

## DBA/2系マウスの *Legionella pneumophila* 肺炎モデルに おける Levofloxacin の治療効果

樫本佳典<sup>1)</sup>・黒坂勇一<sup>1)</sup>・苅部幸江<sup>1)</sup>・魚山里織<sup>1)</sup>・  
藤川香津子<sup>1)</sup>・難波憲司<sup>2)</sup>・大谷 剛<sup>1)</sup>・山口恵三<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 第一三共株式会社生物医学第四研究所

<sup>2)</sup> Daiichi Sankyo Pharma Development, USA

<sup>3)</sup> 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

(2009年6月30日受付)

ニューキノロン系抗菌薬 Levofloxacin (LVFX) の *Legionella pneumophila* 肺炎の治療における有用性を基礎的に検討するため、*L. pneumophila* に対する *in vitro* ならびに *in vivo* 抗菌活性を評価した。

本邦で臨床から分離された *L. pneumophila* (42株) に対する LVFX の MIC<sub>90</sub> は 0.03 µg/ml であり、Ciprofloxacin および Pazufloxacin と同等で、Telithromycin および Minocycline よりも高活性であった。

DBA/2系マウスに *L. pneumophila* suzuki 株 (血清型1) を点鼻接種し、LVFX を感染翌日から7日間経口投与した。LVFX の投与量は、500 mg×1/日を経口投与時のヒト血中濃度時間曲線下面積 (AUC) がマウス血清中で達成可能と予測される用量とした。その結果、LVFX は投与翌日から肺内菌数を有意に減少させ、感染8日目以降には除菌に至る治療効果を示した。

以上の成績は、*Legionella* 肺炎の治療における LVFX 500 mg×1/日経口投与の有用性を示唆するものと考えられた。

*Legionella* 属菌は本来土壌菌であり、自然環境に広く分布するグラム陰性桿菌である。クーリングタワーや循環式温泉などの人工的水利用設備からの分離も多く、エアロゾルを介して感受性宿主が菌を吸入した場合、肺炎やポンティアック熱を発症する。欧米に比較し本邦では *Legionella* 属菌を起因菌とする感染症の発生報告は少ないものの、数年来増加傾向を示し、欧米の発生率に近づきつつある。また、散発的な発生事例は例年報告されており<sup>1-3)</sup>、2002年には宮崎県の循環式温浴

施設において295人が発症し7名が死亡する本邦最大の集団感染事例も報告されている<sup>4)</sup>。多くの場合、*Legionella* 肺炎の起因菌は *Legionella pneumophila* であり、本邦においては約43%が *L. pneumophila* 血清型1に、その他の血清型を含めると約70%が *L. pneumophila* に起因すると報告されている<sup>5)</sup>。

通性細胞内寄生性である *Legionella* 属菌による感染症では、細胞外のみならず食細胞内で増殖する菌に対しても活性を示す薬剤が必要となる。そ

のため、細胞内移行性が良好で、*Legionella* 属菌に対して高い抗菌活性を有するニューキノロン系やマクロライド系抗菌薬が治療薬として推奨されている<sup>6)</sup>。特に、ニューキノロン系抗菌薬の Levofloxacin (LVFX) は、*Legionella* 肺炎に対する高い治療効果が多数報告されている<sup>7-9)</sup>。それらの多くは LVFX 注射剤による治療効果の報告であるが、本邦での適応承認は、現在は経口剤のみである。近年、尿中抗原検出キットなどの迅速診断技術の普及により *Legionella* 肺炎も軽症段階での早期発見が可能となったことから<sup>10)</sup>、経口抗菌薬も治療オプションの一つと考えられている<sup>6)</sup>。

今回、LVFX 経口剤の *Legionella* 肺炎の治療における有用性を基礎的に検討することを目的として、本邦で分離された臨床由来の *L. pneumophila* に対する LVFX の *in vitro* 抗菌活性を *Legionella* 属菌に対して適応を有する既存の抗菌薬と比較するとともに、*L. pneumophila* によるマウス肺炎モデルを用いて、LVFX のヒト血中パラメータ値をマウス血中でシミュレートした時の治療効果を検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試薬剤

Levofloxacin (LVFX), Ciprofloxacin (CPFX), Pazufloxacin (PZFX) および Telithromycin (TEL) は第一三共株式会社にて合成あるいは製剤から抽出し、Minocycline (MINO) はシグマアルドリッチジャパン株式会社から入手して供試した。いずれの薬剤もフリー体換算して使用した。

