

## 【原著・基礎】

# Tosufloxacin の *in vitro* 抗 *Chlamydia trachomatis* 活性

二口 直子・久田 晴美・高畑 正裕・南 新三郎

富山化学工業株式会社総合研究所\*

(平成 14 年 5 月 29 日受付・平成 14 年 7 月 12 日受理)

*Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx 株に対する tosylfloxacin (TFLX) の *in vitro* 抗クラミジア活性についてクラミジアの生活環の各時期における抗菌作用を、封入体数、封入体内のクラミジア粒子密度および感染性粒子数を指標に検討した。HeLa 229 細胞に *C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株を感染させ、感染後 0~6 時間、6~12 時間、24~30 時間に TFLX あるいは ofloxacin (OFLX) を 1 および 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用させた。なお、TFLX および OFLX の *C. trachomatis* D/UW-3/Cx に対する MIC はおのおの 0.125、および 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。TFLX あるいは OFLX を 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用させた場合、薬剤無添加群 (control) に対する封入体数の比率は、感染後 0~6 時間の TFLX 作用群では 43.4%、OFLX 作用群では 93.6% であった。感染後 6~12 時間の TFLX 作用群では 7.0% に、OFLX 作用群では 33.5% に減少した。感染後 24~30 時間の両薬剤作用群ではいずれも control との差異は認められなかった。薬剤 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用時の、封入体内クラミジア粒子密度は、感染後 0~6 時間の TFLX 作用群では低下したが、OFLX 作用群では低下が認められなかった。感染後 6~12 時間および 24~30 時間の両薬剤作用群ではいずれも密度は低下した。薬剤 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用時の、control に対する感染性粒子数の比率は、感染後 0~6 時間の TFLX 作用群では 3.6% に減少し、OFLX 作用群では減少しなかった。感染後 6~12 時間の TFLX 作用群では 0.7% に、OFLX 作用群では 15.1% に減少し、感染後 24~30 時間の TFLX 作用群では 1.1% に、OFLX 作用群では 9.2% に減少した。1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用時の封入体数、封入体内のクラミジア粒子密度および感染性粒子数は、両薬剤ともに 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用時とほぼ同等であり、添加濃度による差は認められなかった。TFLX は感染後のいずれの時間でも OFLX より強い抗クラミジア活性を示し、その理由は明らかではないが、一般的にキノロン系薬剤が作用しないとされる基本小体の時期に相当する感染後 0~6 時間作用群においても抗クラミジア活性を示した。

**Key words:** tosylfloxacin, *Chlamydia trachomatis*, 生活環, 封入体, 感染性粒子

*Chlamydia trachomatis* は細胞偏性寄生性細菌であり、新生児封入体結膜炎、トラコーマ、尿路性器感染症、新生児肺炎などの原因菌として知られている<sup>1)</sup>。その生活環は独特であり、生活環の時期によって薬剤に対する感受性が異なることが報告されている<sup>2)</sup>。ニューキノロン薬の tosylfloxacin (TFLX) はグラム陽性菌、陰性菌およびクラミジアに対して幅広い抗菌スペクトルと強い殺菌活性を有する抗菌薬であり<sup>3)</sup>、現在点眼剤として開発中である。これまで TFLX の *in vitro* における抗 *C. trachomatis* 活性については、臨床分離株を含めて MIC 測定がされている<sup>4-6)</sup>が、点眼時の薬物動態を想定した薬剤を短時間作用させた場合の抗菌作用や、クラミジア生活環の各時期に対してどのような作用を示すかについては十分に検討されていない。今回、われわれはクラミジア生活環の各時期における抗菌作用を、宿主細胞 HeLa 229 にクラミジア感染後 0~6 時間、6~12 時間、24~30 時間に薬剤を作用させた時の、封入体数、封入体内のクラミジア粒子密度および感染性粒子数を指標に検討した。

## I. 材料と方法

### 1. 使用クラミジア株および細胞

国立感染症研究所から購入した *C. trachomatis* D/UW-3/Cx および大日本製薬から購入した HeLa 229 細胞を使用した。

### 2. 使用薬剤

MIC 測定には、TFLX は富山化学工業株式会社総合研究所で合成されたものを用い、ofloxacin (OFLX) は市販品 (Sigma) を用いた。両薬剤は 0.1 mol/L NaOH で溶解し、感染用培養液で所定の濃度に希釈して用いた。

クラミジア生活環の各時期における抗菌作用の比較には、TFLX は富山化学工業株式会社で合成した tosylfloxacin-tosylate を点眼用に調製した TN-3262 a (TFLX 2,040  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用い、OFLX は点眼剤であるタリビッド® (参天製薬, OFLX 3,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。両薬剤は感染用培養液で所定の濃度に希釈して用いた。

