

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

永山在明

福岡大学医学部微生物学教室*

*Chlamydia trachomatis*の標準株および臨床分離株20株に対するazithromycin (AZM)の*in vitro* 抗菌力を2種類のマクロライド剤と3種類のニューキノロン薬, ならびにminocycline (MINO)と比較した。

臨床分離株20株に対するMIC値 (minimal inhibitory concentration; $\mu\text{g/ml}$) は次のとおりであった。AZMでは0.063~0.125, erythromycin (EM)では0.125~0.25, clarithromycin (CAM)では0.008~0.016, sparfloxacin (SPFX)では0.031~0.063, tosufloxacin (TFLX)では0.125~0.25, ofloxacin (OFLX)では0.5~1.0, MINOでは0.031~0.063であった。標準株Dに対するMIC値も臨床分離株に対するそれと全く同じ範囲内であった。

標準株Dに対するAZMのMLC値 (minimal lethal concentration; $\mu\text{g/ml}$) はMIC値のわずか2倍の値を示したのに反し, 他のマクロライド, ニューキノロン, テトラサイクリン剤はいずれもMIC値の8~16倍の高値を示した。又, 各種薬剤の存在下においてMLCに対する影響についても検討を行った。

Key words: *Chlamydia*, azithromycin, 最小発育阻止濃度, 最小致死濃度

近年, *Chlamydia trachomatis*による非淋菌性尿道炎・生殖器炎がひそかに蔓延し, 産科, 泌尿器科領域で注目され, 性行為感染症 (sexually transmitted disease, STD) に対する関心が高まっている。最近, *C. trachomatis* に対するの抗菌活性を示すいくつかのマクロライド系薬剤, ニューキノロン系薬剤が開発・発売されている。azithromycin (AZM) はマクロライド系のひとつであるが, これまでの薬剤と比較して細胞内透過性および持続性が極めて優れている¹⁾。したがって, 細胞内寄生性細菌のクラミジアに対するの効果が非常に期待できる。そこで, 現在発売されている2種類のマクロライドと3種類のニューキノロン薬, ならびにミノサイクリンの *C. trachomatis* に対するMIC (minimal inhibitory concentration) とMLC (minimal lethal concentration) を測定し, AZMの特徴を検討することにした。

I. 材料と方法

1. 薬剤

検討した薬剤は, AZM, erythromycin (EM), clarithromycin (CAM) の3種類のマクロライド剤, sparfloxacin (SPFX), tosufloxacin (TFLX), ofloxacin (OFLX) の3種類のニューキノロン薬と, クラミジア感染症に有効とされるテトラサイクリン系薬剤のminocycline (MINO) の合計7薬剤である。AZMはファイザー製薬, EMとSPFXは大日本製薬, CAMは大正製薬, TFLXは富山化学, OFLXは第一製薬, MINOは日本レダグ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。

2. *C. trachomatis* の増殖と培養

Reference strainとして *C. trachomatis* D株 (D/UW-3/Cx), および当教室 (佐賀医科大学微生物学教室および福岡大学医学部微生物学教室) において分離・同定された *C. trachomatis* 臨床分離株20株を用いた。クラミジアは一般細菌と異なり, 増殖のために生きた細胞が必要な偏性細胞内寄生性微生物である。そのために薬剤の抗菌力測定には, クラミジアの増殖の場として感受性のある組織培養細胞が必要である。国立予防衛生研究所ウイルス中央研究部より分与されたHeLa 229細胞を宿主として使用した。24穴カルチャープレート (コーニング, 25820) に培養したHeLa 229単層培養細胞にreference strainあるいは臨床分離株を継代し増殖させた。それぞれ2, 200rpm, 40分遠心し感染させ, DMEM維持培地 - Dulbecco's minimum essential medium (DMEM), 2% Fetal calf serum (FCS), 1 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (CH) - を1.0ml加え36°C, 炭酸ガス培養器で培養した^{2,3)}。感染72時間後に培地を取り除き, 各穴に1.0mlのsucrose-phosphate-glutamate medium (SPG; sucrose 75.0g, KH₂PO₄ 0.52g, Na₂HPO₄ 1.22g, glutamic acid 0.72g, distilled water 1,000ml) を加え細胞を剥離し集め-80°Cに凍結保存し一部は封入体形成数 (inclusion forming units; IFU/ml) を測定し, 抗菌力測定のための標準感染液とした。

