

原 著

マウスの *Mycobacterium bovis* 感染に対する Ofloxacin の
効果 (Pyrazinamide 併用の影響)

束 村 道 雄

国立療養所中部病院

一 山 智

名古屋大学医学部第一内科

受付 昭和 61 年 10 月 22 日

ANTAGONISTIC EFFECT OF PYRAZINAMIDE AGAINST ANTITUBERCULOSIS
ACTIVITY OF OFLOXACIN IN MICE

Michio TSUKAMURA*, Satoshi ICHIYAMA

(Received for publication October 22, 1986)

1. *In Vivo* Experiment

Antituberculosis activity of ofloxacin in mice was observed using *Mycobacterium bovis* strain Ravenel, which was expected to be more virulent for mice than *M. tuberculosis* strain H37 Rv. Effect of pyrazinamide was also examined, as the effect of pyrazinamide was not yet studied in mice challenged by *M. bovis*. Female mice, weighing 26 ± 2 g, of the ddY-strain were challenged by an intraperitoneal injection of *M. bovis* strain Ravenel, 1.5×10^7 viable units per mouse. Eighty mice were divided into four groups: (1) control group mice received daily intraperitoneal injection of a 0.2 ml sample of a 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1); (2) pyrazinamide group mice received daily intraperitoneal injection of 1 mg of pyrazinamide; (3) ofloxacin group mice received daily intraperitoneal injection of 1 mg of ofloxacin; (4) ofloxacin-pyrazinamide group mice received daily intraperitoneal injection of 1 mg ofloxacin and 1 mg pyrazinamide. These treatments were begun from the next day of the challenge. At one week-intervals, three mice of each group were sacrificed and the number of viable bacteria in the livers and the lungs were measured. The effects of the treatment were determined by the number of viable bacteria in the liver and the lungs of one mouse.

As reported previously (Tsukamura, M: Am. Rev. Respir. Dis., 132:915, 1985), ofloxacin was eliminated most rapidly from the lungs and, therefore, the number of viable bacteria in the lungs was not influenced by the ofloxacin treatment. However, the number of viable bacteria in the liver was reduced markedly by the treatment with ofloxacin. The number of viable bacteria were never decreased by the treatment with pyrazinamide alone. In the mice treated with ofloxacin and pyrazinamide, the numbers of viable bacteria in the liver increased after 3-4 weeks. Pyrazinamide appeared to act antagonistically against the *in vivo* effect of ofloxacin.

2. *In Vitro* Experiment

In vitro growth-inhibitory activity of ofloxacin against *M. tuberculosis* and *M. bovis* were lowered in pH 6.2 ("3% Ogawa egg medium") than in pH 6.8 ("1% Ogawa egg medium"). Pyrazinamide alone did not show any activity in egg media even at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. It did not show any combined effect with ofloxacin in the *in vitro* experiment.

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Key words : *Mycobacterium bovis*, Ofloxacin, Pyrazinamide, Mice

キーワード : *Mycobacterium bovis*, Ofloxacin, Pyrazinamide, マウス

緒 言

Ofloxacin (DL-8280) が試験管内で *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum* に対して強力な発育阻止作用を示すことは, Tsukamura^{1) 2)} により報告された。また, この抗菌物質が肺結核の治療に有効なことも, Tsukamura et al.³⁾ により報告された。

