

## 短 報

Ofloxacin 耐性 *Mycobacterium bovis* 感染マウスに  
おける Ofloxacin の治療効果

東 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和61年10月28日

THERAPEUTIC EFFECT OF OFLOXACIN ON MICE CHALLENGED BY  
OFLOXACIN-RESISTANT *MYCOBACTERIUM BOVIS* STRAINS

Michio TSUKAMURA \*

(Received for publication October 28, 1986)

1. An ofloxacin-highly resistant strain isolated from the Ravenel strain of *Mycobacterium bovis* showed no marked increase in the number of viable bacteria in the mouse liver and was considered to have an attenuated virulence to mice.
2. An ofloxacin-lowly resistant strain isolated from the Ravenel strain had an increase in the number of viable bacteria in the mouse liver as had the parent strain. However, the increase did not occur in the mice treated by ofloxacin (daily administration of 1 mg per day by intraperitoneal injection). Ofloxacin was to some extent effective in the treatment of mice challenged by ofloxacin-lowly resistant strain.

**Key words :** Ofloxacin, Ofloxacin-resistant strains, Mice, *Mycobacterium bovis*

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

我々には Ofloxacin (OX) が肺結核の治療に有効であることを報告した<sup>1)2)</sup>。OX を肺結核の治療に使用しはじめてから3年半になるが、この間、奇妙な現象を経験した。最初の研究では、OX と既に耐性となった抗結核剤を併用した。その際、空洞が大きくて排菌が止まらなかった症例では、3～4 カ月で OX 耐性結核菌が出現したが、そのまま、OX の投与を続けると、患者の一般状態が良好で増悪が起こらないように思われた。この現象を解明するために、マウスに OX 耐性菌を投与し、OX で治療を行ってみた。

マウスに対する challenge 株としては、ヒト型結核

菌よりもマウスに毒力が強いウシ型結核菌 *Mycobacterium bovis* Ravenel 株を使用した。OX 耐性株の分離方法は前報した<sup>3)</sup>。原株、低耐性株及び高耐性株に対する OX の最小発育阻止濃度は、「1%小川培地」での“Actual count 法”<sup>4)</sup>で、それぞれ、0.32、2.5及び100  $\mu\text{g/ml}$ であった。

Challenge 及び治療は次のごとく行った。「1%小川培地」で37°C14日間培養した株を、ガラス玉コルベン中で10分間振盪して均一化し、これを0.9% NaCl 水溶液に浮遊して5 mg/ml (湿菌量) の菌液を作った。この菌液0.5 ml を、体重26±2g (実験開始時) の dd-Y 系

\* From the National Chubu Hospital, Ōbu, Aichi 474 Japan.

雌マウスの腹腔内に注射して challenge した。マウス一匹に接種した生菌単位は、原株  $1.5 \times 10^7$ 、低耐性株  $3.1 \times 10^7$ 、高耐性株  $4.2 \times 10^7$  であった。各マウスに対する接種量の誤差を少なくするために、接種量を  $0.5 \text{ ml}$  とした。このため尾静注が困難で腹腔内接種とした。

接種生菌単位の算定は、菌液を  $0.1\%$  (v/v) Tween 80 水溶液で  $10$  倍希釈して  $10^{-6}$  に至り、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  液から渦巻白金耳で  $0.02 \text{ ml}$  ずつ「 $1\%$  小川培地」 $2$  本ずつに接種し、 $37^\circ\text{C}$   $21$  日培養後に集落数を数えた。計算の基礎には集落数  $10 \sim 100$  を与えた希釈度を使用した<sup>4)</sup>。

マウスは合計  $150$  匹で、これを  $25$  匹ずつの  $6$  群に分けた。第  $1$ 、第  $2$  群には、原株を接種した (生菌単位  $1.5 \times 10^7$ )。第  $3$ 、第  $4$  群には、低耐性株を接種した (生菌単位  $3.1 \times 10^7$ )。第  $5$ 、第  $6$  群には、高耐性株を接種した (生菌単位  $4.2 \times 10^7$ )。第  $1$ 、 $3$ 、 $5$  群には、challenge の翌日から  $0.067 \text{ M}$  phosphate buffer solution pH  $7.1$  (以下 PB) を、毎日  $0.2 \text{ ml}$  ずつ腹腔内に注射した。第  $2$ 、 $4$ 、 $6$  群には、challenge の翌日から OX  $1 \text{ mg}$  を毎日腹腔内に注射した。この OX は PB に  $5 \text{ mg/ml}$  の割合に溶解し、その  $0.2 \text{ ml}$  (OX  $1 \text{ mg}$ ) を注射した。PB または OX の注射は  $7$  週まで続けた。

