—日本化学療法学会標準法 (1991年改定版)—(札幌)。Chemotherapy 40: 303~307, 1992
- 2) 森下真孝, 酒井敦史, 遠藤里子, 鈴木忠清: TMS-19-Q の体液内濃度測定法に関する研究 (I)。Chemotherapy 32 (S-6): 70~79, 1984
- 3) 岸本寿男: *Chlamydia pneumoniae* (TWAR 株) 感染症に関する研究 (第2報)—健康者および急性呼吸器感染症患者における血清学的検討—。感染症誌 64: 986~993, 1990
- 4) Kleemole M, Saikku P, Visakorpi P, Wang S P, Graystone J T: Epidemics of pneumoniae caused by TWAR, a new chlamydia organism in military trainees in Finland. J Infect Dis, 157: 230~236, 1988
- 5) Kimura M, Kishimoto T, Niki Y, Soejima R: In vitro in vivo antichlamydial activities of newly developed quinolone antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother, 37: 801~803, 1993
- 6) 酒井敦史, 鈴木忠清, 遠藤里子, 渡辺真由美, 森下真孝: 動物における TMS-19-Q の呼吸分布, 代謝および排泄に関する研究。Chemotherapy 32: 93~98, 1984
- 7) 鈴木忠清, 酒井敦史, 森下真孝: 14C 標識ロキタマイシンの体内動態に関する研究。I. ラット単回投与時の呼吸, 分布, 代謝, 排泄。Jap J Antibiotics, 40: 499~518, 1987
- 8) 森下真孝, 鈴木忠清, 酒井敦史, 遠藤里子, 渡辺真由美, 永田明徳: 健康人における吸収, 代謝および排泄に関する研究。Chemotherapy 32: 99~116, 1984
- 9) 副島林造, 松島敏春, 二木芳人, 川根博司, 川西正泰, 中浜 力, 渡辺正俊, 日野二郎: TMS-19-Q に関する研究。Chemotherapy 32 (S-6): 322~328, 1984
- 10) 小林宏行, 他 33 施設: 呼吸器感染症に対する TMS-19-Q と Midecamycin との二重盲検比較試験成績。感染症誌 59: 201~226, 1985

Anti-chlamydial activities of rokitamycin *in vitro* and in experimental murine *Chlamydia psittaci* pneumonia

Yoshihito Niki, Masashi Kimura, Yoshifumi Kubota  
and Rinzo Soejima

Division of Respiratory Diseases Department of Medicine Kawasaki Medical School,  
577 Matsushima, Kurashiki 701-01, Japan

The anti-chlamydial activities of rokitamycin (RKM), an oral 16-member macrolide antibiotic, were investigated *in vitro* (MICs) and in terms of therapeutic effect of mice experimental *Chlamydia psittaci* pneumonia. MICs of RKM against standard strains of *Chlamydia* sp. were excellent 0.063-0.125  $\mu\text{g/ml}$  and were superior to MICs of erythromycin and roxithromycin. However, a therapeutic effect of RKM in the animal model was inferior to those of other macrolides. The study of pharmacokinetics of RKM in mice plasma showed rapid metabolism of RKM to metabolites with low anti-chlamydial activities. According to the above results, we conclude that the discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* anti-chlamydial activities of RKM was caused by the pharmacokinetic characteristics of the drug in mice plasma. In human plasma, RKM was found to be stable. Therefore, we can expect good clinical effects of RKM against chlamydial respiratory tract infection.