

Grepafloxacinの*Chlamydia trachomatis*に対する*in vitro*抗菌力

永山在明・中尾偕主

福岡大学医学部微生物学教室*

新規なニューキノロン系合成抗菌薬grepafloxacin (GPFX) の*Chlamydia trachomatis*に対する*in vitro*抗菌力を、他の4種類のニューキノロン系合成抗菌薬およびminocycline (MINO) の抗菌力と比較検討した。また、培養細胞を用いて、*C. trachomatis*の封入体形成に対するGPFXおよびMINOの影響を透過型電子顕微鏡を用い観察した。

*C. trachomatis*標準株(D, EおよびF)並びに非淋菌性尿道炎患者由来の40株の臨床分離株に対するMIC値は、GPFX; 0.06~0.125 μ g/ml, temafloxacin (TMFX); 0.125~0.25 μ g/ml, tosufloxacin (TFLX); 0.125~0.25 μ g/ml, ofloxacin (OFLX); 0.5~1.0 μ g/ml, levofloxacin (LVFX); 0.25~0.5 μ g/mlおよびMINO; 0.03~0.06 μ g/mlであった。

比較した6薬剤のなかではMINOのMICが最も小さく、クラミジア感染症の治療薬として優れていることが抗菌力の点からも伺えた。ニューキノロン系合成抗菌薬のなかではGPFXが最も強い抗菌力を有し、MINOの1/2の抗菌力であった。抗菌力の強さは、GPFX, TMFX, およびTFLX, LVFX, OFLXの順であった。

GPFXは優れた組織内移行性を示すことが報告されており、今回得られた強い抗菌力から、クラミジアによる非淋菌性尿道炎および性器感染症に対して有用な治療薬として期待される薬剤であると推察された。

Key words : grepafloxacin (GPFX), new quinolone, *Chlamydia trachomatis*, MIC

Grepafloxacin (GPFX) は大塚製薬株式会社で開発されたニューキノロン系合成抗菌薬であり、グラム陽性菌、グラム陰性菌、嫌気性菌およびマイコプラズマなどに対して幅広い抗菌スペクトラムを有している。近年、開発されてきたニューキノロン薬は*Chlamydia*属に対しても抗菌力を示すことが知られている¹⁻³⁾。今回、我々はtemafloxacin (TMFX), tosufloxacin (TFLX), ofloxacin (OFLX) およびlevofloxacin (LVFX) の4種類のニューキノロン薬および、クラミジア感染症に対して有効とされるテトラサイクリン系薬剤のminocycline (MINO) の5薬剤を対照薬としてGPFXの抗菌力を検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 試験菌株

*Chlamydia trachomatis*標準株D, EおよびFの3株と、我々の教室で非淋菌性尿道炎患者から分離・同定された臨床分離*C. trachomatis* 40株を用いて抗菌力を測定した。

2. 使用薬剤

GPFXは大塚製薬、TMFXは田辺製薬、TFLXは富山化学、OFLX, LVFXは第一製薬、MINOは日本レダリーから分与されたいずれも力価の明らかな標準粉末を用いた。

3. MIC測定法

薬剤感受性試験はMcCoy細胞を用い、日本化学療法学会クラミジアMIC測定法⁴⁾に準じて行った。24穴平底カルチャープレート(コニング社製)に直径13mmのカバーグラスを入れ、 $3\sim5\times10^4$ cells/wellのMcCoy細胞を接種した。クラミジア各株は数回継代培養した後、使用時までsucrose-phosphate-glutamate medium (sucrose, 75.0g; KH_2PO_4 , 0.52g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot2\text{H}_2\text{O}$, 1.52g; glutamic acid, 0.72g; distilled water, 1000ml) に懸濁・分注後 -80°C に保存したものを試験に供した。この*C. trachomatis*保存液のMcCoy細胞に対するinclusion-forming units (IFU) は $1\times10^8\sim8\times10^8$ IFU/mlである。 37°C , 5% CO_2 incubator中で24時間培養し、confluent monolayerとなったMcCoy細胞に、 $5\times10^3\sim1\times10^4$ IFU/wellになるように*C. trachomatis*各株の保存液を希釈し、 $2000\times\text{g}$, 60分遠心して*C. trachomatis*を吸着させた。吸着後、培養上清を除き、段階希釈された各種薬剤を含むDulbecco's modified minimum essential medium (D-MEM) 維持培地(2%熱非働化 fetal calf serum (FCS), 1 μ g/ml cycloheximideを含む)を1.0ml加え、 37°C , CO_2 incubator中で72時間培養した。