### 3. 試験方法

#### 1) MIC 測定法

日本化学療法学会のクラミジア感受性測定法<sup>9)</sup>に準じ実施した。

## 2) 生活環の各時期における抗菌作用の比較

## (1) クラミジアの感染および培養

クラミジアの感染は日本化学療法学会のクラミジア感受性測定法<sup>9)</sup>に準じ実施した。直径 15 mm のカバーガラスを入れた 24 ウェル細胞培養用プラスチックプレートの各ウェルに  $2.0 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 229 細胞を含む 8% 熱非働化牛胎児血清 (FBS, Bio whittaker) 加 Minimum Essential Medium Eagle (E' MEM, Sigma) (以下細胞播種用培地) を 1 mL ずつ分注し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で一晩培養した。培養液を吸引除去後, 各ウェルに  $4 \times 10^4$  inclusion forming unit (IFU)/mL に sucrose-phosphate-glutamic acid medium (SPG: sucrose 37.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.26 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 1.538 g, glutamic acid 0.36 g, streptomycin sulfate 50 mg, 蒸留水 500 mL) で希釈したクラミジア懸濁液を 0.25 mL 接種し, 室温にて 1 時間遠心吸着 (700 × g, KUBOTA 5700) させた。上清を吸引除去後, 1 μg/mL cycloheximide を添加した細胞播種用培地 (以下, 感染用培地) を各ウェルに 1 mL ずつ添加した。クラミジア吸着直後 (0 時間), 6 時間後, 24 時間後の時点で培養液を除去後, 希釈した薬剤または薬剤無添加群 (control) には感染用培地を 1 mL ずつ添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。各ウェルは希釈した薬剤または感染用培地の添加 6 時間後に E' MEM 1 mL で 3 回洗浄し感染用培地 1 mL に置換した後, クラミジア吸着 (0 時間) より 60 時間後まで培養した。各薬剤作用条件につき 4 ウェルずつ作製し, 1 ウェルは封入体数の計測に, 1 ウェルは封入体内クラミジア粒子密度の判定に, 残り 2 ウェルは感染性粒子数の測定に用いた。

## (2) 封入体数の計測

直接蛍光抗体法で封入体数の計測を行った。培養液を吸引除去し細胞を 95% エタノール/5% アセトンにて固定後, クラミジアトラコマチス検出用キット MicroTrak (Syva) で染色を行い蛍光顕微鏡 [BHS (OLYMPUS), 落射蛍光装置 BH 2-RFK (OLYMPUS)] 下 200 倍で封入体を観察した。1 ウェルにつき 2 か所の直径 4 mm の円内に存在する封入体数を計測した。

## (3) 封入体内クラミジア粒子密度の判定

ギムザ染色法で封入体内クラミジア粒子密度の判定を行った。直接蛍光抗体法に準じ固定した細胞を, メイ・グリュンワルド原液にて 3 分間染色し phosphate-buffered saline [PBS(-)] で洗浄した。30 倍希釈ギムザ染色液で 15 分間染色後, PBS(-) で洗浄後水洗・風乾しバルサム封入液でスライドガラスに封入した。顕微鏡下, 油浸 400 倍で封入体内部を観察し, control の封入体内粒子密度を基準に 5 視野内のすべての封入体について肉眼判定した。

## (4) 感染性粒子数の測定

Yield-ELISA 法で感染性粒子数の測定を行った。細胞を -80°C で凍結・融解し感染性粒子数測定用のサンプルとした。96 ウェル細胞培養用プラスチックプレートの各ウェルに  $2.0 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 229 細胞を含む細胞播種用培地を 0.1 mL ずつ分注し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で一晩培養した。培養液を吸引除去後, 各ウェルに上記サンプルを感染用培地にて段階希釈 (上記サンプル 1 ウェルから 2 系列) した液を 50 μL ずつ接種し室温にて 1 時間遠心吸着 (700 × g) させた。検量線を求めるため同様の操作を感染価の明らかなクラミジア菌液で行った。上清を吸引除去後, 感染用培地を 100 μL

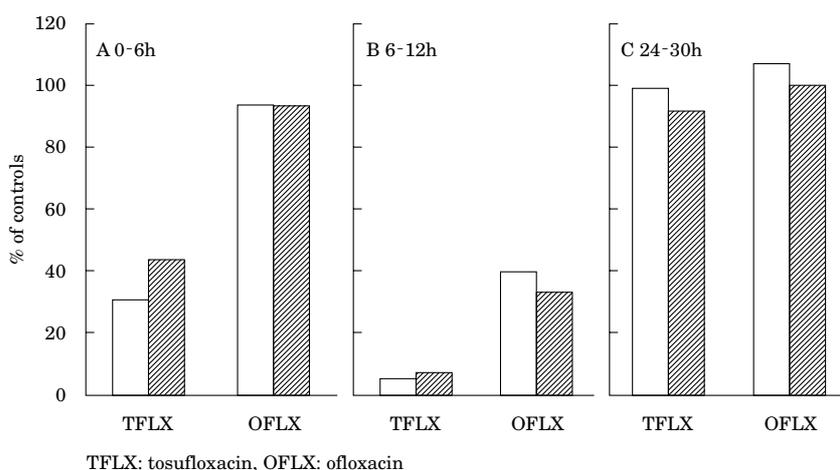


Fig. 1. Inhibitory effect of tosylflouxacin (TFLX) and ofloxacin (OFLX) on the production of chlamydial inclusions. *Chlamydia trachomatis* was inoculated on HeLa 229 cells. TFLX or OFLX was added to infected cells to give a final concentrations of 1 (□) or 3 (■) μg/mL at (A) 0 h, (B) 6 h, or (C) 24 h after inoculation of *C. trachomatis*, and incubation was continued for 6 h with drugs. The number of chlamydial inclusion was counted by immunofluorescence staining at 60 h after inoculation of *C. trachomatis*. Controls were inoculated by the same method without the drug. The vertical axis of Fig. 1 indicates the ratio to controls.

