

原 著

## 新キノロン系薬剤, T-3761 の抗マイコバクテリア活性

富岡 治明・佐藤 勝昌

島根医科大学微生物・免疫学教室

斎藤 肇

島根医科大学微生物・免疫学教室

国立多摩研究所

受付 平成6年 9月 5日

受理 平成6年 10月 26日

IN VITRO ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF A  
NEW QUINOLONE, T-3761

Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO and Hajime SAITO \*

(Received 5 September 1994/Accepted 26 October 1994)

We evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of T-3761 and ofloxacin against representative pathogenic mycobacteria by the agar dilution method, using 7H11 agar medium. T-3761 showed appreciable antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* (MIC<sub>90</sub> : 3.13 µg/ml), *M. kansasii* (MIC<sub>90</sub> : 6.25 µg/ml) and *M. fortuitum* (MIC<sub>90</sub> : 3.13 µg/ml), whereas the agent was not active against *M. marinum* (MIC<sub>90</sub> : 25 µg/ml), *M. scrofulaceum* (MIC<sub>90</sub> : 50 µg/ml), *M. avium* (MIC<sub>90</sub> : >100 µg/ml), *M. intracellulare* (MIC<sub>90</sub> : >100 µg/ml), *M. chelonae* subsp. *abscessus* (MIC<sub>90</sub> : >100 µg/ml) and *M. chelonae* subsp. *chelonae* (MIC<sub>90</sub> : 50 µg/ml). The *in vitro* antimicrobial activity of T-3761 against *M. fortuitum* was a little more potent than that of ofloxacin, whereas the activity of T-3761 against the other mycobacteria was slightly inferior to that of ofloxacin. The antimycobacterial activity of T-3761 against *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (MIC *in vitro* : T-3761=3.13 µg/ml, OFLX=0.78 µg/ml) phagocytosed in murine peritoneal macrophages was less active than that of ofloxacin, when the macrophages were cultured in RPMI-1640 medium containing 1 µg/ml or 10 µg/ml of these agents for up to 5 days. The activity of 10 µg/ml of T-3761 was equivalent to that of 1 µg/ml of ofloxacin.

**Key words** : New quinolone, Antimicrobial activity, *Mycobacterium tuberculosis*

**キ ー ワ ー ズ** : T-3761, 抗菌活性, *Mycobacterium tuberculosis*

\* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, 89-1 Enya-cho, Izumo 693 Japan.

## I. 序 文

T-3761 は富山化学工業株式会社で開発されたニューキノロン系薬剤である。本剤はグラム陽性菌および緑膿菌を含むグラム陰性菌に対して、広範な抗菌スペクトルを有し、その抗菌活性はほとんどの菌種に対して ofloxacin (OFLX) よりも強く、その作用は殺菌的であるという<sup>1)</sup>。また、T-3761 の黄色ブドウ球菌、大腸菌あるいは緑膿菌による実験的マウス感染における有効性は、OFLX, ciprofloxacin よりも優れているという<sup>1)</sup>。

今回、われわれはT-3761 の *in vitro* 抗マイコバクテリア活性について検討したので以下報告する。

## II. 実験材料と方法

### 1. 供試薬剤

T-3761 の他に対照として OFLX (第一製薬) を用いた。

### 2. 供試菌株

教室保存の *Mycobacterium tuberculosis* 25 株, *M. kansasii* 19 株, *M. marinum* 10 株, *M. scrofulaceum* 19 株, *M. avium* 18 株, *M. intracellulare* 31 株, *M. fortuitum* 20 株, *M. chelonae* subsp. *abscessus* 15 株および *M. chelonae* subsp. *chelonae* 20 株を用いた。*M. avium* および *M. intracellulare* はわれわれの教室において、これら菌種の Gen-Probe<sup>®</sup> Rapid Diagnostic System<sup>2)3)</sup> (Gen-Probe, San Diego, Calif., USA) を用いて同定されたものであり、いずれの菌株も扁平、平滑、透明な集落形態 (SmT) を有するものである。

### 3. MIC 測定

日本化学療法学会標準法<sup>4)</sup> に準じて行った。すなわち、7H9 培地 (Difco) 中 37°C, ただし *M. marinum* と *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C,  $OD_{540nm} = 0.1$  の培養菌 (3~7 日培養) を同種培地で 10 倍希釈 (約  $10^6$  CFU/ml) し、その 5  $\mu$ l を、100~0.025  $\mu$ g/ml に至る 2 倍階段希釈濃度の薬剤含有 7H11 寒天平板 (Difco) 上にマイクロプランター (佐久間製作所) でスポットし、37°C (*M. marinum* と *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C), 迅速発育菌は 7 日, また遅発育菌は 14 日培養後に菌発育の有無を観察し、MIC 値を求めた。ただし、5 個以下の集落の場合は発育陰性と判定した。

