

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

電子顕微鏡による研究 (図4)

三井 幸彦*1・大黒 成夫*2 (*1徳島大学, *2徳島大学第二解剖,
藤本 道正*3・東堤 稔*4 (*3徳大医学部総研電顕班, *4阪大微研)

Effect of Fluoroquinolones on *Chlamydia Trachomatis*
as Revealed by Electron Microscopy

Yukihiko Mitsui, Shigeo Daikoku*, Michimasa Fujimoto**
and Minoru Higasitutumi***

Tokushima University, *Department of Anatomy II, Tokushima University,
**Central Electron Microscopy Laboratory, Tokushima University Medical School,
***Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University

要 約

電子顕微鏡によって観察するとクラミディア基本小体は感染後数時間で細胞内に侵入し、栄養体(原始体または網状体)に成長し、24~72時間の間に増殖、分裂を繰り返す。基本小体を充滿した封入体を作る。48時間では一部基本小体が完成し、他の原始体は活発に増殖、分裂している。この時期に2MICの濃度のオフロキサシンを添加して24時間経つと、封入体は周辺部に少数の基本小体を含み、原始体は崩壊し空洞化する過程と思われる各種の段階の所見を示す。封入体全体としては空虚になった所見を示す。即ち既に完成されていた基本小体は変化を受けなかったが、原始体は内部構造が破壊されて、崩壊して行くものと考えられる。蛍光抗体染色でみると抗原(蛋白)は十分作られているが、封入体が崩壊して細胞外に散乱している。オフロキサシンはクラミディアの原始体が増殖する過程において、その代謝を阻害してこれを破壊するが、代謝を行わない完成された基本小体には作用せず、次の発育環で原始体の形成を阻害して治療効果を発揮するものと考えられる。(日眼 92: 973-980, 1988)

キーワード: クラミディア・トラコマティス, 発育環, 電子顕微鏡, オフロキサシン, 作用機序

Abstract

Fluoroquinolones, ofloxacin in particular, are known to be effective in the treatment of *Chlamydial* infections of the eye. To clarify the mode of action of this agent, HeLa cells were infected with a *Chlamydia trachomatis* C-type strain, and cultivated for 48 hours. Then ofloxacin was added to the culture medium at a concentration of 2 μ g/ml for the next 24 hours. Specimens were then examined by electron microscopy in thin sections. In control experiments, in which ofloxacin was not used, inclusions contained a great number of initial bodies under fission along with a small number of mature elementary bodies at 48-hour-culture, and a great number of elementary bodies with a small number of initial bodies at 72-hour-culture. When ofloxacin was added for the last 24 hours, inclusions

別刷請求先: 770 徳島市北矢三町4丁目2の1の4 三井 幸彦 (昭和63年1月18日受付)

Reprint requests to: Dr. Yukihiko Mitsui

Kitayaso 4-chome 2-1-4

Tokushima 770, Japan

(Accepted for publication January 18, 1988)

contained a small number of elementary bodies with a great number of initial-body-ghost-shadow after 72 hours culture. It was concluded that the agent destroys the initial bodies during their development, but it has little action on established elementary bodies. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 973—980, 1988)

Key words: *Chlamydia trachomatis*, Developmental cycle, Electron microscopy, Ofloxacin, Mode of action

I 緒 言

抗クラミディア活性を有する抗生剤は、テトラサイクリン、マクロライド系抗生物質以来長期間新しいものが出来なかった。最近になってフルオロキノロンの名称で総括される一群のピリドンカルボン酸系の合成抗菌剤が、抗クラミディア活性を持つことがわかり、その一つであるオフロキサシンは細胞培養による実験では、クラミディアに対する最少発育阻止濃度がおよそ $1\mu\text{g/ml}$ であること¹⁾、0.3%の眼軟膏として1日5回、およそ8週間点眼し続けると、結膜のクラミディア感染を完治させることが出来ること^{2)~5)}、などが判明しつつある。この完治に必要な量は、WHOがテトラサイクリンについて推奨した1%眼軟膏1日4回、2カ月⁶⁾に劣らない。