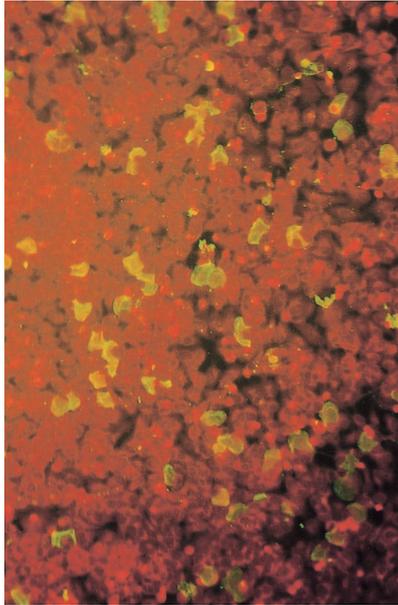
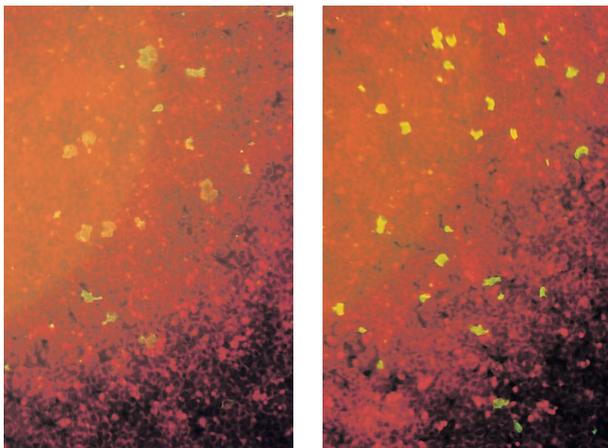


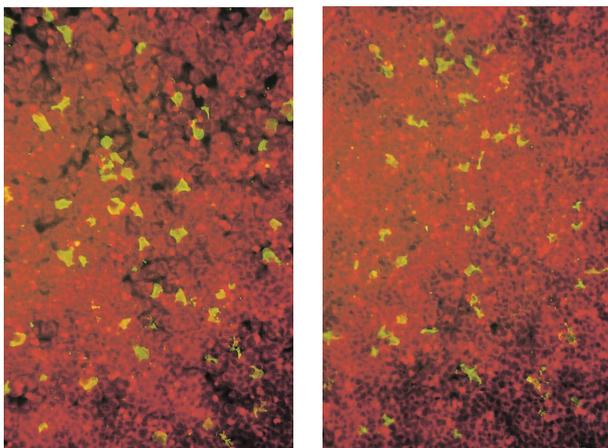
Fig. 2. Chlamydial inclusions detected by immunofluorescence staining. HeLa 229 cells cultured for 60 h after infection with *Chlamydia trachomatis*.

ずつ添加した。60時間培養後、培養液を吸引除去し細胞を95%エタノール/5%アセトンにて固定した。ELISA法はTatarowiczらの方法<sup>10</sup>を改変し実施した。固定液を吸引除去後各ウェルを洗浄液〔0.5%牛血清アルブミン, 0.05% Tween 20 加 PBS(-)〕にて洗浄し、10%ヤギ血清加 PBS(-) で3,000倍希釈した抗 *C. trachomatis*-ウサギ抗体(ケミコン)を50  $\mu$ Lずつ添加した。37°C, 1時間インキュベーション後、洗浄液にて洗浄し10%ヤギ血清加 PBS(-) で1,000倍希釈した抗ウサギ IgG-ヤギ抗体 peroxidase 標識(和光純薬)を50  $\mu$ Lずつ添加した。37°C, 2時間インキュベーション後、洗浄液にて洗浄し発色基質 *o*-phenylenediamine dihydrochloride を緩衝液〔0.1 mol/L citric acid, 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 5.0)〕にて2 mg/mLに溶解し、過酸化水素水を終濃度0.034%添加したものを100  $\mu$ Lずつ添加した。5分間発色後、1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を100  $\mu$ L添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(InterMed, NJ-2300)にて490 nmの吸光度を測



(a)

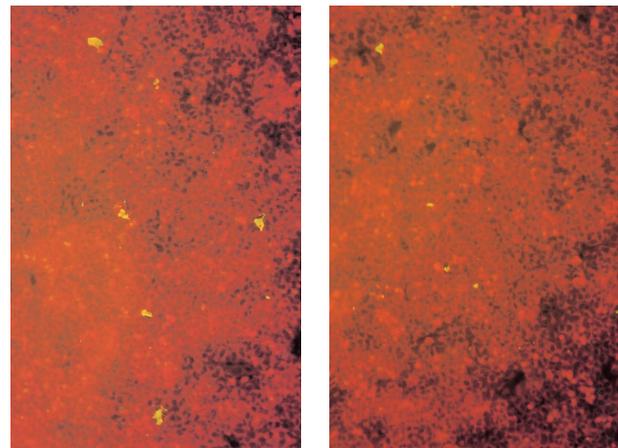
(b)