### 2. 供試菌株

薬剤感受性試験には、1994~2003年に本邦で臨床分離された *Legionella pneumophila* 42株 (41株は東邦大学医学部 微生物・感染症学講座由来、1株は株式会社ビー・エム・エルより分与された)

を供試した。このうち、*L. pneumophila* suzuki 株血清型1 (東邦大学医学部 微生物・感染症学講座由来) をマウス肺炎モデルに用いた。

### 3. 薬剤感受性試験

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、Buffered starch yeast extract (BSYE) 寒天培地を用いた SAWATARI らの報告<sup>11)</sup> に準じて実施した。すなわち、菌株を Buffered-charcoal yeast extract alpha (B-CYE $\alpha$ ) 寒天培地 (栄研化学) に接種し、37°C 5% 炭酸ガス濃度条件下で 72 時間培養した後、生理食塩液にて懸濁・希釈し、約  $10^4$  CFU/spot の割合で薬剤含有 BSYE 寒天培地に接種した。同条件下で 96 時間培養後、菌の増殖を阻止した最小の薬剤濃度を MIC とした。

### 4. マウス肺炎モデル

動物は DBA/2 系マウス (日本チャールス・リバー)、雌性、7 週齢を用いた。動物の取り扱いには、第一三共株式会社「動物実験に関する細則」に準拠して実施した。

接種菌液は、TATEDA ら<sup>12)</sup> の方法に準じて調製した。すなわち、保存菌液を Buffered charcoal yeast extract (BCYE) 寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) に塗布して 37°C で 3 日間培養し、発育したコロニーを Buffered yeast extract broth (BYEB) に接種した。これを、37°C 5% 炭酸ガス濃度条件下で 20 時間振盪培養後、BYEB で 25 倍に希釈し、同条件下でさらに 18 時間振盪培養した。この培養液を  $2.5 \times 10^7$  CFU/ml となるように生理食塩液で希釈して接種菌液とした。この菌液を、ペントバルビタール (ソムノペンチル、共立商事) の腹腔内投与 (72 mg/kg) により麻酔したマウスに、40  $\mu$ L/マウスの割合で点鼻接種した。

### 5. 体内動態

DBA/2 系マウス (n=4) に、LVFX を 20, 60 お

よび100 mg/kgを経口投与し、投与0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6および8時間後の血清中薬剤濃度を、*Bacillus subtilis* ATCC6633株を検定菌としたバイオアッセイ法を用いて測定した。各投与量におけるマウス血清中濃度の平均値および標準偏差を算出し、薬物動態解析ソフトSAG-CP (アスメディカ)を用いて台形法および最小二乗法により、体内動態パラメータを算出した。

## 6. マウス投与量の設定

LVFXの治療効果は血中濃度時間曲線下面積(AUC)に依存すると考えられている<sup>6,13)</sup>。本試験では薬剤投与後のマウス血清中濃度から算出された体内動態パラメータを基に、LVFXをヒトに500 mg×1/日で経口投与した時のAUC<sup>14)</sup>と同等の値をマウス血清中で達成が可能と予測される用量を推定した。

## 7. マウス肺炎モデルにおける薬効試験

マウス肺感染モデルに、0.5% Carboxymethyl cellulose (CMC)に懸濁したLVFXを感染翌日から1日2回連続7日間経口投与した。投与用量は上記6で設定した用量を用いた。対照群には、0.5%CMCを薬剤投与群と同様に経口投与した。感染1, 2, 4, 8および12日後の肺を無菌的に採取し(n=5)、このうち副葉に関してはヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に観察した。その他の肺葉に関しては、0.033%リン酸緩衝液(PB, pH 7.0)を加えてホモジネート

液を作製し、これを原液としてPBにて適宜希釈し、BCYE寒天培地に接種して37°Cで3~7日間培養した。培養後BCYE寒天培地上に発育したコロニー数を計測し、希釈倍率および肺重量を基に肺あたりの菌数を算出した。肺内菌数の検出限界値は12~14 CFU/Lung (1.08~1.15 Log CFU/Lung)であった。