### 4. マウス腹腔マクロファージ (M $\phi$ ) 内被貪食 *M. tuberculosis* に対する抗菌作用

既報の方法<sup>5)</sup> に準じて検討した。すなわち、Zyosan A (Sigma) 1 mg を BALB/c 系雌マウス (8 週齢) の腹腔内へ投与し、その 4 日後に 2% 牛胎児血清加 Hanks' balanced salt solution (FBS-HBSS) で腹腔浸出細胞を採取した。得られた細胞は洗浄後、10% FBS-RPMI 1640 培地 (FBS-RPMI) (白水製薬) に浮遊させ、その 1 ml ( $7.5 \times 10^5$ ) を培養 well (16 mm) (Corning Glass Works, USA) に入れ、5% CO<sub>2</sub> 下で 37°C, 2 時間培養後、FBS-HBSS で洗浄して非付着細胞を除去し、得られた付着性細胞を M $\phi$  として用いた。

この M $\phi$  細胞に *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 株 (MIC : T-3761=3.13  $\mu$ g/ml, OFLX=0.78  $\mu$ g/ml) の FBS-RPMI による菌浮遊液 ( $4.1 \times 10^6$  CFU/ml) の 1 ml を加え、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C, 1 時間培養後、非貪食菌を FBS-HBSS で洗浄、除去した。これに T-3761 あるいは OFLX の 1  $\mu$ g/ml あるいは 10  $\mu$ g/ml 含有

Table 1 MICs of T-3761 against Various Mycobacteria

Species	Number of strains	MICs ( $\mu$ g/ml)					
		T-3761			OFLX		
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range
<i>M. tuberculosis</i>	25	1.56	3.13	0.39-12.5	0.78	0.78	0.1-1.56
<i>M. kansasii</i>	19	3.13	6.25	0.78-100	0.78	3.13	0.2-6.25
<i>M. marinum</i>	10	12.5	25	1.56-50	1.56	3.13	0.78-12.5
<i>M. scrofulaceum</i>	19	12.5	50	1.56->100	3.13	12.5	0.78-50
<i>M. avium</i>	18	50	>100	3.13->100	12.5	50	1.56->100
<i>M. intracellulare</i>	31	>100	>100	50->100	25	50	3.13->100
<i>M. fortuitum</i>	20	0.78	3.13	0.2-6.25	3.13	3.13	0.39-6.25
<i>M. chelonae (abscessus)</i>	15	>100	>100	12.5->100	100	>100	6.25->100
<i>M. chelonae (chelonae)</i>	20	12.5	50	6.25->100	6.25	25	0.78-100