クラミディア感染の治療には、抗生物質でも抗菌剤でも、一般の細菌感染に対してより、大量長期の治療が必要であるが、その理由は明確にはされていない。それで私どもは今回細胞培養を用いて、オフロキサシンがクラミディアの発育環のどの時点でどのように作用するものであるかを、電子顕微鏡を用いて検討した。

II 実験法

1. 使用株：結膜から分離された *Chlamydia trachomatis* type C, HeLa-cell adapted strain, stock 10^7 IFU/ml, オフロキサシンの MIC $1\mu\text{g/ml}$ ¹⁾

2. 使用細胞：HeLa 229

3. 培養液：1) 細胞増殖用：Eagle MEM 92ml に FBS 8ml を加えたもの。

2) *Chlamydia* 増殖用：細胞増殖用培養液100ml にサイクロヘキシミド（和光純薬）(1mg/ml) 0.2ml と 7.5% NaHCO_3 2ml を添加したもの。

3) 試験用：*Chlamydia* 増殖用培養液にオフロキサシン（第一製薬）を $2\mu\text{g/ml}$ 添加したもの。

4. 培養法：1) 細胞浮遊液（細胞増殖用培養液、 5×10^5 cells/ml）を 25cm^2 の細胞培養プラスチックボトル

に10ml 接種（蛍光抗体染色用には15mm 径平底硝子管と13mm 径カバー硝子に1ml 接種）、5% CO_2 下 36.5°C で20時間培養、増殖させた。

2) DEAE-Dextran 処理後、*Chlamydia* stock を 10^5 IFU/ml に稀釈して1ml 接種、2時間静置吸着させる（5% CO_2 、 36.5°C ）。吸着後 *Chlamydia* 増殖用培養液で2回洗浄して吸着されなかった *Chlamydia* を除去し、同培養液10ml を加えて48時間培養（5% CO_2 、 36.5°C ）した。

3) 48時間培養後、培養液をオフロキサシン含有の試験用培養液と交換し、24時間同一条件で培養した。ただし対照実験用のものは2)の状態で72時間まで培養を続けた。

5. 電子顕微鏡検査：培養終了後直ちに細胞を2% グルタルアルデヒド(0.1M 磷酸 Buffer)で 4°C 1時間固定、次いで1% Osmic acid (0.1M 磷酸 Buffer) で 4°C 1時間固定、アルコール脱水、Epon 包埋、ライヘルトウルトラカット E で超薄切片とし、ウランと鉛の2重染色後、日立 HU 12型電子顕微鏡で75kV の加速電圧で観察した。

6. 蛍光抗体染色検査：培養終了後直ちに Ortho 社製 *C. trachomatis* 用モノクローナル抗体で染色、蛍光顕微鏡で観察した。

III 実験結果

1. 対照実験電顕所見：

図 1A に接種72時間後の封入体の全貌を、弱拡大の電顕写真で示す。封入体は（特に周辺部）完成された基本小体で充満している。少数の小型になった原始体とその間に散在する。封入体内の空隙はグリコーゲンと思われる不定形の物質で充たされている。強拡大の所見を図 1B に示す。成熟した基本小体 (EB) は中央に電子密度の高い類核を持ち、周囲を細胞壁で囲まれている。小型になった原始体 (IB) も相当数混在している。原始体は電顕所見から網状体 (reticulate body, RB) とも呼ばれているが、内部構造の電子密度が基本