3. 抗菌力の測定

MIC測定はHeLa 229細胞を用い, 日本化学療法学会クラミジアMIC測定法に準じて^{4,5)}測定した。24穴カルチ

*〒814-01 福岡市城南区七隈7-45-1

ヤープレートに13mmのカバーガラスを入れ、HeLa 229の単層培養細胞を準備した。*C. trachomatis*各株の標準感染液をSPGで $3.0\sim 5.0\times 10^4$ IFU/mlになるように希釈し、その0.2mlを接種し($6\sim 10\times 10^3$ IFU/well), 2, 200rpm, 40分遠心して感染させた。感染後inoculumを除き、各希釈系列の各種薬剤を添加したDMEM維持培地1.0mlを加え、炭酸ガス培養器を用いて36℃で培養した。72時間後にカバーガラスを取り出し、メタノールで固定し蛍光抗体法(オーソクラミジア, Culture set[®])により封入体形成の有無を蛍光顕微鏡下に観察し、封入体の形成を阻止する薬剤の最小濃度をMICとした。

MLCは日本化学療法学会クラミジアMLC測定法に準じて^{5,6)}測定をおこなった。MIC測定の手順にしたがって*C. trachomatis* D株をHeLa 229細胞に感染させ、検討すべき各希釈系列の抗菌剤存在下に72時間培養後、被検薬剤を洗浄除去しDMEM維持培地を1.0ml添加し、さらに48時間再培養し封入体の有無を観察し、封入体形成を抑制する最小薬剤濃度をMLC_{72h}とした。なお、各種薬剤の特徴を検討するために、感染後8時間、20時間に薬剤を添加した場合の封入体形成阻止濃度、ならびに薬剤作用20時間で薬剤を除去した時のMLC_{20h}も測定し比較した。

II. 結 果

1. 各種薬剤のMIC値とMLC値

Table 1にマクロライド系3剤、ニューキノロン系3剤

Table 1. MICs and MLCs of three macrolides, three quinolones and minocycline against *Chlamydia trachomatis* D/UW/-3/Cx

Agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MLC ($\mu\text{g/ml}$)
Azithromycin	0.125	0.25
Erythromycin	0.125	2.0
Clarithromycin	0.016	0.125
Sparfloxacin	0.031	0.5
Tosufloxacin	0.125	2.0
Ofloxacin	1.0	8.0
Minocycline	0.031	0.25

およびMINOの*C. trachomatis*標準株に対するMIC値およびMLC値を示す。検討した3つのマクロライド剤のなかでは、CAMが最も優れたMIC値(0.016 $\mu\text{g/ml}$)を示し、この値はニューキノロン、MINOもふくめて最も優れた値であった。AZMはEMと同等の抗菌力(MIC; 0.125 $\mu\text{g/ml}$)を示した。ニューキノロン系ではSPFXがMIC; 0.031 $\mu\text{g/ml}$ と優れた値を示し、TFLXはAZM, EMと同じ0.125 $\mu\text{g/ml}$ であった。OFLXのMIC値は1.0 $\mu\text{g/ml}$ でこれまで報告された値と同じである。クラミジア感染症に有効なMINOのMICは、これまでの報告と変わらず0.031 $\mu\text{g/ml}$ であった。Table 2に非淋菌性尿道炎から分離された*C. trachomatis* 20株に対するMIC値を示す。臨床分離株に対する抗菌力を標準株に対するそれと全く同じ範囲内にあった。D株に対するMIC値とMLC値の差をみると、AZMでは0.125:0.25 $\mu\text{g/ml}$ でMLC値はMIC値の2倍で、その差が小さいのに反し、他のマクロライド、ニューキノロン、テトラサイクリン剤はいずれもMIC値の8~16倍の高値を示した。したがって、AZMのMLC; 0.25 $\mu\text{g/ml}$ はMINOと全く同等で、CAMの値(0.125 $\mu\text{g/ml}$)に匹敵する良好な値となった。ニューキノロン、マクロライド、テトラサイクリンはそれぞれ作用点が異なる。したがって、各種薬剤のクラミジアに対する特徴を検討するために、*C. trachomatis* D株を感染させ薬剤をA(0h+); 感染と同時に、B(8h+); 8時間目、C(20h+); 20時間目に添加する、D(20h-); 0時間に薬剤添加、20時間で除去するという薬剤の作用開始時間、あるいは作用持続時間を変化させ、いずれも48時間目に封入体の有無を検索した結果をTable 3に示す。薬剤添加を感染と同時に行うA(0h+)はAZM; 0.125, EM; 0.125, OFLX; 1.0, SPFX; 0.063, MINO; 0.031($\mu\text{g/ml}$)で、添加時間を8時間遅らせてもその値はほぼ同じであった(B)。20時間目に薬剤を添加すると、ニューキノロンは128 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度でもクラミジアの増殖を阻止することは出来なかった。EMとMINOのC(20h+)はそれぞれ1.0, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。AZMは0.5 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れた値を示した(C)。