(c)

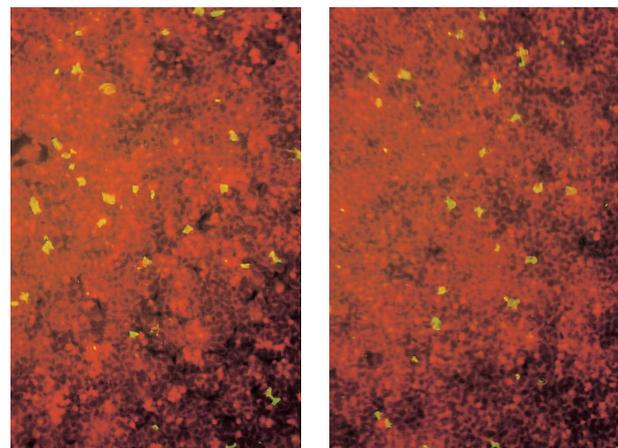
(d)

Fig. 3. Chlamydial inclusions detected by immunofluorescence staining. HeLa 229 cells infected with *Chlamydia trachomatis* and treated with 1 and 3  $\mu$ g/mL tosylfloxacin (a, b) or 1 and 3  $\mu$ g/mL ofloxacin (c, d) from 0 to 6 h after infection.



(a)

(b)



(c)

(d)

Fig. 4. Chlamydial inclusions detected by immunofluorescence staining. HeLa 229 cells infected with *Chlamydia trachomatis* and treated with 1 and 3  $\mu$ g/mL tosylfloxacin (a, b) or 1 and 3  $\mu$ g/mL ofloxacin (c, d) from 6 to 12 h after infection.

定し検量線よりサンプル中の IFU を算出した。

## II. 結 果

### 1. MIC

TFLX および OFLX の *C. trachomatis* D/UW-3/Cx に対する MIC はおのおの 0.125, および 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

### 2. 生活環の各時期における抗菌作用の比較

#### 1) 薬剤作用時の封入体数

クラミジア感染後 0~6 時間, 6~12 時間および 24~30 時間薬剤作用時の封入体数の control に対する比率を Fig. 1 に, 封入体の蛍光抗体染色像を Figs. 2~5 に示す。感染後 0~6 時間に 1 および 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の TFLX を作用させた場合 (Fig. 1-A), 封入体数はそれぞれ control (Fig. 2) の 30.5%, 43.4% であり (Fig. 3-a, b), OFLX 作用群ではそれぞれ control と類似した値であった (Fig. 3-c, d)。感染後 6~12 時間作用時 (Fig. 1-B) では, TFLX 1 および 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用群の封入体数はそれぞれ control の 5.3%, 7.0% であり (Fig. 4-a, b), OFLX 作

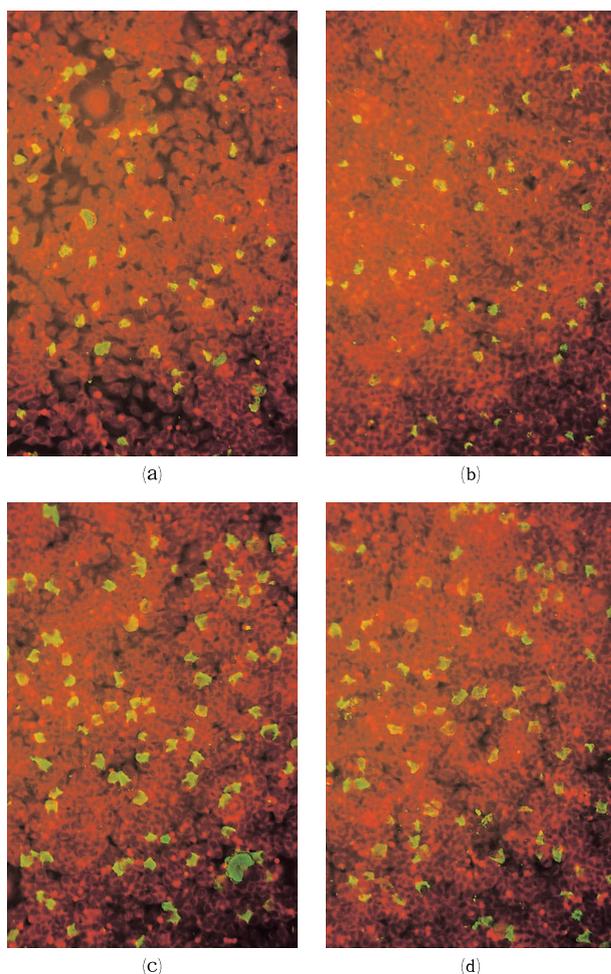


Fig. 5. Chlamydial inclusions detected by immunofluorescence staining. HeLa 229 cells infected with *Chlamydia trachomatis* and treated with 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tosylfloxacin (a, b) or 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ofloxacin (c, d) from 24 to 30 h after infection.