OX の治療効果は、マウスの肝内生菌数の消長を指標として観察した。その理由は、前報したごとく、OX はマウスの肺から急速に消失するため、肺内生菌数の消長を指標とできないためである<sup>5)</sup>。Challenge 後、 $7$  日、 $14$  日、 $21$  日、 $28$  日、 $35$  日、 $42$  日、 $49$  日後に、各群から  $3$  匹のマウスをとって殺し、 $3$  匹分の肝を合せて秤量し、その  $5$  倍量の  $0.9\%$  NaCl 液を加えて、ガラス製ホモゲナイザーで均一化した。これに等容量の  $2\%$  NaOH 水溶液を加えて混和し、 $0.1\%$  Tween 80 液で  $10^{-4}$  まで  $10$  倍希釈した。 $10^0 \sim 10^{-4}$  の  $5$  種の液から、 $0.02 \text{ ml}$  を渦巻白金耳でとって「 $1\%$  小川培地」に接種した (各液  $2$  本ずつ使用)。接種した培地 ( $165 \times 16.5 \text{ mm}$  試験管に  $7 \text{ ml}$  ずつ分注し斜面とした) にダブルゴム栓を覆せ、 $37^\circ\text{C}$  に  $28$  日間培養し、集落数を数えた。集落数、肝希釈度及び肝重量から、マウス一匹の肝に含有された生菌単位を計算した。

1. 原株で challenge した場合、対照群では肝内生菌数は  $4$  週後にピークを示して増加したが、OX 治療群では、肝内生菌数が減少し、OX の治療効果が認められた (Fig.1)。

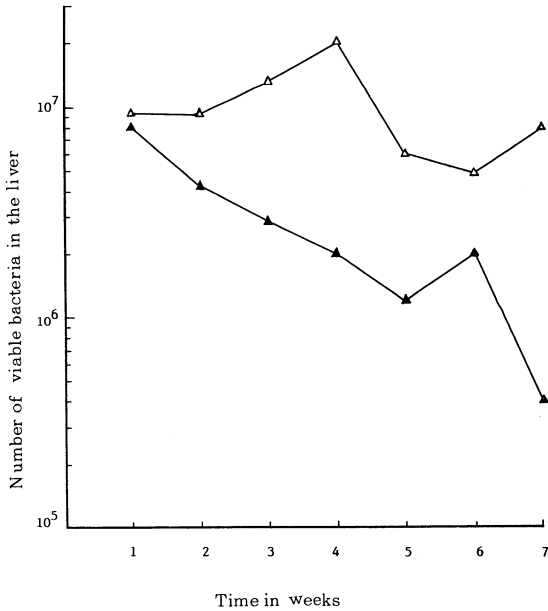
2. 低耐性株で challenge した場合、対照群では肝内生菌数の増加が起こったが、OX 治療群では、これが起こらず、OX の治療効果が認められた (Fig. 2)。

3. 高耐性株で challenge した場合、対照群でも肝内生菌数の増加が起こらず、生菌数の減少傾向が認められた。しかし、治療群では肝内生菌数の減少が判然とは認められず、OX の治療は無効と思われた (Fig. 3)。対照群の肝内生菌数の推移は、高耐性株の毒力減弱を示唆するごとく思われた。

実験成績は、低耐性株の存在下では、なお OX の治療効果が期待できるように思われた。また、高耐性株では、毒力の低下が起こっている可能性も示唆された。後者の可能性は、前回研究し、一旦否定された<sup>3)</sup>。前回の研究と今回の研究の食い違いの原因は、次のように考える。前回は、研究室保存の Ravenel 株から OX 耐性株を *in vitro* 実験で分離し、直ちにマウスに challenge した。そのため、毒力が比較的弱く、原株と高耐性株の差がでなかったことが考えられる。今回は、前回の実験で、マウスの肝内に  $7$  週間生存した株を実験に使用した。そのため、マウスに対する毒力が上昇し、肝内生菌数の増加が起こり、原株と高耐性株の差が生じたと考えられる。本実験は、*M. bovis* によるものであり、直ちに臨床的観察の説明になるものではないが、一つの実験結果として報告した。