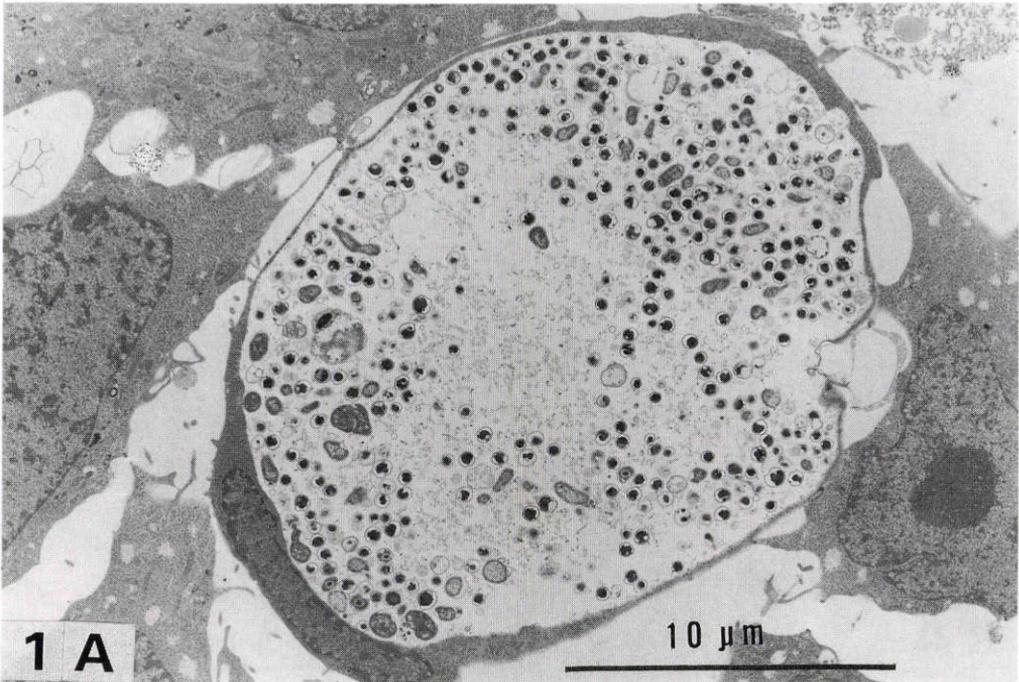


図1A クラミディア感染72時間後の封入体電顕所見。弱拡大で封入体の全貌を示す。封入体は細胞質の大半を占め、完成された基本小体で充満しているが、まだ相当数の小型になった原始体が混在する。