用群ではそれぞれ control の 39.9%, 33.5% であった (Fig. 4-c, d)。感染後 24~30 時間作用時 (Fig. 1-C) では, TFLX および OFLX の 1 および 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用群の封入体数はそれぞれ control とほぼ同値であった (Fig. 5)。

#### 2) 封入体内クラミジア粒子密度

クラミジア感染後 0~6 時間, 6~12 時間および 24~30 時間薬剤作用時の封入体内部のクラミジア粒子密度を Table 1 に, ギムザ染色像を Figs. 6~9 に示す。薬剤作用群の封入体内部を観察したところクラミジア粒子密度に違いが見られた。Control (Fig. 6) の密度を基準に薬剤作用群の封入体のクラミジア粒子密度を判定した。その結果, 感染後 0~6 時間に 1 および 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の TFLX を作用させた場合, クラミジア粒子密度は低下した (Fig. 7-a, b) が, OFLX 作用群では低下が認められ

Table 1. Chlamydial cell density in chlamydial inclusions after treatment of tosylfloxacin and ofloxacin

Treatment	Period for exposure of quinolone after infection		
	0-6 h	6-12 h	24-30 h
TFLX 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	58.3*	33.3	7.6
3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	48.6	21.1	7.4
OFLX 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	91.2	77.6	60.6
3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	90.2	71.0	51.5

The number of chlamydial inclusions was counted by Giemsa staining.

\*Percent of chlamydial inclusions: Each figure indicates percent of chlamydial inclusions in 5 fields with equal density to controls.

TFLX: tosylfloxacin, OFLX: ofloxacin

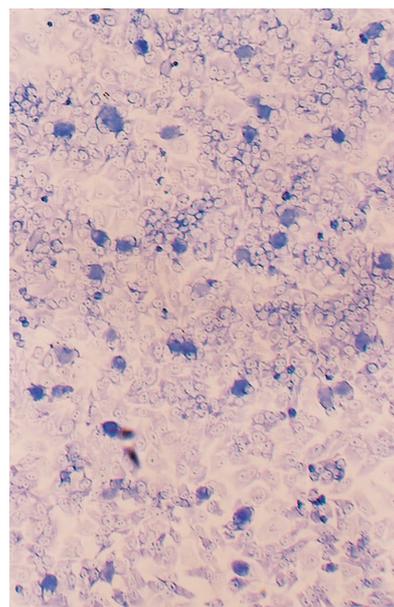


Fig. 6. Chlamydial inclusions detected by Giemsa staining. HeLa 229 cells cultured for 60 h after infection with *Chlamydia trachomatis*.

なかった (Fig. 7-c, d)。感染後6~12時間 (Fig. 8) および24~30時間 (Fig. 9) にTFLXおよびOFLXを作用させた場合、両薬剤作用群でクラミジア粒子密度は低下した。また、両時期ともTFLX作用群でクラミジア粒子密度の低下した比率が高かった。

### (3) 薬剤作用時の感染性粒子数

クラミジア感染後0~6時間、6~12時間および24~30時間薬剤作用時の感染性粒子数のcontrolに対する比率をFig. 10に示す。感染後0~6時間に1および3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のTFLXを作用させた場合、感染性粒子数はそれぞれcontrolの7.8%、3.6%であり、OFLX作用群ではそれぞれcontrolの87.1%、126.1%であった (Fig. 10-A)。感染後6~12時間に1および3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のTFLXを作用させた場合、感染性粒子数はそれぞれcontrolの1.3%、0.7%であり、OFLX作用群ではそれぞれcontrolの10.4%、15.1%であった (Fig. 10-B)。感染後24~30時間に薬剤を1および3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用させた場合、TFLX作用群ではそれぞれcontrolの1.2%、1.1%であ

り、OFLX作用群ではそれぞれcontrolの14.7%、9.2%であった (Fig. 10-C)。

### III. 考 察

今回の実験は使用菌株が1株のみであるが、TFLXとOFLXのMICは過去に報告された臨床分離株のMIC<sup>4-8)</sup>とほぼ一致していた。クラミジア生活環の各時期における抗菌作用の比較に用いた薬剤濃度は、*C. trachomatis*に有効であるOFLX眼軟膏投与時のヒト結膜囊内濃度<sup>11)</sup>を参考に設定した。OFLX濃度は投与後4時間で1.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6時間で0.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることから、作用濃度を1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とその3倍の3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

クラミジアの生活環は、感染性を有するが代謝活性は低い基本小体と、感染性はないが増殖性を有する網様体の、2種類の菌形態の変換を繰り返す<sup>1)</sup>。キノロン系薬剤は細菌のジャイレース、トポイソメラーゼIVに作用し抗菌作用を示すことが知られており<sup>12)</sup>、クラミジアに対しても網様体の分裂増殖期に作用することが報告されて