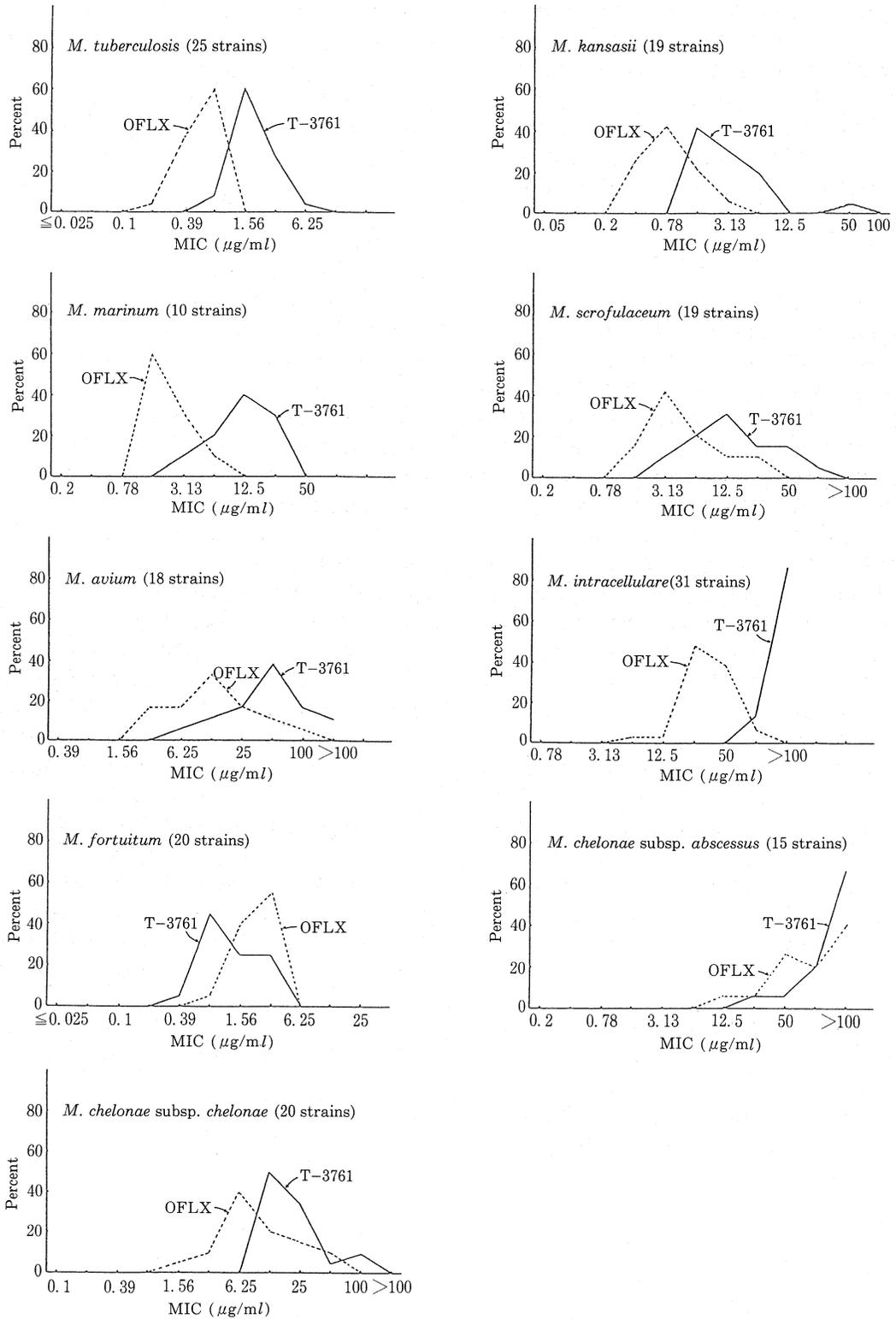


Fig. Distribution of Susceptibility of Various Mycobacteria to T-3761

FBS-RPMIの1mlを加え、さらに5日間培養(その間、1日1回新鮮培地と交換)した。所定日数後に培養液を除去し、M $\phi$ 細胞をFBS-HBSSで洗浄したのち、2mlの蒸留水を加えて超音波処理することによって破壊し、M $\phi$ 内の生菌単位を7H11寒天平板を用いて37°C、14日培養後に求める一方、上記したと同様に培養した感染M $\phi$ をGiemsa染色し、その数を鏡検・算定し、M $\phi$ あたりの生菌単位でもって表した。

### III. 実験成績

#### 1. *in vitro* 抗菌力

T-3761並びにOFLX(対照薬)の代表的病原性抗酸菌に対するMICをTable 1に示した。T-3761の*M. tuberculosis*, *M. kansasii*および*M. fortuitum*に対するMIC<sub>90</sub>はそれぞれ3.13, 6.25および3.13  $\mu\text{g/ml}$ で、比較的強い抗菌活性を示したが、他の供試菌種に対するMIC<sub>90</sub>は25~>100  $\mu\text{g/ml}$ と高いものであった。Fig. は供試菌の本剤並びにOFLXに対する感受性分布を示したものである。これから分かるように、*M. fortuitum*ではT-3761に対する本剤の感受性分布曲線はOFLXのそれよりも多少とも左方(低MIC側)へ移動し、MICのピーク値は、前者では0.78  $\mu\text{g/ml}$ であったのに対して後者では3.13  $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、これを除く供試他菌種ではT-3761に対する感受性分布曲線はOFLXのそれよりも右方(高MIC側)へ移動する様相を示した。すなわち、T-3761の抗菌活性は、*M. fortuitum*に対してはOFLXよりも強いが、他の代表的病原性抗酸菌に対しては弱いものといえよう。

#### 2. M $\phi$ 内被貪食 *M. tuberculosis* に対する抗菌活性

*M. tuberculosis* 貪食M $\phi$ をT-3761 1  $\mu\text{g/ml}$ 含有培養液中で培養した場合のM $\phi$ 内菌数(Table 2)は薬剤非添加対照におけるよりもむしろ増加傾向がみられたが、10  $\mu\text{g/ml}$ の添加では、薬剤非添加対照における