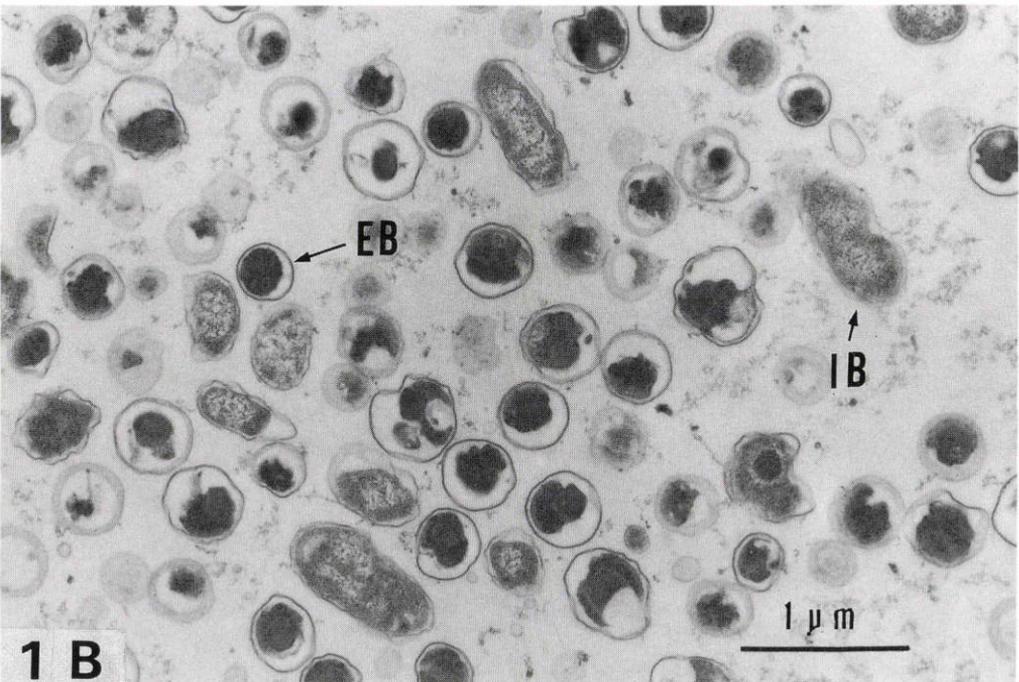


図1B 前図の部分的強拡大所見。EB：基本小体，IB：原始体，封入体腔内の不定形な基質状のものはグリコゲン。

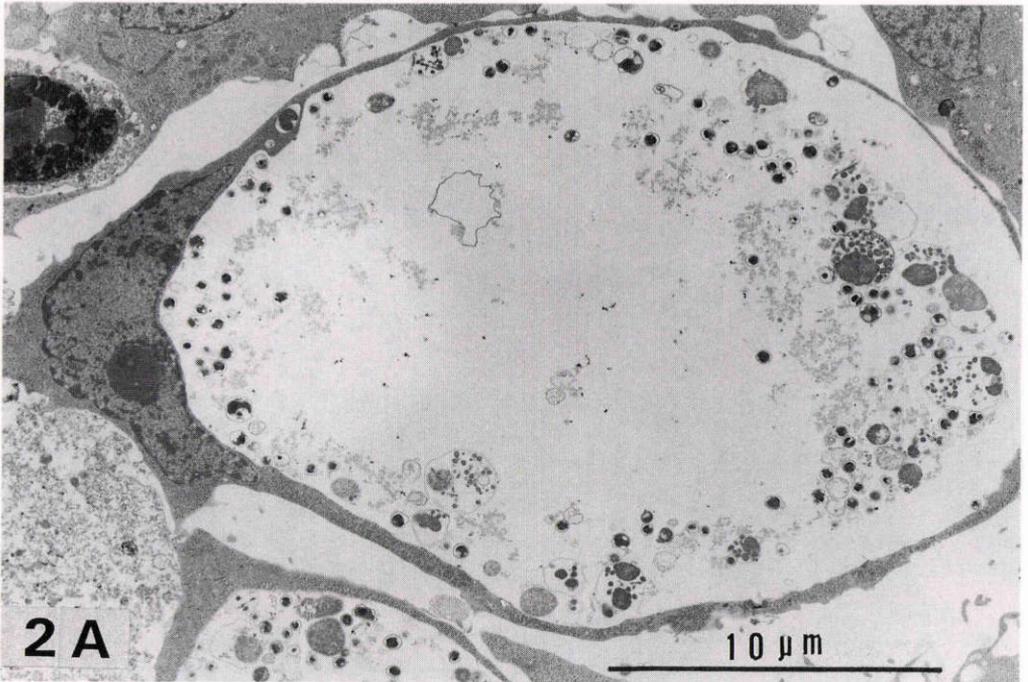


図2A クラミディア感染48時間後にオフロキサシン添加, 24時間後の封入体所見. 少数の基本小体が周辺部にあるが, 原始体は崩壊している.