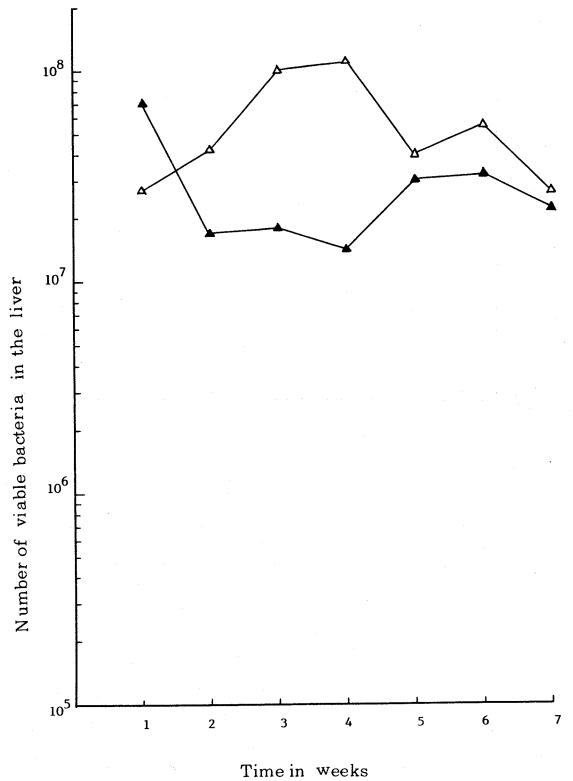
## 文 献

- 1) 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.
- 2) 東村道雄他: 新菌物質 Ofloxacin (DL 8280) の肺結核に対する臨床効果 (1年間投与の成績), 結核, 60 : 365, 1985.
- 3) 東村道雄他: 結核菌の Ofloxacin 耐性に関する研究, 結核, 60 : 517, 1985.
- 4) Tsukamura, M.: 'Actual count' method for the resistance test of tubercle bacilli, Jpn J Tuberc, 12 : 46, 1964.
- 5) Tsukamura, M.: Antituberculosis activity of ofloxacin (DL 8280) on experimental tuberculosis in mice, Am Rev Respir Dis, 132 : 915, 1985.



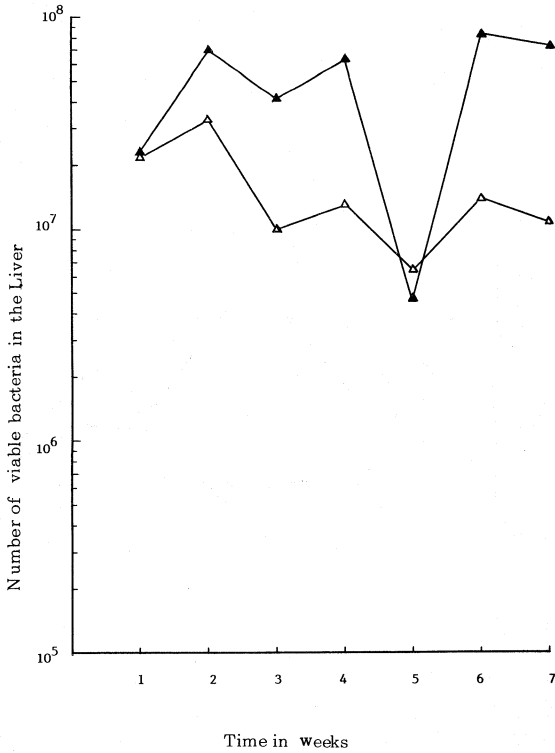
**Fig. 1.** Numbers of viable bacteria of the parent Ravenel strain recovered from the liver of mice not treated (open triangles) and treated by ofloxacin, daily administration of 1 mg by intraperitoneal injection (closed triangles).

The number of viable bacteria is shown as the number contained in the liver of one mouse. Female mice of the ddY strain weighing  $26 \pm 2g$  were challenged by intraperitoneal injection of  $1.5 \times 10^7$  viable bacteria per mouse of the parent strain which survived in the mouse liver for 7 weeks. The number of viable bacteria in the liver was determined by homogenizing the livers of three mice.



**Fig. 2.** Numbers of viable bacteria of an ofloxacin-lowly resistant strain recovered from the liver of mice not treated (open triangles) and treated by ofloxacin, daily administration of 1 mg by intraperitoneal injection (closed triangles).

The number of viable bacteria is shown as the number contained in the liver of one mouse. Female mice of the ddY strain weighing  $26 \pm 2g$  were challenged by intraperitoneal injection of  $3.1 \times 10^7$  viable bacteria per mouse of the lowly resistant strain which survived in the mouse liver for 7 weeks. The number of viable bacteria in the liver was determined by homogenizing the livers of three mice.



**Fig. 3.** Numbers of viable bacteria of an ofloxacin-highly resistant strain recovered from the liver of mice not treated (open triangles) and treated by ofloxacin, daily administration of 1 mg by intraperitoneal injection (closed triangles).

The number of viable bacteria is shown as the number contained in the liver of one mouse. Female mice of the ddY strain weighing  $26 \pm 2$ g were challenged by intraperitoneal injection of  $4.2 \times 10^7$  viable bacteria per mouse of the highly resistant strain which survived in the mouse liver for 7 weeks. The number of viable bacteria in the liver was determined by homogenizing the livers of three mice.