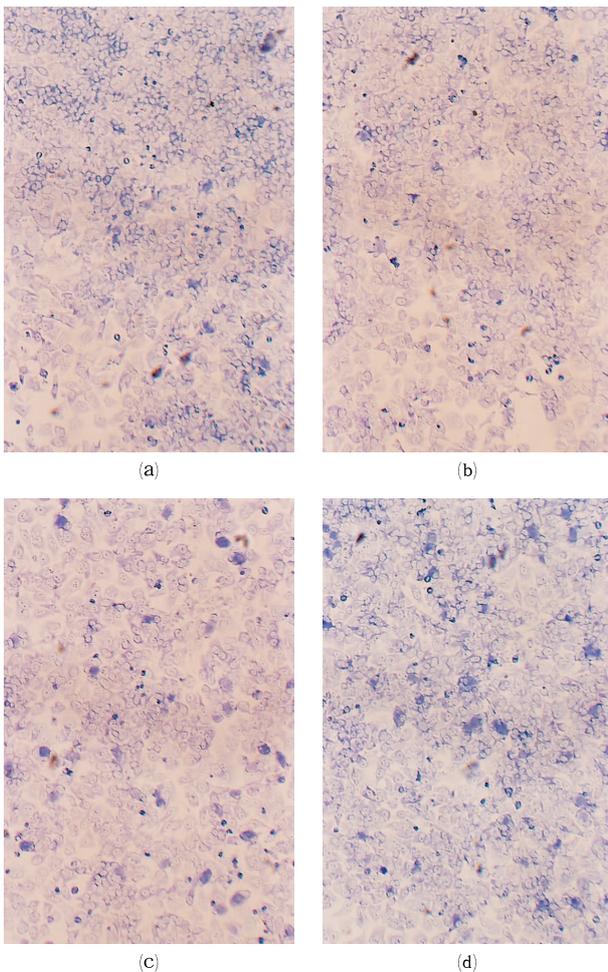


Fig. 7. Chlamydial inclusions detected by Giemsa staining. HeLa 229 cells infected with *Chlamydia trachomatis* and treated with 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tosofloxacin (a, b) or 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ofloxacin (c, d) from 0 to 6 h after infection.

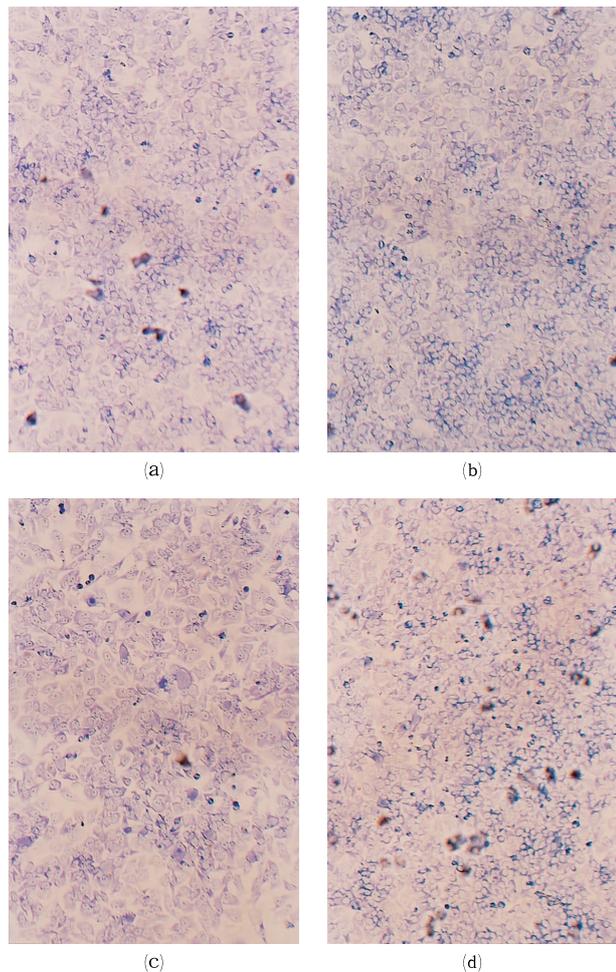


Fig. 8. Chlamydial inclusions detected by Giemsa staining. HeLa 229 cells infected with *Chlamydia trachomatis* and treated with 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tosofloxacin (a, b) or 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ofloxacin (c, d) from 6 to 12 h after infection.

