

## Pazufloxacinのヒト細胞内移行性と細胞内感染菌に対する殺菌効果

三上秀忠・恒田礼子・堀 富美子・南 新三郎・保田 隆・渡辺泰雄・成田弘和  
富山化学工業株式会社総合研究所\*

Pazufloxacin (PZFX) の細胞内移行性についてヒト好中球およびヒト由来培養細胞(ヒト胎児小腸細胞Intestine 407, ヒト胎児肺正常 2倍体細胞MRC-5およびヒト成人肝細胞Chang Liver) で検討し, ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), tosufloxacin (TFLX) と比較した。さらに, 細胞内に感染させた *Pseudomonas aeruginosa* S-1299 および *Salmonella enteritidis* C-32 に対する PZFX の細胞内殺菌効果も併せて検討した。

PZFX の細胞外液濃度に対する細胞内濃度比 (C/E ratio) は, ヒト好中球では OFLX とほぼ同程度であったが, CPFX や TFLX より低かった。また, ヒト由来培養細胞においても PZFX は他剤より低値を示した。

ヒト好中球に貪食された *P. aeruginosa* に対する PZFX の細胞内殺菌効果は OFLX より若干優れ, CPFX, TFLX と同程度であった。また Intestine 407 細胞に感染した *S. enteritidis* に対し, PZFX は TFLX より劣るものの, OFLX, CPFX と同等の殺菌効果を示した。

以上, PZFX は他のキノロン薬に比べ細胞内移行性は若干劣るものの, 細胞内細菌に対しては他のキノロン薬と同程度の殺菌効果を示した。

**Key words :** PZFX, 細胞内移行, 細胞内細菌, ヒト好中球, ヒト培養細胞

細菌の中には, 宿主組織細胞内に寄生したり, 好中球やマクロファージ等の食細胞に貪食されたあと細胞内に生存し増殖するために, 感染を難治化させる細胞内寄生性病原体と呼ばれる菌種が存在する。これらの細菌は食細胞の殺菌作用から身を守ると同時に, ある種の抗菌薬からもその攻撃をまぬがれて, しばしば感染を蔓延化させたり, 再発をくりかえす原因となっている。このような細菌に対しては, たとえ試験管内で優れた抗菌力を示す抗菌薬であっても, それが細胞内へ移行できなければ臨床的な効果は期待できない。従って抗菌薬の細胞内への移行性を知ることは, 細胞内で生存しうる細菌による感染症を治療するには必要なことである<sup>1-3)</sup>。

今回我々は, ニューキノロン系合成抗菌薬 pazufloxacin (PZFX) の細胞内移行性について, ヒト好中球, ヒト胎児小腸細胞, ヒト胎児肺2倍体細胞, およびヒト成人肝細胞を用いて検討した。さらに, ヒト好中球に貪食された *Pseudomonas aeruginosa* やヒト胎児小腸細胞に感染した *Salmonella enteritidis* に対する殺菌効果も併せて検討したので, その成績を報告する。

### I. 材料および方法

#### 1. 使用薬剤

PZFX (富山化学工業), ofloxacin (OFLX, 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品) および tosufloxacin (TFLX, 富山化学工業) を用いた。なお, OFLX および

CPFX は市販品から抽出したものをを用いた。

#### 2. 使用菌株および使用細胞

当研究所保存の臨床分離株である *P. aeruginosa* S-1299 と *S. enteritidis* C-32 をを用いた。また, ヒト胎児小腸細胞 Intestine 407, ヒト胎児肺2倍体細胞 MRC-5 およびヒト成人肝細胞 Chang Liver は大日本製薬より購入した。ヒト好中球はヒト末梢静脈血より分離分画した。