よりも培養3日後では約20%、5日後では約50%の抑制がみられた。他方、OFLXのM $\phi$ 内被貪食*M. tuberculosis*に対する発育抑制作用はT-3761よりも強く、培養3日および5日後ともOFLXの1  $\mu\text{g/ml}$ の作用がT-3761の10  $\mu\text{g/ml}$ にほぼ相当するものであった。

### IV. 考 察

T-3761の*in vitro* 抗菌活性は、グラム陽性菌と陰性菌とを問わず、ほとんどの菌種にたいしてOFLXよりも強いことが報告されている<sup>1)</sup>。今回、われわれは本剤の代表的病原性抗酸菌8菌種(*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* および *M. chelonae*)に対する抗菌活性を検討したところ、*M. fortuitum*に対してはOFLXより優れたMIC値を示したが、それ以外の供試菌に対してはOFLXよりも劣るものであることが分かった。

健康成人においてT-3761の200mgあるいは400mgの1回投与時の血中ピーク濃度はそれぞれ3.0  $\mu\text{g/ml}$ あるいは4.5  $\mu\text{g/ml}$ であり<sup>1)</sup>、これはOFLXにおける値(それぞれ2.0, 5.7  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>6)</sup>とほぼ同様である。また、ラットにT-3761の5mg/kgを投与した場合の血中並びに肺内ピーク濃度はそれぞれ3.8  $\mu\text{g/ml}$ 並びに3.4  $\mu\text{g/ml}$ <sup>1)</sup>であって、両者間にほとんど差を認めないが、OFLXにおいては肺内濃度が約3倍高いことが報告されている<sup>6)</sup>。T-3761並びにOFLXがヒトにおいてもラットと同様な体内動態をとるならば、主として肺が標的臓器である結核(抗酸菌感染症)に対してT-3761がOFLXと同様の治療効果<sup>7,8)</sup>を得るためには、T-3761の*in vitro* 抗菌力はOFLXよりもさらに強い必要がある。しかしながら、T-3761の*M. tuberculosis*に対する*in vitro* 抗菌力はOFLXのその約1/4であることが今回の実験より明らかとなっ

Table 2 Antimicrobial Activity of T-3761 against *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv Phagocytosed in Murine Peritoneal Macrophages

Drug	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	CFU/100 macrophages		
		0 d	incubation time	
			3 d	5 d
None	—	38.8 $\pm$ 0.55	248 $\pm$ 7.20	507 $\pm$ 43.2
T-3761	1	—	312 $\pm$ 8.92	580 $\pm$ 47.6
	10	—	195 $\pm$ 23.5	232 $\pm$ 23.1
OFLX	1	—	185 $\pm$ 9.43	245 $\pm$ 21.9
	10	—	70.1 $\pm$ 12.7	49.1 $\pm$ 9.32

た。したがって、T-3761の供試代表的病原性抗酸菌のうち、*M. fortuitum*を唯一の例外として、他の抗酸菌に対する抗菌活性もOFLXより劣るものであったことから、ヒトにおける抗酸菌感染症、特に結核症に対してOFLXにおけると同様の治療効果をT-3761に期待することはできないのではなかろうかと思われる。

#### 文 献

- 1) Fukuoka Y, Ikeda Y, Yamashiro Y, et al. : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-3761, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 384-392.
- 2) Enns RK : Clinical studies summary report : the Gen-Probe<sup>®</sup> Rapid Diagnostic System for the MAC, 1987, Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., USA.
- 3) GEN-PROBE INC. : Gen-Probe<sup>®</sup> Rapid Diagnostic System for *M. avium* complex. In *Manual for in vitro* diagnostic use, Gen-Probe Inc., San Diego, Calif, USA.
- 4) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy.* 1981 ; 29 : 76-79.
- 5) Saito H, Sato K, Tomioka H, et al. : Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle.* 1988 ; 69 : 187-192.
- 6) 第30回日本化学療法学会西日本支部総会新薬シンポジウム, DL-8280, 名古屋, 1982.
- 7) Tsukamura M, Nakamura E, Yoshii S, et al. : Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL-8280) on pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1985 ; 131 : 352-353.
- 8) 東村道雄, 中村栄一, 吉井才司, 他 : 新抗菌物質 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.* 1985 ; 60 : 365-369.