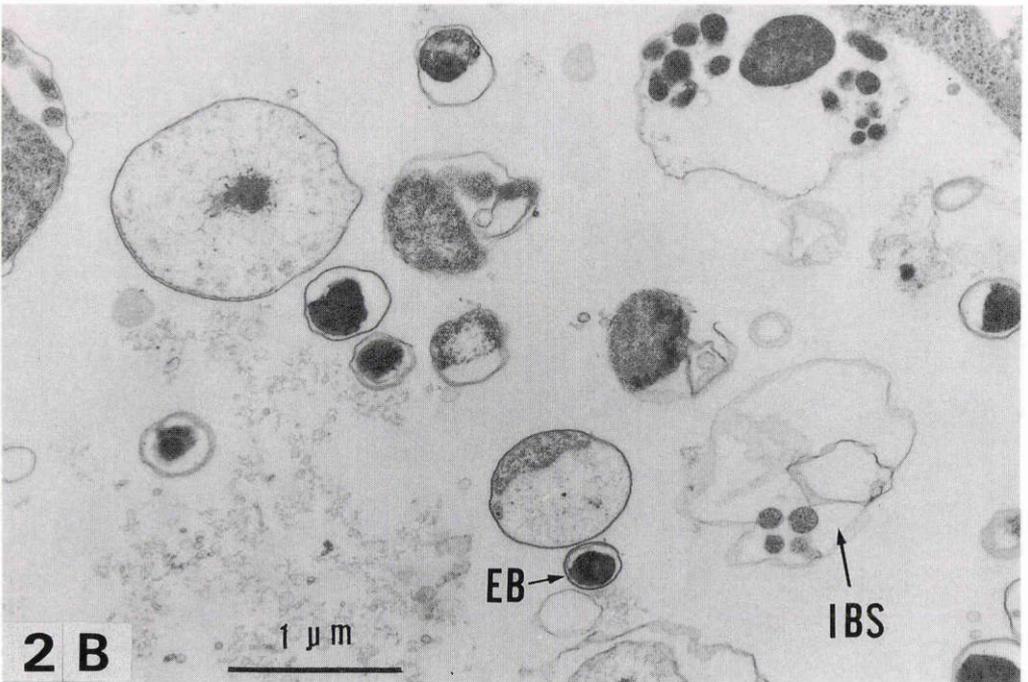


図2B オフロキサシン使用後封入体の強拡大所見. 原始体崩壊の強い部分, EB: 基本小体, IBS: initial body shadow

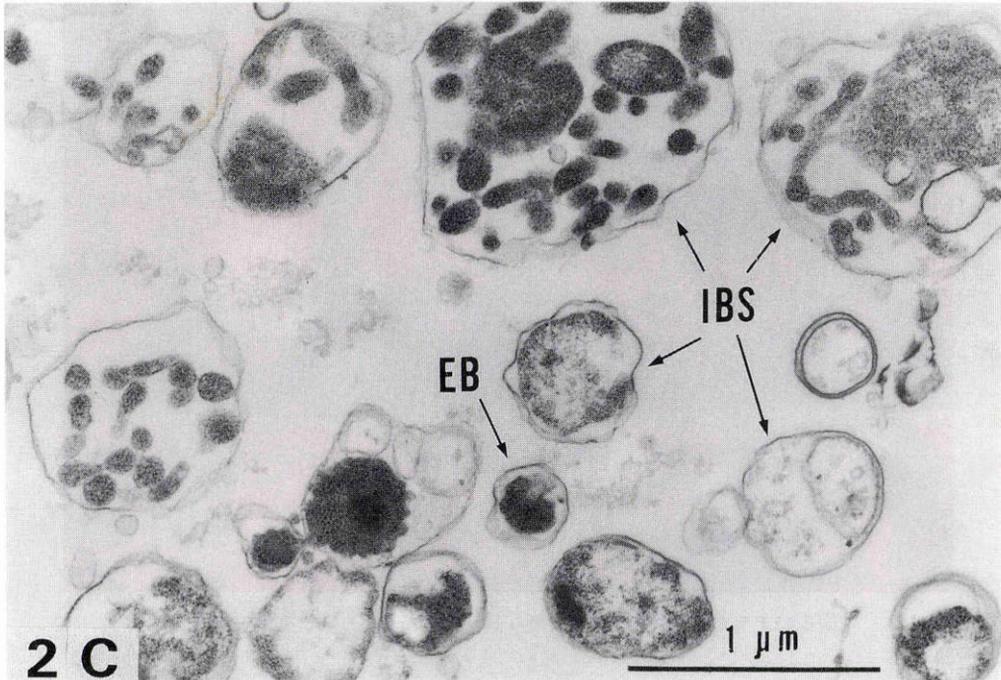


図 2C オフロキサシン使用後封入体の強拡大所見。原始体崩壊の過程を含む部分。
EB: 基本小体, IBS: initial body shadow

小体より低く、網目状に近い不均一な構造を示す。その中 IB の記号で示すものは、恐らく最後の分裂の過程にあり、成熟過程を経て 2 個の基本小体が完成されるのではないかと推定される。IB の記号の下方やや左に最後の分裂を終えた原始体が基本小体への成熟過程にあると推定される所見がある。

2. オフロキサシンの作用:

接種 48 時間後から 24 時間オフロキサシンを作用させたときには対照に見られるような充実した封入体は見られない。内空が粗雑でないし空洞化しており、封入体の周辺部には少数の基本小体が散在している。対照実験に見られるような正常構造の原始体は見る事が出来ない。原始体と思われるものは内部構造が崩壊し、または空洞化している。グリコーゲン様物質も疎で、封入体腔の大半は空虚となっている(図 2A)。図 2B および C に強拡大の所見を示す。基本小体(EB)は形態学的には正常である。原始体は内部構造が崩壊し、空洞化するにいたる種々の過程を示すと思われる所見(IFS, initial body shadow)を呈している。

3. 蛍光抗体染色所見:

図 3 に対照実験、図 4 にオフロキサシンを作用させ

た実験の培養細胞を蛍光抗体染色した所見を示す。対照実験では多数のタイトな封入体が染色されている。前回の同様な実験の時の写真¹⁾よりぼけて見えるが、前回は最少発育阻止濃度測定を目的としており、細胞は単層培養であったが、今回は電顕資料作成のため重層培養を用いたための差であろう。オフロキサシンを作用させた後の写真(図 4)では蛍光物質の量は対照実験と大差があるとは思えないが、蛍光物質の小塊が細胞の外に四散しているように見える。また蛍光物質は対照実験のものより色彩も境界も鮮明に見える。抗原が細胞外に脱出して、裸になっていることを示唆する。

IV 考 按

HeLa 細胞におけるクラミディアの発育環は、接種後 1 時間で基本小体は細胞表面に吸着され、食菌されるような形で細胞内に取り込まれ、数時間で細胞質の深部に達する。8~12 時間で基本小体はその数倍の大きさの原始体(網状体)に成長しはじめ、内部構造も変化し、24 時間から 72 時間の間に増殖、分裂を繰り返す。封入体腔を拡大し、72 時間後には基本小体を充滿

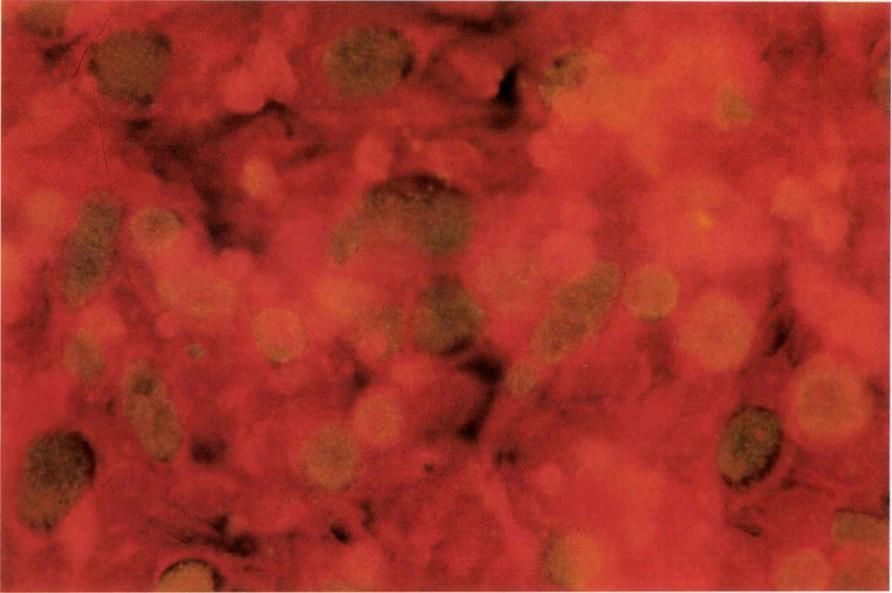


図3 クラミディア感染72時間後の HeLa 重層培養の蛍光抗体染色所見.