#### 3. 使用培地

細菌用前培養培地には Mueller Hinton broth (DIFCO) を, MIC 測定用には Mueller Hinton agar (DIFCO, 以下 MHA と略) を使用した。生菌数測定には Heart Infusion agar (栄研化学, 以下 HIA と略) を使用した。Intestine 407 および Chang Liver の培養には Eagle's MEM (日本製薬) を, MRC-5 の培養には Eagle's MEM with Hank's salts (FLOW) を, ヒト好中球の培養には RPMI 1640 培地 (日本製薬) をを用いた。培地添加用血清は Fetal bovine serum (GIBCO, 以下 FBS と略) をを用いた。

#### 4. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

日本化学療法学会標準法<sup>4)</sup> に準じて, 寒天平板希釈法で MIC を測定した。

#### 5. ヒト好中球 (PMN) の分離

古賀ら<sup>5-8)</sup> の方法に従い, 健康成人の末梢静脈血をヘパリン加採血し, Mono-Poly resolving medium (以下 M-PRM と略, ICN Biomedicals, Australia) をを用いて PMN の

分離を行った。即ちM-PRM 3mlに新鮮ヘパリン血液3mlを重層後、遠心分離(KUBOTA 5700, ローター:RS-4/6, 300×g, 20min, 室温)した。PMN層を分画して、10mM HEPES(和光純薬)加 Hanks' balanced salt solution(日水製薬, pH7, 以下HEPES-HBSSと略)で洗浄し、赤血球の混入があれば、0.2% NaCl溶液にて約30秒溶血させた後、1.6% NaCl溶液を等量加えて等張液とした。HEPES-HBSSで2回遠心洗浄(KUBOTA 5700, 300×g, 10min, 4℃)後、細胞数が $2 \times 10^6$  cells/mlになるように再浮遊させた。

#### 6. 培養細胞Intestine 407, Chang LiverおよびMRC-5の培養

ヒト胎児小腸細胞Intestine 407およびヒト成人肝細胞Chang Liverは10% FBS添加Eagle's MEM培地中で、5% CO<sub>2</sub>存在下37℃, 4日間培養フラスコ(CORNING)で培養した。0.02% EDTA-0.25% Trypsin溶液(COSMO BIO)で37℃, 2分間処理し、細胞を剥離後、細胞浮遊液とした。10% FBS添加Eagle's MEM培地中に浮遊させ、遠心操作(KUBOTA 5700, 150×g, 5min, 4℃)によりTrypsinを除き、細胞数が $2 \times 10^6$  cells/mlになるように再浮遊させた。

ヒト胎児肺正常2倍体細胞MRC-5は10% FBS添加Eagle's MEM with Hanks' salts培地で、5% CO<sub>2</sub>存在下、37℃, 24時間培養した。細胞付着後、10% FBS添加Eagle's MEMの培地に交換し、さらに3日間培養フラスコで培養した後、Intestine 407細胞およびChang Liver細胞と同様の方法により、細胞を採取し試験に用いた。付着した細胞は0.02% EDTA-0.25% Trypsin溶液で剥離し、球形とした後、コールターカウンター ZM (COULTER)で細胞の直径を測定し体積を求めた。 $1 \times 10^6$ 個のIntestine 407, MRC-5およびChang Liverの体積はそれぞれ1.57, 3.12, 1.97 $\mu$ lであった。なお、上述したヒト好中球の体積は0.27 $\mu$ lであった。

#### 7. ヒト好中球および培養細胞へのキノロン薬の移行

ヒト好中球あるいは培養細胞の浮遊液1.5mlにHEPES-HBSSで2 $\mu$ g/mlに調整したPZFX, OFLX, CPFXおよびTFLX溶液を等量加え、最終濃度を1 $\mu$ g/mlとし、37℃, 30分間培養した。培養後、シリコン油による濃度勾配遠心分離法を用いて、細胞と細胞外液を分離した。すなわち、1.5mlのマイクロテストチューブ(EPPENDORF)にシリコン油(信越シリコン: KF-99)を0.5ml入れ、その上に細胞浮遊液を0.8ml重層し、遠心分離(TOMY MRX-150 ローター: TMA-4, 10,000×g, 10分間, 4℃)した。その上清を細胞外液濃度測定用検体とした。細胞層は凍結、融解後、HPLCキャリアーにて再浮遊、超音波にて細胞を破壊した。遠心分離(TOMY MRX-150, 10,000×g, 10min, 4℃)後、その上清を細胞内濃度測定用検体とした。