III. 考 察

近年、AIDSが話題を集め世界的に性行為感染症

Table 2. Activities of three macrolides, three quinolones and minocycline against 20 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis*

Agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								Total
	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1.0	
Azithromycin				7	13				20
Erythromycin					15	5			20
Clarithromycin	12	8							20
Sparfloxacin			8	12					20
Tosufloxacin					14	6			20
Ofloxacin							13	7	20
Minocycline			18	2					20

(sexually transmitted disease, STD) に対する関心が高まって来ている。このようななかで、*C. trachomatis* は非淋菌性尿道炎の病原微生物として極めて重要であることが判明し、注目されている。

クラミジアはエネルギー代謝系の欠損のため、生きた細胞内でのみ増殖できる偏性細胞内寄生性微生物である。一方、AZMは白血球や細胞内への浸透とその持続性が高く、クラミジアに対する効果が期待できる。したがって、*C. trachomatis* に対する *in vitro* 抗菌力を検討し、現在市販されているマクロライド、ニューキノロン系抗菌薬およびMINOの抗菌力と比較すると同時に、薬剤の特徴を把握することは有意義であると考えられる。

AZMのMIC値は、標準株 Dおよび臨床分離株20株に対して、0.063~0.125 $\mu\text{g/ml}$ であり、EMより若干優れ、CAMの8分の1、MINOの2~4分の1劣っていた。しかし、MLC値で比較すると、EMの8倍でMINOと同値、CAMともほぼ匹敵する良好な値となった。MLCは72時間薬剤が存在すれば、その後薬剤を除去しても感染性の elementary body (EB) の成熟を完全に阻止する濃度であり、AZMはMICとMLCの差が小さいのが特徴である (Table 1, 2)。

Table 2にみられるとおり、*C. trachomatis* では現在のところ今回検討した薬剤に耐性となった株はまだ出現していないことが判明した。当教室では、この10年余にわたって *C. trachomatis* の分離・同定をおこない多くの臨床分離株を樹立し、種々の薬剤の抗菌力を測定してきた。この間 *C. trachomatis* は一般細菌と異なりどの薬剤に対しても抵抗性をしめず耐性株は検出されず、なぜ耐性を獲得しないのかきわめて興味深い。

AZMのみがMIC/MLCの比が小さい理由として、AZMは細胞内で長時間高い濃度を保っていることが想像される。そこで、薬剤を感染から8時間後、20時間後に添加、また感染と同時に薬剤を加えるが、20時間目には薬剤を除き薬剤持続時間を短縮した実験を行った。Table 3の結果から、薬剤添加を感染と同時に行うA(0h+)は判定時間が48時間目と短いだけで、72時間で判定するMIC値 (Table 1) と同じ数値を示したのは当然であろう。添加時間を8時間遅らせてもその値はほぼ同じであった (B)。20時間目に薬剤を添加するとニューキノロンは全

く効果がなく、すでにDNAの合成が8時間目以降20時間までに完了していることを示唆している。蛋白合成阻害と考えられるAZM、EMとMINOはニューキノロンと比べると遅れて作用してもEBの形成をある程度抑制し、しかもAZM、EMはMINOよりもMIC値は1管劣っているにもかかわらずC(20h+)の値は優れており、マクロライドはクラミジア増殖のより後期の蛋白合成に阻害的に働いている可能性が示唆された。D(20h-)はMLC_{20h}でありMLC値の2~4倍、MIC値の16~32倍という値を示した。MLC_{72h}とMLC_{20h}に大きな差がないことは意外であったが、72時間かなりの濃度の薬剤が存在しクラミジアの増殖過程を抑制していても、その後薬剤を取り除いてしまうと、途中でストップしていた代謝系がふたたび復活してくることを意味している。*C. trachomatis* は特異的な増殖環を有し、感染後24時間ですでに感染性の菌体、EBが出現する。そして、72時間も経過すると細胞が変性し、細胞外にEBが放出されてくる。しかし、この時期でもひとつの細胞の封入体内でEBとreticulate body (RB) が混在しており、RBからEBへの転換は同調しているわけではない。まして、複数の細胞が感染している場合には、すべての細胞間で増殖サイクルが一致し同調しているわけではない。そこで、通常の感染の場では *C. trachomatis* の一世代は細胞間のサイクルのずれを考えるとすくなくとも72時間すなわち3日間以上と考えるべきである。したがって、MIC値とMLC値に8~16倍もの開きがあっても薬剤の血中・組織移行濃度がMIC値を越えてもMLC値に達しない薬剤にあっては、少なくとも、3日間の2~3倍、6~9日間の薬剤投与が必要になると考えられる。とくに、ニューキノロンは感染20時間後に薬剤を加えても増殖を停止させることは難しい (Table 3, C)。すなわち、増殖の1サイクルの途中では殆ど増殖を阻止することは出来ないから、さらに3日間長期に、10~12日間の服用が望まれると考えられる。しかし、AZMはMIC_{20h+} が0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、MLC_{72h} とMLC_{20h} がそれぞれ0.25、1.0 $\mu\text{g/ml}$ と比較した薬剤のなかで、非常に優れており、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度であれば短い作用時間でクラミジアの増殖を阻害できる可能性が示唆された。