Ofloxacin の抗結核菌作用の発見については特殊な事情がある。われわれが1983年春, Ofloxacin の研究を開始するにあたって, 第一製薬株式会社臨床開発部から, 本剤はマウスの実験結核に無効であり, 結核を含む抗酸菌感染症に対する有効性は悲観的であるとの情報を受けた。しかし, 当時既に本剤が一般細菌感染症に著効を呈しつつあるという情報があつたので, 本剤が試験管内で結核菌に強力な阻止作用を示す以上, 臨床的に有効でない筈はないという信念をもって1983年7月から肺結核患者に対する治療研究を開始した。その結果, 本剤の肺結核に対する臨床の有効性が認められた³⁾。これと並行してマウスを使用しての動物実験も行った。マウスに結核菌を注射し, Ofloxacin を投与しつつ, 週を追ってマウス肺中の結核菌数を数えたが, 対照との差がなく治療効果は認められなかった(未発表成績)。高橋⁴⁾ もマウスに1日量2, 4, 8mgのOfloxacinを経口投与しても, その治療効果は認められなかったと言う。高橋の実験も肺重量及び肺病変を治療効果の指標としていた。われわれは, ヒトの肺結核に対して効果を示すこの薬剤が, マウスの実験結核に無効な理由として, マウスの体内から本剤が急速に排泄される可能性を考えた。そこで, マウスにおける本剤の臓器中濃度を測定してみると, 肺からは急速に排泄されるのか, 肺中濃度は極めて低いことが分かった。一方, 肝, 腎では比較的高い濃度が得られた。そこで, 肝内の結核菌数の消長を指標として治療効果を判定すると効果が認められることが分かった⁵⁾。斉藤ほか⁶⁾ は, マウスの腎における菌の消長及び病変を指標として, 本剤が *M. fortuitum* に有効なことを報告しているが, この結果は, 先の臓器中濃度が腎で比較的高いことを考えると納得がゆく。

本報では, 前に使用した *M. tuberculosis* H37Rv株よりも, マウスに対して毒力が強い *M. bovis* Ravenel株を使用して, マウスの実験結核症に対するOfloxacinの効果を観察することにした。これと同時に, Pyrazinamide (PZA) について, 一つの試みを行った。PZA が

マウスに対する *M. tuberculosis* 感染で有効であることは, 既に1950年代前半に Malone et al.⁷⁾, Solotorovsky et al.⁸⁾ などによって報告されている。しかし, *M. bovis* を使用しての実験は, まだ行われていない。この理由は, 1954年に McDermott & Tompsett⁹⁾ が, PZAはpH5.5では *M. tuberculosis* の発育を6.25~16 µg/mlで阻止することを報告したが, *M. bovis* の発育は酸性pHにおいてもPZAによって阻止されなかったからである¹⁰⁾。従って, 本報では, PZAがマウス体内で本当に *M. bovis* に対して無効であるのかどうかを試してみることにした。そして, PZAの存在がOfloxacinの *in vivo* 効果に影響を与えるかどうかも観察してみることにした。

実験方法

In Vitro 実験における Ofloxacin と Pyrazinamide の併用効果 (“Actual Count 法”¹¹⁾ による発育阻止濃度)

In vitro 実験では, *M. tuberculosis* H37Rv 株と *M. bovis* Ravenel 株を使用した。培地は“1%小川培地 (pH 6.8)”と“3%小川培地 (pH 6.2)”を使用した。両培地とも, 165×16.5mm の試験管に7ml ずつ分注し, 90°C 60分間滅菌して斜面培地とした。Ofloxacin 及び PZA は滅菌前に培地に添加した。両者とも propylene glycol に溶解し, 所期濃度の100倍濃度液を作り, この1容を100容の小川培地に加えた。接種菌量は, 培地あたりの接種生菌数が20~100生菌単位となるように調整した¹¹⁾。このためには, まず10mg/ml の菌液を作り, これを0.1% Tween 80水溶液で希釈し, 10⁻¹~10⁻⁶液を作り, その0.02mlを渦巻白金耳で接種した。接種した試験管に, 底に3mmの切れ目のあるダブルゴム栓を覆せ, 37°Cに28日間培養した。6組の培地群で, 対照培地の発育集落数が20~100となった組で発育阻止濃度を判定した。

In Vivo 実験における Ofloxacin と Pyrazinamide の抗結核作用及びその併用効果

In vivo 実験では, *M. bovis* Ravenel 株を使用した。Ravenel 株は“1%小川培地”で37°C10日間培養し, ガラス玉コルベンで振盪して均一化した後, M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1)に, 湿菌量5mg/mlに浮遊させた。この0.2mlを, 体重(26±2)gの ddY 系雌マウスの腹腔内に注射した。この0.2mlの接種量には, 1.5×10⁷生菌単位の菌を含有していた。Rav-

enel 株を接種されたマウスは合計80匹で、これを次の4群に分け(各群20匹ずつ)、接種の翌日から次の治療を行った。

- 1) 対照群。M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) を0.2 ml ずつ毎日、腹腔内注射した。
- 2) PZA 群。PZA 1 mg を毎日、腹腔内注射した。
- 3) Ofloxacin 群。Ofloxacin 1 mg を毎日、腹腔内注射した。
- 4) Ofloxacin-PZA 併用群。Ofloxacin 1 mg と PZA 1 mg を毎日、腹腔内注射した。