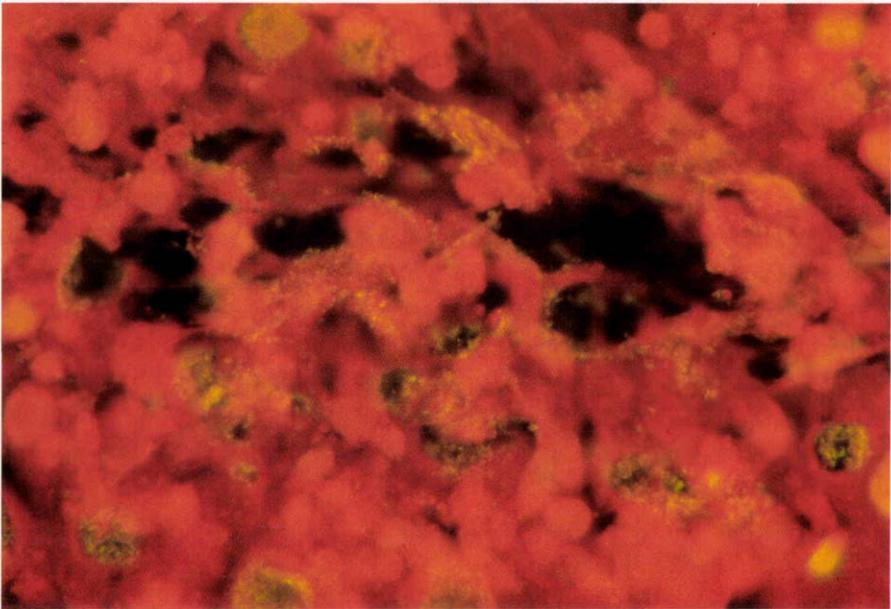


図4 クラミディア感染48時間後にオフロキサシン添加, 24時間後の HeLa 重層培養の蛍光抗体染色所見. 抗原が細胞外に四散し, 前図より鮮明に染色されている.

し、細胞質の大半を占める大きな封入体が完成する⁷⁾。卵黄嚢でも初期の時間的経過は不詳であるが、72時間で成熟した基本小体封入体が完成する点は同じである⁸⁾。

今回の実験でも接種72時間後には成熟した基本小体封入体が完成していた(図1)。接種48時間では少数の基本小体が出来ていたはずであるが⁷⁾⁸⁾、大部分のものは原始体の状態で、この時点が HeLa 細胞でも、卵黄嚢でも、原始体の増殖、分裂の最盛期である⁷⁾⁸⁾。この時点でオフロキサシン(2MICの濃度)を添加して24時間を経た時の所見は、少数の基本小体が散在するが、対照に見られるような原始体は見あたらず、内部構造が崩壊し、または空虚になっていた(図2)。

以上の所見を併わせ考えると、オフロキサシンは完成された基本小体(おそらく代謝を行っていない)に対しては、少なくとも形態的な変化を与えず(おそらく死滅せず)、原始体に対しては、その代謝を阻害してこれを崩壊、死滅させるのであろうことが示唆される。基本小体は次の細胞に感染して、原始体を形成する時期に破壊されるのであろう。

蛍光抗体染色の所見(図3、4)から見ると、オフロキサシンを作用させた後においても抗原量(蛋白)が著しく減少した様には見えない。蛋白合成阻害剤であるテトラサイクリンを作用させると電顕所見(蛍光抗体染色所見については知られていない)では、原始体は18時間作用させると内容が全く空虚になっている⁹⁾。オフロキサシンでは24時間作用させても、電顕的に原始体の内容物が可成り残っているものが多いのは、主として蛋白である可能性がある。オフロキサシンの作用機転については、細菌に特有な DNA-gyrase を阻害するともいわれている¹⁰⁾。Gyrase を阻害する濃度が当核細菌の最少発育阻止濃度より著しく高いという矛盾はある¹¹⁾。しかしオフロキサシンは、ヒトおよび哺乳類の細胞の DNA 合成は阻害しないし、変異原性も示さない¹²⁾。これに反して細菌の DNA 合成を、短時間で特異的に阻害するが、細菌の RNA 合成や蛋白合成は相当時間阻害しないことを示唆する実験結果は少なくない¹³⁾¹⁴⁾。以上の点から考えてみると、オフロキサシンは原始体の DNA 合成を阻害するが、蛋白合成は直ちには阻害されず、相当量の抗原がオフロキサシン投与後においても産生されたものと考え、テトラサイクリン使用時の所見との差が矛盾なく説明できる。