Table 3. Effect of the period when the drug added on MICs and MLCs against *Chlamydia trachomatis* D strain ($\mu\text{g/ml}$)

Drug Period	Quinolones		Macrolide		Tetracycline
	ofloxacin	sparfloxacin	erythromycin	azithromycin	minocycline
A (0 h+)	1.0	0.063	0.125	0.125	0.031
B (8 h+)	2.0	0.063	0.125	0.125	0.063
C (20 h+)	>128	>128	1.0	0.5	2.0
D (20 h-)	16	2.0	4.0	1.0	1.0

IV. 結 語

*C. trachomatis*標準株ならびに臨床分離株に対するMIC値 ($\mu\text{g/ml}$) はAZM; 0.063~0.125, EM; 0.125~0.25, CAM; 0.008~0.016; SPFX; 0.031~0.063, TFLX; 0.125~0.25, OFLX; 0.5~1.0, MINO; 0.031~0.063であった。比較した7薬剤の中では、CAMのMIC値が最も小さく、ついでMINOのMIC値が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、抗菌力測定によっても判明した。AZMのMIC値はこの両者より劣っていたが、MLC値は両者と同等で十分クラミジア感染症の治療薬としての抗菌力を示した。これに対して、ニューキノロン系薬剤ではSPFXはMINOとほぼ同等でAZMより優れたMIC値、TFLXは、AZM, EMとほぼ同等のMIC値を有していたが、MLC値はAZMにおよばなかった。今回対照として検討した6薬剤は、OFLXも含めてクラミジア感染症の治療薬として認められている。薬剤の作用時間を変えての実験から、AZMは $\text{MLC}_{72\text{h}}$, $\text{MLC}_{20\text{h}}$ ともに極めて優れており、比較的短い作用時間で、クラミジアの増殖を阻止できることが判明した。これらの結果から、

AZMは短期投与でクラミジア感染症の治療が期待できる薬剤と考えられる。

文 献

- 1) Foulds G, Shepard R M, Johnson R B: The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J Antimicrob Chemother* 25 (Suppl. A): 73~82, 1990
- 2) Nagayama A, Nakao T, Taen H: *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1735~1737, 1988
- 3) 永山在明, 田縁晴子, 中尾偕主, 熊澤浄一, 西日本泌尿器科 49: 537~541, 1987
- 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—. *Chemotherapy* 40: 303~307, 1992
- 5) 日本化学療法学会: クラミジアMLC測定法—日本化学療法学会標準法—. *Chemotherapy* 40: 315~317, 1992
- 6) 永山在明: 特殊な微生物の感受性試験4. クラミジア。臨床検査 37: 885~887, 1993

In vitro activities of azithromycin against *Chlamydia trachomatis*

Ariaki Nagayama

Department of Microbiology, School of Medicine, Fukuoka University,
7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-01, Japan

The *in vitro* activities of azithromycin (AZM) against a reference strain and 20 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* were compared with the activity of two macrolides, three quinolones and minocycline.

The minimal inhibitory concentrations (MIC; $\mu\text{g/ml}$) for the isolates were as follows: AZM, 0.063 to 0.125; erythromycin, 0.125 to 0.25; clarithromycin, 0.008 to 0.016; sparfloxacin, 0.031 to 0.063; tosfloxacin, 0.125 to 0.25; ofloxacin, 0.5 to 1.0; and minocycline, 0.031 to 0.063. The results for the reference D strains were similar to those for the 20 clinical isolates.

The minimal lethal concentrations (MLC) of all antibiotics except AZM were 8 to 16 times higher than the respective MIC, while the MLC of AZM against D strain was only 2 times higher than its MIC. The effects on MLC of the duration of the presence of each drug were also studied.