72時間後にカバーグラスを取り出し、エタノールで

固定し乾燥後、5%ヨードまたは蛍光モノクローナル抗体により染色した。最終判定はすべて蛍光抗体法によって行なった。すなわち、封入体の形成の有無を蛍光顕微鏡下で観察し、封入体の形成を阻止する薬剤の最小阻止濃度をminimum inhibitory concentration (MIC)とした。

また、GPFXおよびMINOの封入体形成に対する影響を透過型電子顕微鏡を用い観察した。

Ⅱ. 結 果

1. 薬剤感受性
- 1) 標準株に対するMIC
- Table 1にGPFXおよび比較薬剤の*C. trachomatis*標準株

3株に対するMIC値を示した。検討したニューキノロン薬の中ではGPFX, TMFX, TFLXが強い抗菌力を示し、MICはともに0.125μg/mlであった。OFLXの光学活性体であるLVFX, OFLXがこれに次ぐ抗菌力を示し、MICはそれぞれ0.25μg/mlおよび0.5～1.0μg/mlであった。GPFX, TMFX, TFLXはOFLXよりも4～8倍優れていた。

2) 臨床分離株に対するMIC

Table 2およびFig. 1に非淋菌性尿道炎患者から分離された臨床分離*C. trachomatis* 40株に対する抗菌力を測定した成績を示した。薬剤の臨床分離株に対するMICはそれぞれ、GPFX; 0.06～0.125μg/ml, TMFX; 0.125～

Table 1. MICs of five new quinolones and minocycline against *Chlamydia trachomatis* D, E and F strains

Organism	MIC (μg/ml)		
	D strain	E strain	F strain
Grepafloxacin	0.125	0.125	0.125
Temafloxacin	0.125	0.125	0.125
Tosufloxacin	0.125	0.125	0.125
Ofloxacin	1.0	0.5	0.5
Levofloxacin	0.25	0.25	0.25
Minocycline	0.063	0.031	0.031

Table 2. Activity of five new quinolones and minocycline against 40 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis*

Drugs	MIC (μg/ml)		
	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Grepafloxacin	0.06 ~ 0.125	0.125	0.125
Temafloxacin	0.125 ~ 0.25	0.125	0.25
Tosufloxacin	0.125 ~ 0.25	0.125	0.25
Ofloxacin	0.5 ~ 1.0	0.5	1.0
Levofloxacin	0.25 ~ 0.5	0.12	0.5
Minocycline	0.03 ~ 0.06	0.03	0.06

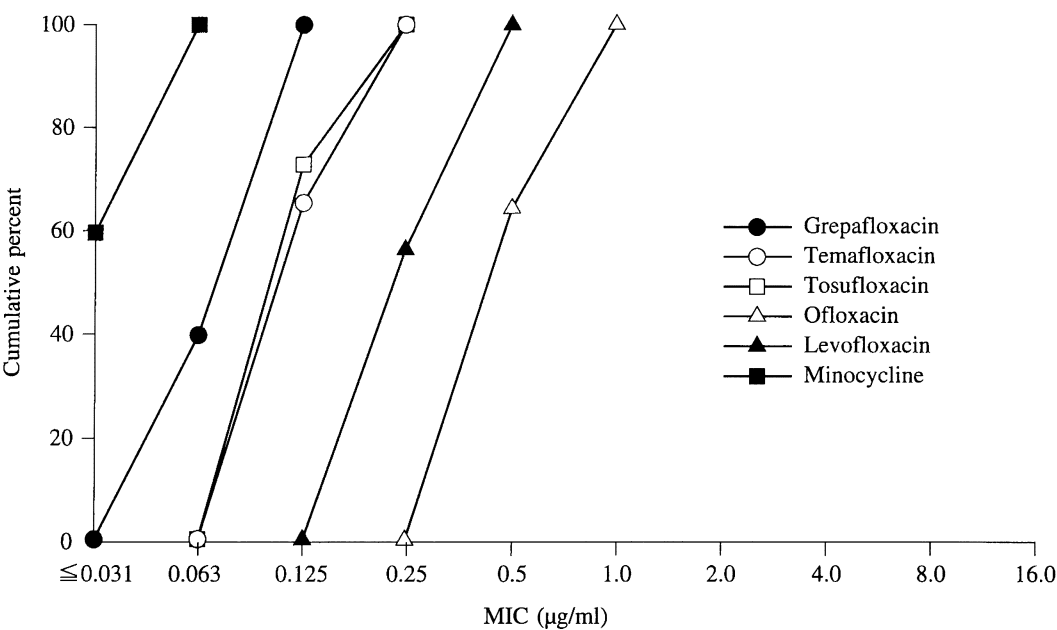


Fig. 1. Activities of five quinolones and minocycline against 40 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis*.