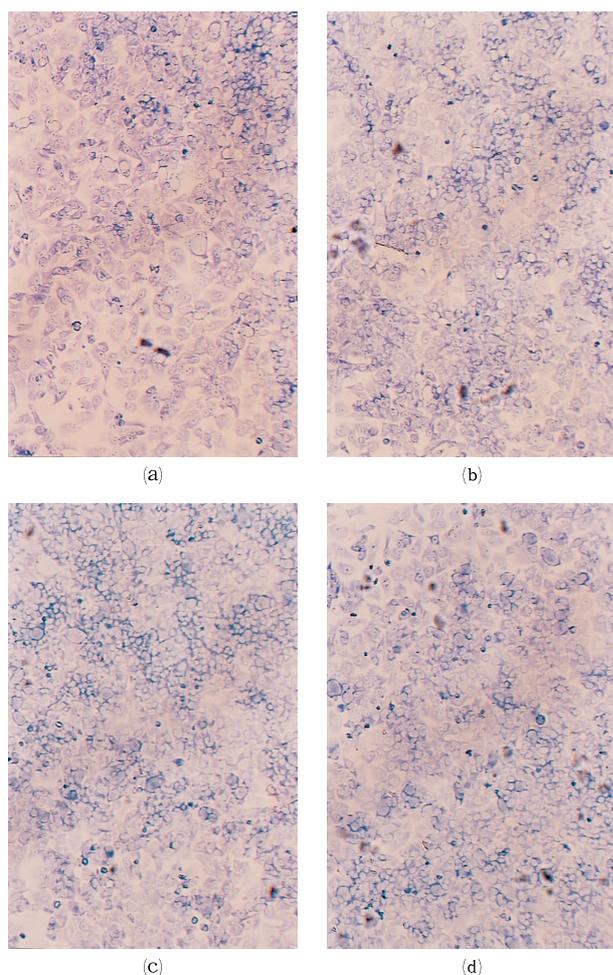


Fig. 9. Chlamydial inclusions detected by Giemsa staining. HeLa 229 cells infected with *Chlamydia trachomatis* and treated with 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tosylfloxacin (a, b) or 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ofloxacin (c, d) from 24 to 30 h after infection.

いる<sup>13)</sup>。今回の実験においても TFLX および OFLX ともに網様体の分裂増殖期に相当する感染後 6~12 時間および 24~30 時間の作用で封入体内のクラミジア粒子密度と感染性粒子数を減少させた。さらに今回の実験においては、代謝活性が低いことからキノロン系薬剤が作用しないと考えられる基本小体の時期に相当する感染後 0~6 時間薬剤作用でも TFLX に抗クラミジア活性がみられた。この作用がどのような理由にもとづくかは明らかではないが、*C. trachomatis* 粒子に付着あるいは取り込まれた TFLX が分裂増殖期に作用した可能性や、薬剤除去後に宿主細胞内に維持されたわずかな TFLX が分裂増殖期に作用した可能性、あるいは理由は明らかにされていないが緑膿菌などに見られるように静止期の細菌を殺菌する作用<sup>14)</sup>が *C. trachomatis* でも発現した可能性が考えられる。

また、感染後 24~30 時間の両薬剤作用群では蛍光抗体法で control と同程度の封入体が観察されたが、これは蛍光抗体法では薬剤添加以前に増殖していたクラミジアのタンパクが抗体で検出されるためと考えられた。これらの結果から、すでにクラミジア抗原が生成された後の抗クラミジア活性を見るためには Yield-ELISA 法による感染性粒子の測定が有効であると考えられた。

本研究では光学顕微鏡による観察と Yield-ELISA 法による感染性粒子数測定で、TFLX と OFLX の抗菌作用を検討した。電子顕微鏡による観察を行っていないため、クラミジアの菌形態や、微細な構造の変化は捉えられていないが、今回 *in vitro* において TFLX が *C. trachomatis* に対し生活環のいずれの時期にも作用を示すことを認めた。特に、薬剤が作用しにくい感染初期の *C. trachomatis* に対する作用が認められたことは興味深く、今後この理由を明らかにするとともに、2~3 週間と長

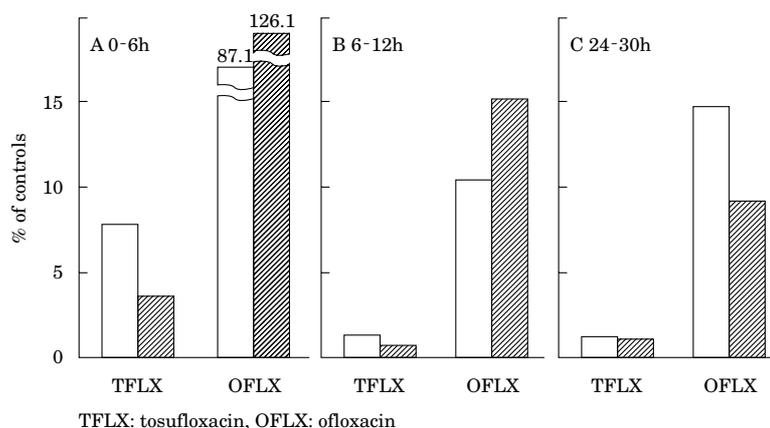


Fig. 10. Number of infectious chlamydia after treatment of tosylfloxacin (TFLX) and ofloxacin (OFLX). *Chlamydia trachomatis* was inoculated on HeLa 229 cells. TFLX or OFLX was added to infected cells to give a final concentrations of 1 ( $\square$ ) or 3 ( $\text{hatched}$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$  at (A) 0 h, (B) 6 h, or (C) 24 h after inoculation of *C. trachomatis*, and incubation was continued for 6 h with drugs. The number of infectious chlamydial cells was measured by Yield-ELISA at 60 h after inoculation of *C. trachomatis*. Controls were inoculated by the same method without the drug. The vertical axis of Fig. 10 indicates the ratio to controls.