PZA (三共製薬, 東京) は, M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) に5 mg/ml の割合に溶解し, その0.2 ml を注射した。また, Ofloxacin は, 2 mg/ml の割合に phosphate buffer solution に溶解し, その0.5 ml を注射した。併用群には, phosphate buffer solution に, Ofloxacin 及び PZA とともに2 mg/ml の割合に溶解させ, その0.5 ml を注射に使用した。

上述の治療を行いつつ, 毎週, 各群から3匹のマウスを殺し, その肺と肝をとって3匹分を一緒にして秤量し, 5倍量の0.9% NaCl 水溶液(生食水)を加え, ガラス製ホモジナイザーで擦り潰した。この臓器液に, 等量の2% NaOH 液を加えて混和し, 生食水で10倍希釈液を作って 10^{-4} まで希釈した。この 10^0-10^{-4} の5つの臓器液から, 渦巻白金耳で0.02 ml ずつを“1%小川培地”に接種した。接種後, 37°C に28日間培養して集落数を数えた。集落数と, 集落数を数えた希釈度と臓器重量から, 一匹のマウスの肺または肝に含有された生菌数を計算して図に記入した。

実験結果

1. *In Vitro* 実験における Ofloxacin と Pyrazinamide の併用効果(表)

“Actual count 法”による Ofloxacin の *M. tuber-*

Table *In Vitro* Combined Effect of Ofloxacin with Pyrazinamide on *Mycobacterium tuberculosis* Strain 05001 (H37Rv) and *Mycobacterium bovis* Strain 06001 (Ravenel)

Concentration of pyrazinamide used in combination ($\mu\text{g/ml}$)	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	Strain H37Rv		Strain ravenel	
	Size of inoculation: (45 \pm 15) ^a		Size of inoculation: (86 \pm 5)	
	1% Ogawa egg medium	3% Ogawa egg medium	1% Ogawa egg medium	3% Ogawa egg medium
0	0.5	1.0	0.5	1.0
100	0.5	1.0	0.5	1.0
200	0.5	1.0	0.5	1.0
500	0.5	1.0	0.5	1.0

a The number of viable bacteria inoculated to each medium.

The concentrations of ofloxacin tested were: 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 and 0 $\mu\text{g/ml}$.

“1% Ogawa egg medium”, pH 6.8

“3% Ogawa egg medium”, pH 6.2

culosis H37Rv 株に対する最小発育阻止濃度(MIC)は, “1%小川培地”(pH 6.8)では0.5 $\mu\text{g/ml}$, “3%小川培地”(pH 6.2)では1.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。また, *M. bovis* Ravenel 株に対するMICも, “1%小川培地”(pH 6.8)で0.5 $\mu\text{g/ml}$, “3%小川培地”(pH 6.2)で1.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。即ち, Ofloxacin の抗菌力は, 酸性 pH で低下した。

PZA は, “1%小川培地”でも, “3%小川培地”でも, 500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で全く抗菌力を示さなかった。そして, PZA 500 $\mu\text{g/ml}$ を併用しても, Ofloxacin の抗菌力に影響を及ぼさなかった。PZA の抗菌力は, *M. bovis* のみならず *M. tuberculosis* に対しても, pH のいかにかわからず小川培地では, 全くこれを認めることはできなかった。

2. *In Vivo* (マウス) 実験における Ofloxacin 及び Pyrazinamide の *M. bovis* に対する発育阻止作用及び併用効果(図1及び2)

対照群(無処置)では, 接種後4週まで, 肝内生菌数は増加し, のち, やや減少した。PZA 接種群のマウスの肝内生菌数は, 対照と比較して著明な差はなかった。これに対して, Ofloxacin 群では肝内生菌数は増加することなく減少した。一方, Ofloxacin-PZA 併用群では, 3~4週にかけて肝内生菌数が増加し, PZA 併用により Ofloxacin の効果が減弱するように思われた。