薬剤濃度はHPLC(HITACHI: L-6200 Intellignet pump, F-1050 Fluorescens spectrophotometer, D-2500 Chromato-integrator)を用いて測定した。カラムはエンプレイカラム(ケムコ $\phi$ 4.0×150mm)にSTR ODS-II(島津テクノロジー)を充填し用いた。

各キノロン薬の測定用励起波長(Ex)および蛍光波長(Em)はPZFXでは327nm, 394nm, OFLXでは293nm, 495nm, CPFXでは279nm, 452nm, TFLXでは343nm, 418nmを用いた。移動相はPZFX, TFLXの場合、0.68% テトラブチル-n-アンモニウム(東京化成)10mMリン酸緩衝液(pH7.0)/アセトニトリル(15% or 25%), OFLX, CPFXの場合、0.15% オクタンシルホネートNa(東京化成)10mMクエン酸緩衝液(pH3.5)/アセトニトリル(30%)を用いた。なお、流速は1ml/minで、室温で測定した。各細胞の体積から細胞内薬剤濃度を算出し、細胞外濃度に対する比率(C/E ratio)を求めた。

#### 8. 細胞内感染菌に対する薬剤の殺菌作用

##### i) *P. aeruginosa*の場合

ヒト好中球を20% FBS添加RPMI 1640培地(日水製薬)に $1 \times 10^6$  cells/ml浮遊させ、 $2 \times 10^7$  CFU/mlの*P. aeruginosa* S-1299を加え、37℃で30分間培養した。Dulbecco's PBS(-)(日水製薬, 以下PBS(-))にて2回遠心分離(KUBOTA 5700, ローター: RS-4/6, 300×g, 10min, 4℃)し、細胞外の菌を除菌後、20% FCS添加RPMI 1640培地(日水製薬, GM: 100 $\mu$ g/ml加)に $1 \times 10^6$  cells/mlになるように再浮遊させた。この細胞浮遊液に各キノロン薬を0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13 $\mu$ g/mlになるように添加し、37℃で4時間培養した後、PBS(-)を用いて2回の遠心操作(KUBOTA 5700, ローター: RS-4/6, 300×g, 10min, 4℃)による薬剤の除去を行った。滅菌蒸留水を添加攪拌し、細胞膜を破壊した後、等量の1.8% NaCl溶液を添加した。この細胞破壊溶液をHIAに播種し、細胞内生菌数を測定した。

##### ii) *S. enteritidis*の場合

Intestine 407細胞を10% FBS添加Eagle's MEM培地にて37℃, 5% CO<sub>2</sub>下で4日間培養した後、培地を10% FBS Dulbecco's Modified Eagle medium(日水製薬)に交換した。 $1 \times 10^6$  cells/mlの細胞浮遊液に対し、 $2 \times 10^7$  CFU/mlの*S. enteritidis* C-32を加え、37℃, 5% CO<sub>2</sub>下で30分間培養した。PBS(-)にて2回洗浄後、10% FBS Dulbecco's Modified Eagle medium(KM: 6.25 $\mu$ g/ml加)を1ml加えた。この付着細胞に各キノロン薬を0.05, 0.2, 0.8 $\mu$ g/mlになるように添加した。4および20時間後に、Trypsin-EDTA処理にて細胞をシャーレより剥離し、10% FBS-Eagle's MEM培地で洗浄後、0.5mlの滅菌蒸留水を加え、1,700×g, 5分間の遠心により細胞膜を破壊した。この液に等量の1.8% NaCl溶液を添加後、HIAに播種し、細胞内生菌数を測定した。