期にわたる頻回投与が必要とされるクラミジア感染症<sup>15-17)</sup>の抗菌化学療法にどのような意義をもつかを検討したい。

本論文の要旨は第47回日本化学療法学会総会(1999年6月:東京)にて発表した。

#### 文 献

- 1) 松本 明, 宮下修行: クラミジア—基礎的立場から。: 細胞内寄生菌の基礎と臨床(三橋 進, 熊本悦明, 島田 馨 編), p.59~68, ライフサイエンス・メディカ, 東京, 1996
- 2) 小花光夫: *Chlamydia trachomatis*の抗菌剤に対する*in vitro*感受性測定法に関する研究。Chemotherapy 35: 283~292, 1987
- 3) 藤巻一雄, 能見寿彦, 浜名洋子, 他: T-3262の*in vitro*および*in vivo*における細菌学的評価。Chemotherapy 36: 1~18, 1988
- 4) Maeda H: In vitro activities of T-3262, NY-198, fleroxacin (AM-833; RO 23-6240), and other new quinolone agents against clinically isolated *Chlamydia trachomatis* strains. Antimicrob Agents Chemother 32: 1080~1081, 1988
- 5) Segreti J: In vitro activity of tosufloxacin (A-61827; T-3262) against selected genital pathogens. Antimicrob Agents Chemother 34: 971~973, 1990
- 6) Nakata K: In vitro and in vivo activities of sparfloxacin, other quinolones, and tetracyclines against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob Agents Chemother 36: 188~190, 1992
- 7) Kimura M: In vitro and in vivo antichlamydial activities of newly developed quinolone antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 37: 801~803, 1993
- 8) Miyashita N: In vitro and in vivo activities of AM-1155, a new fluoroquinolone, against *Chlamydia* spp. Antimicrob Agents Chemother 41: 1331~1334, 1997
- 9) 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—(1991年改訂版)。p.303~307, 1991
- 10) Walter A T, Keneth D T: *In situ* ELISA for the evaluation of antiviral compounds effective against human cytomegalovirus. J Virol Methods 35: 207~215, 1991
- 11) 富井隆夫, 武田秀利, 村野秀和, 他: オフロキサシン眼軟膏のヒト結膜嚢内残留濃度の検討。あたらしい眼科 6 (1): 144~146, 1989
- 12) David C H, John S W: Mechanisms of Quinolone Action and Bacterial Killing. Quinolone Antimicrobial Agents 2 nd ed., p.53~75, 1993
- 13) 三井幸彦, 大黒成夫, 藤本道正, 他: フルオロキノロンのクラミディア・トラコマティスに対する効果とその作用機序。日眼会誌 92: 973~980, 1988
- 14) 山田博司: *In vitro* non-growing *P. aeruginosa* に対する TFLX の殺菌作用。第45回日本化学療法学会総会特集号: 演題番号 75, 1997
- 15) 伊藤典彦: クラミジア感染症。あたらしい眼科 13 (1), 41~48, 1996
- 16) CDC: Guidelines for treatment of STD. MMWR 47 (RR-1), 1998
- 17) 岸本寿男: クラミジア・ニューモニエ肺炎。日本臨床領域別症候群 24: 236~240, 1999

## Antichlamydial activity of tosufloxacin in each stage of the chlamydial life cycle

Naoko Futakuchi, Harumi Hisada, Masahiro Takahata  
and Shinzaburo Minami

Research Laboratories, Toyama Chemical Co. Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama 930-8508, Japan

We compared the *in vitro* activity of tosufloxacin (TFLX) against *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx to that of ofloxacin (OFLX). Antichlamydial activity of the drugs was evaluated by the counting of the number of chlamydial inclusions, observation of the density of chlamydial cells in chlamydial inclusions, and measurement of the number of infectious chlamydial cells. Infected HeLa 229 cells were exposed to 1 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX at 0-6, 6-12, and 24-30 h after inoculation of *C. trachomatis* D/UW-3/Cx. The 0-6 h exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX reduced the number of chlamydial inclusions to 43.4% and 93.6% of controls. The 6-12 h exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX reduced the number of chlamydial inclusions to 7.0% and 33.5% of controls. The 24-30 h exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX did not reduce the number of chlamydial inclusions. The 0-6 h exposure to TFLX reduced the density of chlamydial cells in chlamydial inclusions but the 0-6 h exposure to OFLX did not. The 6-12 and 24-30 h exposure to TFLX and OFLX reduced the density of chlamydial cells in chlamydial inclusions. The 0-6 h exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX reduced the number of infectious chlamydial cells to 3.6% of controls but the 0-6 h exposure to OFLX did not. The 6-12 h exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX reduced the number of infectious chlamydial cells to 0.7% and 15.1% of controls. The 24-30 h exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX reduced the number of infectious chlamydial cells to 1.1% and 9.2% of controls. The inhibitory effect of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX on the growth of chlamydia was equal to that of 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of TFLX and OFLX. In conclusion, the *in vitro* antichlamydial activity of TFLX was superior to that of OFLX in each period of the chlamydial life cycle.