一方, 肺内生菌数は, 対照群及び PZA 群では, 6週後まで増加し続けた。しかし, Ofloxacin 群及び Ofloxacin-PZA 併用群では, 5~6週で若干増加傾向が鈍化するように思われた。

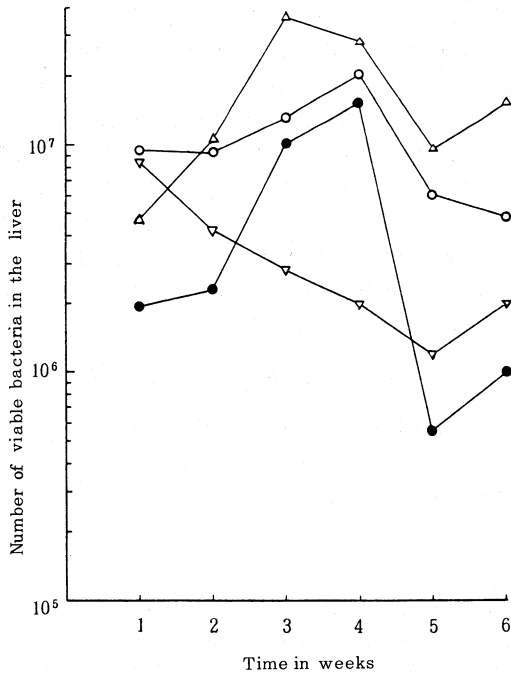


Fig. 1. Change in the number of viable bacteria of *Mycobacterium bovis* strain Ravenel contained in the liver of mice.

- Number of viable bacteria contained in the liver of mice that did not receive any agent ;
- △—△ Number of viable bacteria contained in the liver of mice that were treated with pyrazinamide ;
- ▽—▽ Number of viable bacteria contained in the liver of mice that were treated with ofloxacin ;
- Number of viable bacteria contained in the liver of mice that were treated with pyrazinamide plus ofloxacin.

考 察

本報では、*M. bovis* Ravenel 株をマウスに注射して、Pyrazinamide (PZA) 及び Ofloxacin の治療効果を見た。その結果は、肝内生菌数の消長を指標とすれば、Ofloxacin の治療効果を認めることができた。この結果は、前に行った *M. tuberculosis* を用いたマウス実験結核に対する Ofloxacin の効果を支持するものであった⁵⁾。Ofloxacin が肺内生菌数に対して、殆ど影響を与えなかった理由は、前報したごとく、この薬剤が肺から急速に排泄されて、肺内濃度が抗菌力発揮のための有効濃度に達しないためと思われる。PZA 単独投与の場合は、無処置の対照とほぼ変りない生菌数の経過を示し、PZA の有効性は認められなかった。PZA と Oflo-

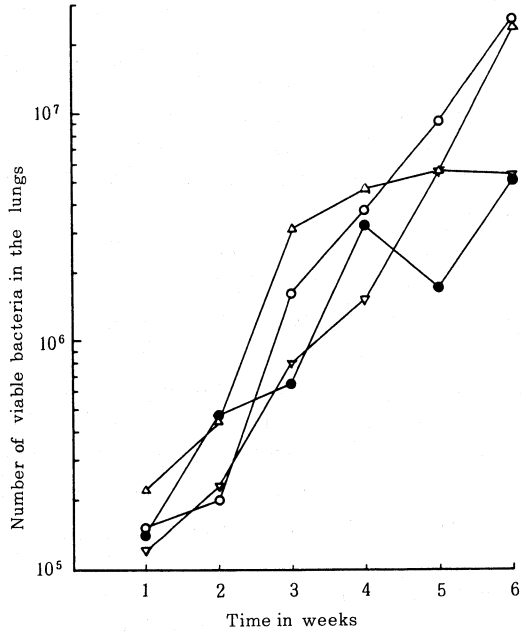


Fig. 2. Change in the number of viable bacteria of *Mycobacterium bovis* strain Ravenel contained in the lungs of mice.