従来抗クラミディア性の抗生物質の作用機序は漠然

と原始体が基本小体を形成するのを阻止すると云われていた¹⁵⁾が、それに対する実験的根拠は無い。今回の実験は、抗クラミディア性抗生抗菌剤がクラミディア感染を治癒させるために、細菌感染に対してより頻回長期にわたる治療を必要とする理由の一つは、それらのものが原始体の増殖を阻止するけれども、基本小体を不活化する作用を持たないためではないかと推定されることに対して、フルオロキノロンについて形態学的にその一つの根拠を与えたものと考え、しかしこれがすべてではなく、クラミディアが細胞内寄生体であるため、一般細菌の場合には菌の増殖速度を白血球の食菌速度以下に押さえれば病気は治るのに反し、クラミディアの場合には白血球による生体の防衛力に期待できず、薬剤によって病原体をすべて死滅させなければ再発するであろうことなども関与しているであろう。

文 献

- 1) 三井幸彦, 東堤 稔: Chlamydia 感染に対する化学療法の基礎的研究. 日眼 90: 1074—1080, 1986.
- 2) 井上須美子: 新生児 Chlamydia 感染における蛍光抗体法の診断的価値と新合成抗菌剤による治療. 日眼 90: 1081—1084, 1986.
- 3) 塩田 洋, 楠島康平, 三村康男: 成人における Chlamydia 感染の診断と治療の研究. 日眼 90: 1085—1089, 1986.
- 4) 松村香代子, 井上慎三: Chlamydia 結膜炎の診断と治療の研究. 日眼 90: 1090—1093, 1986.
- 5) 田村 修, 阿部真知子: 新生児 Chlamydia 感染症の診断と治療の研究. 日眼 90: 1094—1096, 1986.
- 6) WHO: World Hlth Org Techn Rep Ser 59, Expert Committee on Trachoma, p. 5, 1952.
- 7) Mitsui Y, Kitamura T, Fujimoto M: Adaptation of TRIC agents to tissue culture and characteristics of tissue culture adapted variants. Am J Ophthalmol 63(No. 5, Pt II): 1191—1205, 1967.
- 8) Mitsui Y, Fujimoto M, Kajima M: Development and morphology of trachoma agent in the yolk sac cell as revealed by electron microscopy. Virology 23: 30—45, 1964.
- 9) Mitsui Y, Tamura O, Matsubara M, Fujimoto M: Effect of antibiotics in the treatment of eye diseases caused by PLT-agents, an analysis by electron microscopy. Proceedings of the XX Intern Congr Ophthalmol Munich, 698—704, Excerpta Medica, Amsterdam, 1966.
- 10) Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN, et al: Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of Escherichia coli nal A gene

- product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 74: 4767—4771, 1977.
- 11) **Sato K, Inoue Y, Yamashita S, et al**: Inhibitory effects of ofloxacin and other new pyridonecarboxylic acids on the activities of DNA gyrase isolated from *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacterioides fragilis*, Ofloxacin: A new quinolone antibacterial agent, Proceedings of a Workshop held at the 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto, 1985, edited by Mitsuhashi S, and Daikos GK, p21—25.
 - 12) 島田広康, 恵比根豊, 黒沢裕美子他: 新合成抗菌剤 DL-8280 の変異原性に関する検討. Chemotherapy 32(S-1): 1162—1170, 1984.
 - 13) **Sato K, Inoue M, Mitsuhashi S**: In vitro and in vivo antibacterial activity of DL-8280, a new pyridonecarboxylic acid derivative, Proceedings of the Fifth International Symposium on Plasmids, Castle of Smolenice, Czechoslovakia, 1983, edited by Mitsuhashi S, Krcmery V, p83—87.
 - 14) 西野武志: New quinolone の抗菌力と抗菌作用メカニズムについて. Medical Digest 35: 33—39, 1986.
 - 15) **Becker Y**: The Chlamydia. Molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryotes. Microbiological Rev 42: 274—306, 1978.

(第92回日眼総会原著)