## II. 結 果

### 1. キノロン薬の細胞内への移行性

ヒト好中球およびヒト培養細胞(Intestine 407, MRC-5 およびChang Liver)を用い, PZFX, OFLX, CPFXおよびTFLXの細胞外薬剤濃度に対する細胞内薬剤濃度の比率(C/E ratio)を求めた。その結果をFig. 1に示す。

ヒト好中球におけるPZFXのC/E ratioはOFLX(7.9)とほぼ同程度の7.1で, CPFXの約1/2, TFLXの約1/3であった。

ヒト培養細胞におけるPZFXのC/E ratioも他剤より低値を示し, Intestine 407細胞の場合7.4で, OFLX, CPFX, TFLXの約1/2~2/3であった。またMRC-5細胞の場合3.4を示し, OFLX, CPFX, TFLXの約2/3, Chang Liver細胞の場合2.1を示し, OFLX, CPFX, TFLXの約1/3~2/3であった。

### 2. 細胞内感染菌に対するキノロン薬の殺菌効果

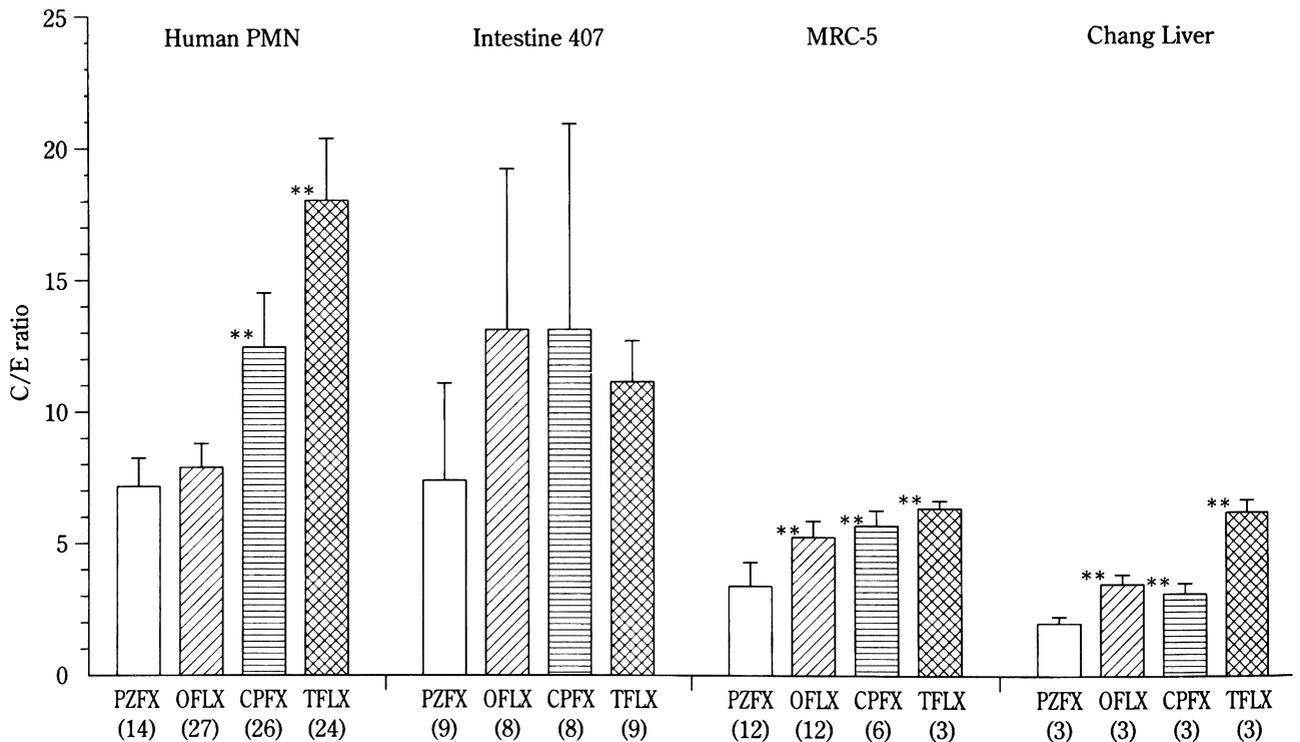
ヒト好中球に*P. aeruginosa* S-1299を貪食させ, 0.2~3.13 $\mu\text{g/ml}$ のキノロン薬を作用させた時の細胞内生菌数をFig. 2に示す。薬剤無添加の場合, ヒト好中球中の*P.*