- Number of viable bacteria contained in the lungs of mice that were not treated with any agent ;
- △—△ Number of viable bacteria contained in the lungs of mice that were treated with pyrazinamide ;
- ▽—▽ Number of viable bacteria contained in the lungs of mice that were treated with ofloxacin ;
- Number of viable bacteria contained in the lungs of mice that were treated with pyrazinamide plus ofloxacin.

xacin を併用した場合は、肝内生菌数が3~4週で増加し、Ofloxacin の治療効果が減弱するよう思われた。しかし、5~6週では、生菌数の低下が起こった。以上の所見から考えると、PZA は Ofloxacin の効力に対してある程度拮抗的に作用するよう思われる。

PZA がマウス体内で *M. bovis* に対して有効か無効かは、これまで報告がない。本報の実験では、少なくとも、PZA の有効性を支持する結果は得られなかった。そのみならず、PZA と Ofloxacin は動物体内で拮抗的に作用する可能性が示唆された。これについては、将来、*M. tuberculosis* を用いて確める必要があると思っている。

In vitro 実験で、PZA は培地の pH5.5 のときにのみ *M. tuberculosis* の発育を阻止するという報告がある⁹⁾。

その後の Stottmeier et al.¹²⁾ の実験でも、発育阻止は寒天培地で少量の接種量(1,000集落以下)を用いた場合にのみ認められている。発育阻止濃度は20~50 µg/mlである。PZAの *in vitro* 発育阻止作用は、寒天培地または液体培地でpH 5.5でのみ認められている(pH 6.0では125 µg/mlで阻止¹³⁾¹²⁾¹³⁾。このような特殊な条件で示される発育阻止作用が、蛋白質を主成分とする人体または動物体内で、そのまま作用しているとは考え難い。本報の実験にも示すように、PZAは500 µg/mlの濃度でも、卵培地中では全く阻止作用を示さない。従ってむしろ、Curtin¹⁴⁾ の言うように、PZAは500 µg/mlでも *in vitro* で阻止作用を示さなかったが、単核細胞内の結核菌の発育を12.5 µg/ml(血清中濃度)で阻止したという結果が説得力がある。即ち、生体細胞内で別の形に変化することにより有効性を発揮すると考えた方が説得力がある。欧米の学者の報告では、マウスやモルモットの実験結核で有効であったと言うし⁷⁾⁸⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、またヒトの肺結核の治療に有効であったという報告も多い(例えば、Yeager et al.¹⁷⁾; Schwartz & Moyer¹⁸⁾; McDermott et al.¹⁹⁾; Campagna et al.²⁰⁾; Phillips et al.²¹⁾)。PZAが *in vivo* でのみ有効という立場に立てば(特殊な条件以外では、PZAは *in vitro* では、*M. tuberculosis* に対しても *M. bovis* に対しても無効である)、*M. bovis* に対してもマウス体内で有効かもしれないと考えて、この実験を行ったが、PZA単独では全く効果が認められなかった。なお、日本の成績では、*M. tuberculosis* を用いても、マウス体内でのPZAの効果は、必ずしも判然と認められないようである²²⁾²³⁾。近藤・金井²³⁾によれば、*M. tuberculosis* が活発に繁殖する条件ではPZAの治療効果は認められなかったという。本報の実験では、マウスの肺及び肝、特に肺では *M. bovis* が活発に増殖したのでPZAの効果は認められなかったのかもしれない。

なお、本報の実験で明らかとなったもう一つの所見は、*M. tuberculosis* に対しても、また、*M. bovis* に対しても、Ofloxacinの *in vitro* 抗菌力は、pH 6.8(1%小川培地)の場合に比してpH 6.2(3%小川培地)で半減するということである。この点、酸性pHで *in vitro* 抗菌力が強まると言われるPZAの場合と逆である⁹⁾。

結 論

マウスに *Mycobacterium bovis* Ravenel 株を注射したところ、肺及び肝で生菌数の増加がみられた。このマウスに、Ofloxacinを毎日1mgずつ腹腔内注射すると、肝内の生菌数が著明に減少した。Pyrazinamideを毎日1mgずつ腹腔内に注射しても治療効果は認められなかった。OfloxacinとPyrazinamideを併用した場合は、Ofloxacinの効果は、Pyrazinamideによ

ってある程度減弱する結果となった。

なお、Ofloxacinの *M. tuberculosis* 及び *M. bovis* に対する *in vitro* 抗菌作用は、pH 6.8(1%小川培地)の場合に比して、pH 6.2(3%小川培地)では半減することが分かった。