0.25 $\mu\text{g/ml}$, TFLX; 0.125 ~ 0.25 $\mu\text{g/ml}$, OFLX; 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$, LVFX; 0.25 ~ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ および MINO; 0.03 ~ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ であった。MINO の MIC が最も小さくクラミジア感染症の治療薬として優れていることが確認された。

ニューキノロン系合成抗菌薬のなかでは、GPFX が最も強い抗菌力を有し、MINO の 1/2 の抗菌力であった。抗菌力の強さは GPFX > TMFX = TFLX > LVFX > OFLX の順であった。またこれらの薬剤に耐性を示す株はこれまでのところ出現していない。

2. *C. trachomatis* D株の増殖曲線に及ぼす影響

C. trachomatis D株に GPFX を 0.125 $\mu\text{g/ml}$ (MIC) および 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) の濃度添加した時の増殖曲線に及ぼす影響を検討した (Fig. 2)。McCoy 細胞に 3.5×10^5 IFU/ml の *C. trachomatis* D株を吸着させ、経時的 (10, 24, 34, 50 hrs) に封入体を観察した結果、薬剤無添加群では培養 50 時間後に 7.5×10^5 IFU/ml まで増殖するのに対して、GPFX: 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) 添加群では $6.8 \times$

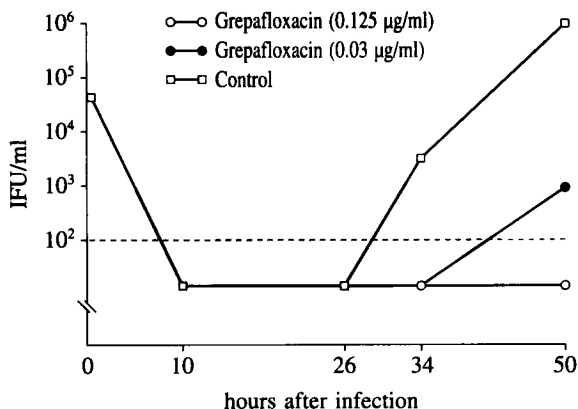


Fig. 2. Growth curve of *Chlamydia trachomatis* D strain in McCoy cells with or without grepafloxacin.

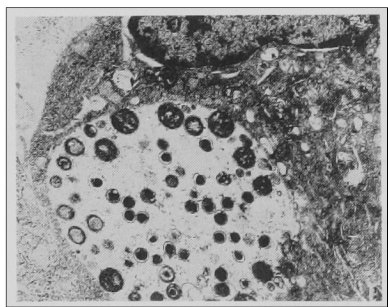


Fig. 3. *Chlamydia trachomatis* D strain-infected McCoy cell 48 h after infection. Numerous elementary bodies (EB) are visible in the glycogen-containing inclusion. ($\times 35,000$)

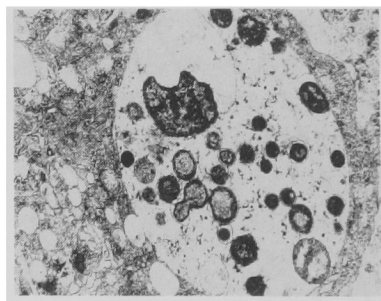


Fig. 4. *Chlamydia trachomatis*-infected McCoy cell 48 h after infection. Grepafloxacin (0.03 $\mu\text{g/ml}$). Irregular RB and a few EB are seen. ($\times 35,000$)

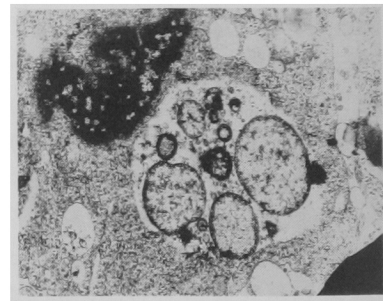


Fig. 5. *Chlamydia trachomatis*-infected McCoy cell 24 h after infection. Minocycline (0.03 $\mu\text{g/ml}$). Enlarged irregular RB (but no EB) are seen in the inclusion. ($\times 25,000$)

10⁵ IFU/ml までしか増殖せず、有意に増殖を抑制した。GPFX: 0.125 $\mu\text{g/ml}$ (1 MIC) の濃度では増殖は観察されず、完全に複製を阻止した。