*aeruginosa*の生菌数は増加せず, ほぼ一定であった。薬剤添加の場合は, いずれの薬剤作用時にも, 添加濃度に相関した生菌数の減少がみられ, PZFXはOFLXより若干優れ, CPFX, TFLXと同等の細胞内殺菌効果を示した。なお, *P. aeruginosa* S-1299に対するPZFX, OFLX, CPFXおよびTFLXのMICはそれぞれ0.39, 1.56, 0.39, 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。

また, Intestine 407に*S. enteritidis* C-32を感染させ, 0.05~0.8 $\mu\text{g/ml}$ のキノロン薬を作用させた時の細胞内生菌数をFig. 3に示す。薬剤無添加の場合, Intestine 407細胞内の*S. enteritidis* C-32の生菌数は増加した。薬剤添加の場合は, いずれの薬剤も0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で, 細胞内の生菌数を低下させた。PZFXの殺菌効果はTFLXより劣るものの, OFLX, CPFXとはほぼ同程度の効果を示した。なお, *S. enteritidis* C-32に対するPZFX, OFLX, CPFXおよびTFLXのMICはそれぞれ0.025, 0.1, 0.05, 0.025 $\mu\text{g/ml}$ であった。

## III. 考 察

細胞内寄生性細菌は, 宿主組織細胞内に寄生したり,



Quinolones (1  $\mu\text{g/ml}$ ) were incubated with human PMN and various human tissue culture cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) for 30 min at 37°C in HANKS-HEPES buffer (pH 7.0).

Each C/E ratio represents the mean  $\pm$  standard deviation.

( ): Number of experiments

PZFX: Pazufloxacin, OFLX: Ofloxacin, CPFX: Ciprofloxacin, TFLX: Tosufloxacin

C/E ratio: cellular concentration/extracellular concentration

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  compared with value of PZFX (Tukey test)

Fig. 1. Penetration of pazufloxacin into human polymorphonuclear leukocyte (PMN) and various human culture cells.

好中球やマクロファージ等の食細胞に貪食されたあとも細胞内に生存し増殖するために、感染を難治化させる。これらの細菌として *S. enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia*などが知られている。このような細菌による感染症を治療する場合、使用する抗菌薬はこれらの細菌に対し抗菌力を有することは勿論のことであるが、さらに食細胞および宿主組織細胞内へ良好に移行することが要求される。従って各種抗菌薬の細胞内移行性を知ることは、細胞内寄生性細菌による感

染症を治療する上で非常に重要なことである。今回我々は、新規キノロン薬のPZFXのヒト好中球および各種ヒト組織培養細胞への移行性を他のキノロン薬と比較するとともに、併せて細胞内細菌に対する殺菌効果も検討した。

ヒト好中球へのPZFXの移行率はOFLXとほぼ同程度の値を示したが、CPFAXやTFLXより低かった。キノロン薬のヒト好中球内への移行性は古賀ら<sup>5-8)</sup>やPereaら<sup>9,10)</sup>によって検討されており、それによれば、OFLXのC/E