文 献

- 1) Tsukamura, M.: *In vitro* antimycobacterial activity of a new antibacterial substance DL-8280. Differentiation between some species of mycobacteria and related organisms by the DL-8280 susceptibility test, *Micriobiol Immunol*, 27: 1129, 1983.
- 2) Tsukamura, M.: *In vitro* antituberculosis activity of a new antibacterial substance ofloxacin (DL-8280), *Am Rev Respir Dis*, 131: 348, 1985.
- 3) Tsukamura, M., Nakamura, E. et al.: Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL-8280) on pulmonary tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 131: 352, 1985.
- 4) 高橋 宏: DL-8280 および同系統薬剤の抗酸菌に対する抗菌作用, 第60回日本結核病学会総会報告(抄録), 結核, 60: 224, 1985.
- 5) Tsukamura, M.: Antituberculosis activity of ofloxacin (DL-8280) on experimental tuberculosis in mice, *Am Rev Respir Dis*, 132: 915, 1985.
- 6) Saito, H., Sato, K. et al.: *In vitro* and *in vivo* susceptibilities of *Mycobacterium fortuitum* to ofloxacin (DL-8280), *Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy*, p. 319, 1985.
- 7) Malone, L., Schurr, A. et al.: The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice, *Am Rev Tuberc*, 65: 511, 1952.
- 8) Solotorovsky, M., Gregory, F. J. et al.: Pyrazinoic acid amide—an agent active against experimental murine tuberculosis, *Proc Soc Exper Biol & Med*, 79: 563, 1952.
- 9) McDermott, W. and Tompsett, R.: Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acid environments *in vitro*, *Am Rev Tuberc*, 70: 748, 1954.
- 10) Runyon, E. H. et al.: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, and *M. microti* species descriptions, *Zentralbl f Bakteriologie, I Ori-*

- ginale, 204 : 405, 1967.
- 11) Tsukamura, M. : ' Actual count ' method for the resistance test of tubercle bacilli, Japan J Tuberc, 12 : 46, 1964.
 - 12) Stottmeier, K. D., Beam, R. E. et al. : Determination of drug susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide in 7H10 agar, Am Rev Respir Dis, 96 : 1072, 1967.
 - 13) Grumbach, F. : Activité antituberculeuse expérimentale du pyrazinamide (P.Z.A.), Ann Inst Pasteur, 94 : 694, 1958.
 - 14) Curtin, J. : The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamide, Am Rev Tuberc, 74 : 718, 1956.
 - 15) Dessau, F. I., Yeager, R. L. et al. : Pyrazinamide (aldinamide) in experimental tuberculosis of the guinea pig, Am Rev Tuberc, 65 : 519, 1952.
 - 16) Steenken, W., Jr. and Wolinsky, E. : The antituberculous activity of pyrazinamide *in vitro* and in the guinea pig, Am Rev Tuberc, 70 : 367, 1954.
 - 17) Yeager, R. L., Munroe, W. G. et al. : Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis, Am Rev Tuberc, 65 : 523, 1952.
 - 18) Schwartz, W. S. and Moyer, R. E. : The chemotherapy of pulmonary tuberculosis with pyrazinamide used alone and in combination with streptomycin, para-aminosalicylic acid, or isoniazid, Am Rev Tuberc, 70 : 413, 1954.
 - 19) McDermott, W., Ormond, L. et al. : Pyrazinamide-isoniazid in tuberculosis, Am Rev Tuberc, 69 : 319, 1954.
 - 20) Campagna, M., Calix, A. A. et al. : Observations on the combined use of pyrazinamide (aldinamide) and isoniazid in the treatment of pulmonary tuberculosis, Am Rev Tuberc, 69 : 334, 1954.
 - 21) Philips, S., Larkin, J. C. et al. : Observations on pyrazinamide (aldinamide) in pulmonary tuberculosis, Am Rev Tuberc, 69 : 443, 1954.
 - 22) 岡野正光他 : PZA の抗結核菌効果と耐性について, 結核研究の進歩, 22 : 47, 1958.
 - 23) 近藤瑩子・金井興美 : ピラジナマイドの再評価に関する実験的研究, 結核, 60 : 447, 1985.