## 8. 統計解析

肺内菌数は各時点毎に、感染対照群とLVFX投与群の、比較する2群でF-検定を実施し、その結果が等分散のときはStudentのt検定を、非等分散のときはAspin-Welchのt検定を実施した。検定の有意水準は両側5%とした。

## 成績

### 1. 薬剤感受性

本邦で臨床分離された*L. pneumophila* 42株に対するLVFXのMIC<sub>50</sub>およびMIC<sub>90</sub>はそれぞれ0.015および0.03 μg/mlであり、0.03 μg/mlで全ての供試菌株の発育を抑制した。この活性は、CPFEXおよびPZFXとほぼ同等であり、TELおよびMINOよりも高活性であった(表1)。

薬剤感受性試験に供試した菌株中、*in vivo*試験に供試した*L. pneumophila* suzuki株に対するLVFXのMICは0.015 μg/mlであった。

表1. *Legionella pneumophila* (42株) に対する抗菌活性

薬剤	MIC (μg/ml)					
	範囲			MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
Levofloxacin	0.015	—	0.03	0.015	0.03	0.03
Ciprofloxacin	0.015	—	0.06	0.015	0.03	0.03
Pazufloxacin	0.015	—	0.03	0.03	0.03	0.03
Minocycline	0.25	—	4	2	2	2
Telithromycin	0.008	—	0.06	0.03	0.06	0.06

表2. LVFX単回経口投与時の体内動態パラメータ

薬剤	投与量 (mg/kg)	C <sub>max</sub> (μg/ml)	t <sub>max</sub> (h)	T <sub>1/2</sub> (h)	AUC (μg·h/ml)	
					0-8h	0-inf.
LVFX	20	2.68	0.25	1.61	5.16	5.38
	60	7.82	0.5	2.32	16.76	18.42
	100	15.02	0.25	2.09	31.38	33.92

DBA/2系、雌性、7週齢マウス (n=4)

表3. LVFXの体内動態パラメータを基に設定したマウス投与量

	用量 (/日)	血中 AUC (μg·h/ml)
ヒト	500 mg×1	47.9 <sup>a)</sup>
マウス	80 mg/kg×2	52.0

<sup>a)</sup>Levaquin (LVFXの米国における商品名)の添付文書より引用

## 2. マウス投与量の設定

LVFXをマウスに経口単回投与後、経時的に測定した血清中薬剤濃度から算出した体内動態パラメータを表2に示した。この体内動態パラメータを基に、LVFX (500 mg×1/日)を経口投与した時のヒト血中AUCと同等の値をマウス血清中で再現させる用量を算出し表3に示した。すなわち、LVFXの投与量は80 mg/kg×2/日と設定した。

## 3. マウス肺炎モデルにおける治療効果

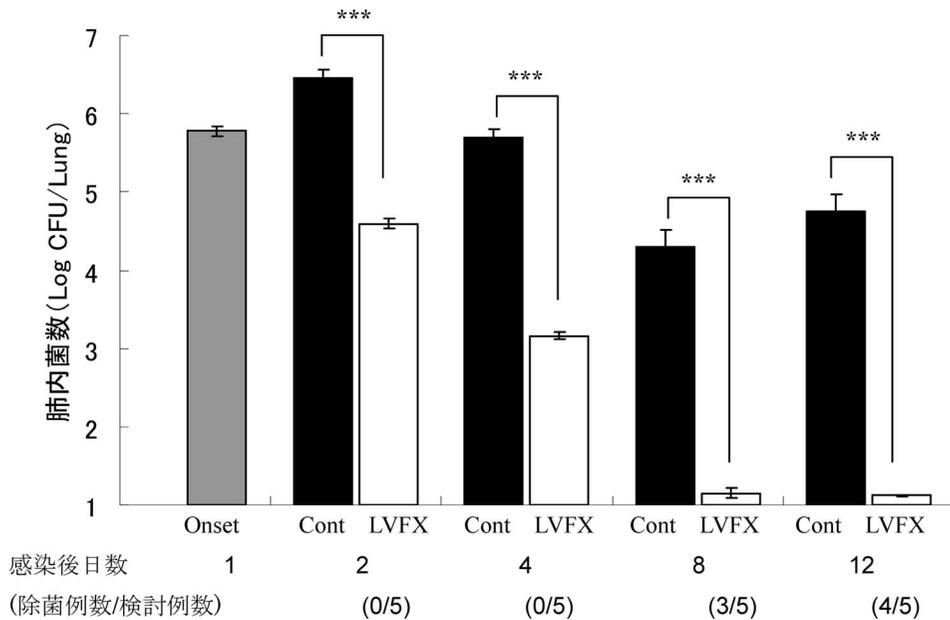
DBA/2系マウスに約10<sup>6</sup> CFUの*L. pneumophila*を鼻接種した感染対照群の肺内菌数は、感染4日後まで10<sup>6</sup> CFU/Lungレベルで維持し、以後緩やかに減少するものの、感染8~12日後においても肺あたり10<sup>5</sup>~10<sup>4</sup> CFUのレベルで推移した。LVFX投与群の肺内菌数を対照群のそれと比較すると、感染2日後で1/10以下、4日後で1/10<sup>2</sup>以下、8および12日後で1/10<sup>3</sup>以下に有意に減少し(P<0.001)、感染8日後では3/5例で、同12日後では4/5例で除菌した。