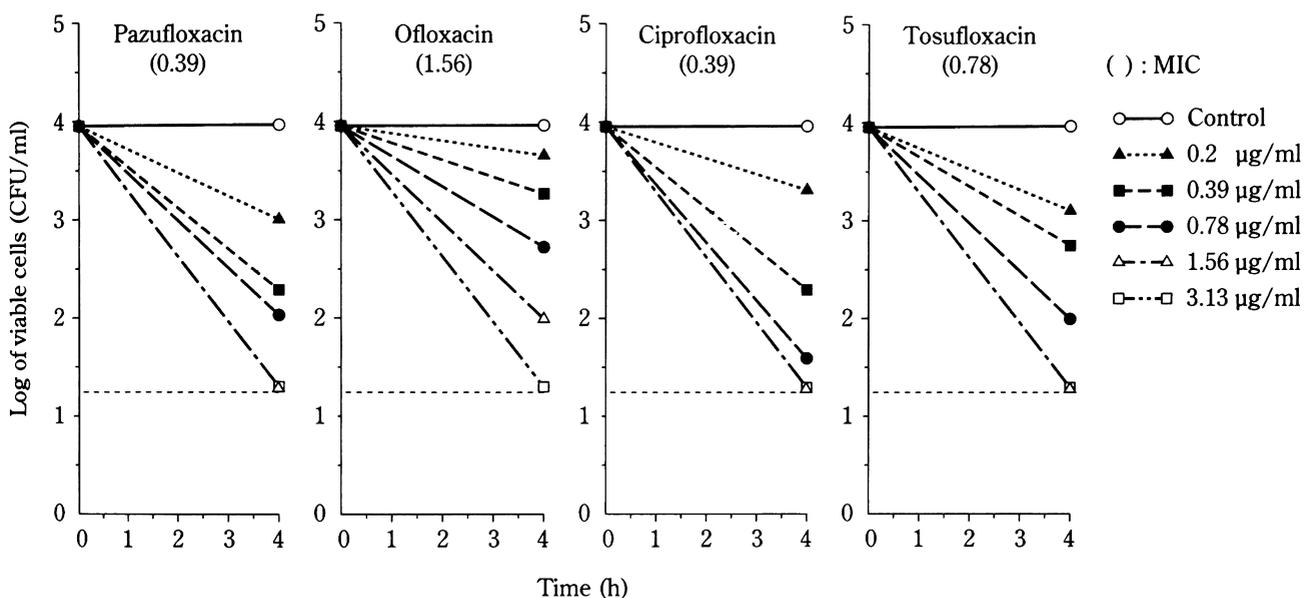


Fig. 2. Intracellular bactericidal activity of pazufloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* S-1299 in human polymorphonuclear leukocyte (PMN).