3. 電子顕微鏡による観察

C. trachomatis D株を感染させた McCoy 細胞を用いて、*C. trachomatis* D株の増殖に対する GPFX および MINO の阻害作用を透過型電子顕微鏡により観察した。

Fig. 3 は薬剤無添加時の *C. trachomatis* D株、感染 48 時間後の封入体の電顕像 ($\times 35,000$) である。glycogen を含む封入体の中には多数の基本小体 (EB) が観察された。

Fig. 4 は GPFX を 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) 添加した時の *C. trachomatis* D株、感染 48 時間後の封入体の電顕像 ($\times 35,000$) である。GPFX を作用させた時の封入体内部は不規則な網様体 (RB) と少数の基本小体 (EB) が観察された。

Fig. 5 は対照薬とした MINO を 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MIC) 添加し、*C. trachomatis* D株を感染させ、48 時間後の McCoy 細胞の電顕像 ($\times 25,000$) である。封入体内部は膨化した不規則な網様体 (RB) のみが見られ、基本小体 (EB) は観察されなかった。

Ⅲ. 考 察

近年、性行為感染症 (STD) に対する関心が高まっているなかで、*C. trachomatis* は非淋菌性尿道炎の起因菌として極めて重要であり注目されている。その治療薬としてはマクロライドおよびテトラサイクリン系の薬剤が強い抗クラミジア活性を有することにより、臨床的にも有用性が認められている。

最近開発されてきたニューキノロン系薬剤は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌のみならず、クラミジアに対しても強い抗菌力を示すことが報告されている。今回検討した GPFX はニューキノロン系薬剤の中でも優れた抗

クラミジア活性を有していることが確認された。その抗菌力は、OFLXの8倍であり、クラミジア感染症で汎用されるMINOの1/2であった。

今回試験したニューキノロン系薬剤のなかで、GPFXは最も優れた抗クラミジア活性を有しており、続いてTMFXおよびTFLX, LVFX, OFLXの順であった。

これらGPFXを始めとするニューキノロン薬はクラミジア感染症に対し有用な治療薬として期待される薬剤であると推察された。

文 献

- 1) Nagayama A, Nakao T and Taen H: *In vitro* activities of ofloxacin and four other new quinoline carboxylic acids against *Chlamydia trachomatis*. Anti-

microb Agents Chemother 32: 1735 ~ 1737, 1988

- 2) 永山在明, 田縁晴子, 中尾偕主, 熊澤浄一: キノリンカルボン酸系抗菌剤の*Chlamydia trachomatis*に対する*in vitro*抗菌力。西日本泌尿器科 49: 537~541, 1987
- 3) 永山在明, 中尾偕主, 北島静江: Temafloxacinの*Chlamydia trachomatis*に対する*in vitro*抗菌力。Chemotherapy 41 (S-5): 748~749, 1993
- 4) 日本化学療法学会: クラミジアMIC測定法—日本化学療法学会標準法—(1991年改訂版)。Chemotherapy 40: 303~321, 1992

In vitro activity of grepafloxacin and other new quinolones against *Chlamydia trachomatis*

Ariaki Nagayama and Tomokazu Nakao

Department of Microbiology, School of Medicine, Fukuoka University

7-45-1 Nanakuma, Johnnan-ku, Fukuoka 814-01, Japan

The *in vitro* activities of new quinolones against three standard strains (D, E, and F) and 40 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* obtained from patients with nongonococcal urethritis were compared with those of minocycline (MINO). Monolayer cultures of McCoy cells (3 to 5×10^4 cells/well) in flat-bottomed plates with cover glasses were infected with 5,000 to 10,000 inclusion-forming units of each *Chlamydia* stock solution. After 72 h of incubation with each antibiotic dilution, the cells were stained with fluorescent monoclonal antibody and examined by fluorescence microscope to determine the presence of inclusions. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each drug which completely inhibited the formation of the inclusion bodies was determined. The ranges for the MIC against the clinical isolates were as follows: MINO, 0.03 to 0.06 $\mu\text{g/ml}$; grepafloxacin (GPFX), 0.06 to 0.125 $\mu\text{g/ml}$; temafloxacin (TMFX) and tosufloxacin (TFLX), 0.125 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$; ofloxacin (OFLX), 0.5 to 1.0 $\mu\text{g/ml}$ and levofloxacin (LVFX), 0.25 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

Among the five new quinolones, GPFX was the most active antichlamydial agent, followed by TMFX and TFLX, LVFX and OFLX.

These new quinolones should prove to be promising drugs for the treatment of *Chlamydia* infections.