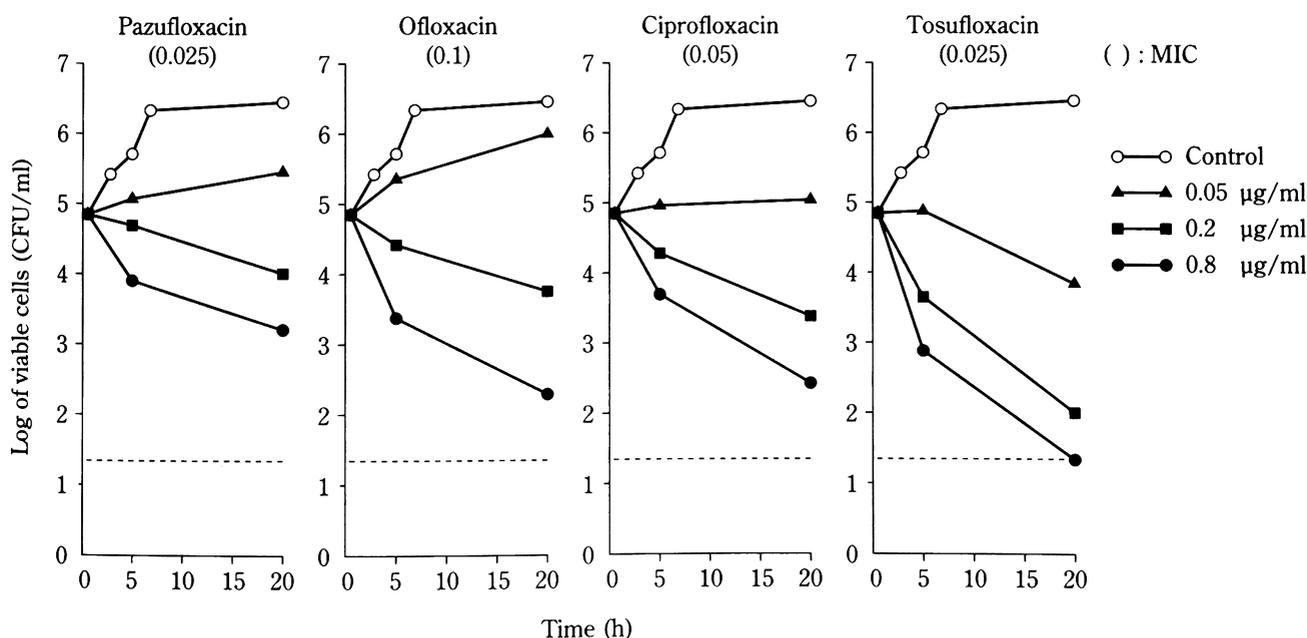


Fig. 3. Intracellular bactericidal activity of pazufloxacin against *Salmonella enteritidis* C-32 in human Intestine 407 cells.

ratioはほぼ8前後であり、我々の結果も7.9で彼らの値とよく一致していた。これらの成績から考えると本剤のヒト好中球への移行性はキノロン薬の中でも低く、erythromycinとほぼ同等と思われた<sup>8)</sup>。

ヒト培養細胞へのPZFXの移行率は今回比較したいいずれの薬剤よりも低かった。Pereaら<sup>10)</sup>はOFLXを用い、McCoy, Hep-2等の培養細胞とヒト好中球の細胞内移行性の検討を行い、培養細胞への移行はヒト好中球より低値であると報告している。今回、このような傾向はヒト肺細胞のMRC-5やヒト肝細胞のChang Liverでは認められたが、薬剤の吸収部位の小腸由来細胞であるIntestine 407では明確ではなかった。

次にヒト好中球に貪食された*P. aeruginosa* S-1299に対するPZFXの細胞内殺菌性を調べたところ、OFLXよりは若干優れていた。好中球への移行率がほぼ同じである両剤の細胞内殺菌効果は*in vitro*抗菌力にほぼ関連していた。

また、CPFX, TFLXと比較すると*in vitro*抗菌力は同じで、PZFXの細胞内移行性はCPFX, TFLXの約1/2, 1/3であるにもかかわらず、PZFXではCPFX, TFLXと同等の細胞内殺菌効果が得られた。この結果は細胞内移行性と*in vitro*抗菌力だけでは十分な説明ができなかった。三谷ら<sup>11)</sup>はキノロン薬による好中球のスーパーオキシド産生能の増強効果を報告しており、このような観点からも今後さらに本剤において検討を進めていく必要があると思われる。

ヒト胎児小腸細胞Intestine 407に感染した*S. enteritidis* C-32に対するPZFXの細胞内殺菌効果はTFLXより劣るものの、OFLX, CPFXと同程度であった。その殺菌効果は各キノロン薬の細胞内移行性と抗菌力をほぼ反映したものであった。

なお、今回細胞外の細菌を殺菌するため、*P. aeruginosa*の場合は100 $\mu$ g/mlのGMを、*S. enteritidis*の場合は6.25 $\mu$ g/mlのKMを用いており、細胞内細菌に対する影響が懸念された。しかし、GMのPMN内移行率(C/E ratio)は0.13(未発表データ)であり、細胞内GM濃度は試験菌に対するMIC(25 $\mu$ g/ml)以下と考えられた。*S. enteritidis*に対するKMの影響については、すでにNoumiら<sup>3)</sup>がほとんどないことを報告している。また、GMあるいはKMとPZFX, OFLX, CPFX, TFLX間に相互作用がみられないことから、今回用いたGMおよびKM濃度は細胞内細菌に対するキノロン薬の殺菌効果にほとんど影響を与えないものと考えられる。

以上、PZFXは他のキノロン薬に比べ細胞内移行性は若干劣るものの、優れた*in vitro*抗菌力を反映し、細胞

内細菌に対して他のキノロン薬と同等の殺菌効果を示した。

## 文 献

- 1) 卯田昭夫, 他: ヒト好中球内*Staphylococcus aureus*におよぼすofloxacinの影響。(臨床薬理) Jpn J Clin Pharmacol Ther 24: 57~58, 1993
- 2) Milatovic D: Intraphagocytic activity of ciprofloxacin and CI 934. Eur J Clin Microbiol 5: 659~660, 1986
- 3) Noumi T, Nishida N, Minami S, Watanabe Y, Yasuda T: Intracellular activity of tosufloxacin(T-3262) against *Salmonella enteritidis* and ability to penetrate into tissue culture cells of human origin. Antimicrob Agents Chemother 34: 949~953, 1990
- 4) MIC測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) Koga H: High-performance liquid chromatography measurement of antimicrobial concentrations in polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob Agents Chemother 31: 1904~1908, 1987
- 6) Taira K, Koga H, Kohno S: Accumulation of a newly developed fluoroquinolone, OPC-17116, by human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob Agents Chemother 37: 1877~1881, 1993
- 7) 古賀宏延, 他: 各種抗生剤のヒト多形核好中球内への移行に関する研究。Chemotherapy 33: 688~695, 1985
- 8) 真崎美矢子, 他: マクロライド系抗生剤のヒト好中球内への移行に関する研究。Chemotherapy 35: 709~713, 1987
- 9) Pascual A, Garcia I, Perea E J: Fluorometric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob Agents Chemother 33: 653~656, 1989
- 10) Pascual A, Garcia I, Perea E J: Uptake and intracellular activity of an optically active ofloxacin isomer in human neutrophils and tissue culture cells. Antimicrob Agents Chemother 34: 277~280, 1990
- 11) 三谷比呂志, 清田 浩: 白血球殺菌能に及ぼすニューキノロン剤の影響。感染症誌 66: 59~65, 1992

## Penetration of pazufloxacin into human polymorphonuclear leukocyte and human tissue culture cells and its intracellular bactericidal activity

Hidetada Mikami, Reiko Tsuneda, Tomiko Hori, Shinzaburo Minami, Takashi Yasuda,  
Yasuo Watanabe and Hirokazu Narita  
Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.  
2-4-1, Shimookui, Toyama City, Toyama 930, Japan

The penetration of a new quinolone, pazufloxacin (PZFX), was compared with those of ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX) and tosufloxacin (TFLX) using human polymorphonuclear leukocyte (PMN) and various human tissue culture cells (Intestine 407, MRC-5 and Chang Liver). The intracellular bactericidal activities against *Pseudomonas aeruginosa* S-1299 in human PMN, and *Salmonella enteritidis* C-32 in human Intestine 407 cells were also compared.

The cellular concentration to the extracellular concentration (C/E ratio) of PZFX in human PMN was similar to that of OFLX but lower than those of CPFX and TFLX. The penetration of PZFX into human tissue culture cells was also lower than those of other three quinolones.

The intracellular bactericidal activity of PZFX against *P. aeruginosa* S-1299 phagocytosed by human PMN was somewhat superior to that of OFLX, and equal to those of CPFX and TFLX, and its activity against *S. enteritidis* C-32 infected in human Intestine 407 cells was inferior to that of TFLX, but equal to those of OFLX and CPFX.

It is concluded that the penetration of PZFX into human cells was somewhat lower than those of other three quinolones, but intracellular bactericidal activity of PZFX was equal to those of other quinolones.