感染対照群の肺組織では、感染翌日から肺胞壁への好中球を主体とする炎症細胞浸潤、同2日後から肺胞壁の肥厚、さらに同4日後からはマクロファージの浸潤が顕著となるとともに、水腫性変

化を伴う間質性肺炎の像を呈し、その程度は同4日後で最も重度となった。その後病態は徐々に軽減するものの同12日後においても肺炎は中等度に認められた(図2, 3AB)。これに対しLVFX投与群では、感染2日後に中等度の肺炎像を呈するものの、感染対照群で最も重度となる感染4日後で既に肺炎は軽度で、肺胞構造もほぼ正常に近い像を呈し(図2, 3CD)、同8日目以降さらに回復傾向を示した。

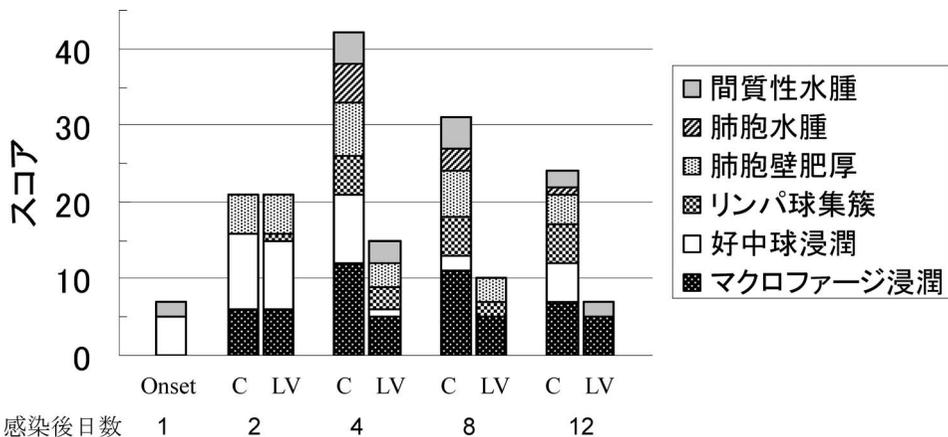
## 考察

*Legionella*肺炎は、死亡率の高さから重篤市中肺炎として位置付けられており、適切な抗菌化学療法が施されなかった場合には、その死亡率は10%から27%へ増悪すると報告されている<sup>15)</sup>。そのため、*Legionella*肺炎の治療には、確実に薬効を示す抗菌薬で早期に治療する必要がある、日本呼吸器学会“成人市中肺炎診療ガイドライン”では、キノロン系抗菌薬やマクロライド系抗菌薬が推奨されている<sup>6)</sup>。本研究においても、臨床分離の*L. pneumophila*に対してキノロン系抗菌薬のLVFX, CPFXおよびPZFXのMIC<sub>90</sub>は0.03 μg/mlであり、キノロン系抗菌薬が本邦における臨床分

図1. *L. pneumophila*肺炎モデルにおけるLVFXの治療効果（肺内菌数）

DBA/2系マウスを用いた *L. pneumophila*肺炎モデルに、LVFX (80 mg/kg×2/日) を感染翌日から連続7日間経口投与した (n=5)。対照群 (Cont) には、調製基材 (0.5%CMC) を薬剤投与群と同様に経口投与した。感染翌日 (Onset) および2, 4, 8, 12日後の肺内菌数を測定し、平均値および標準誤差で表した。

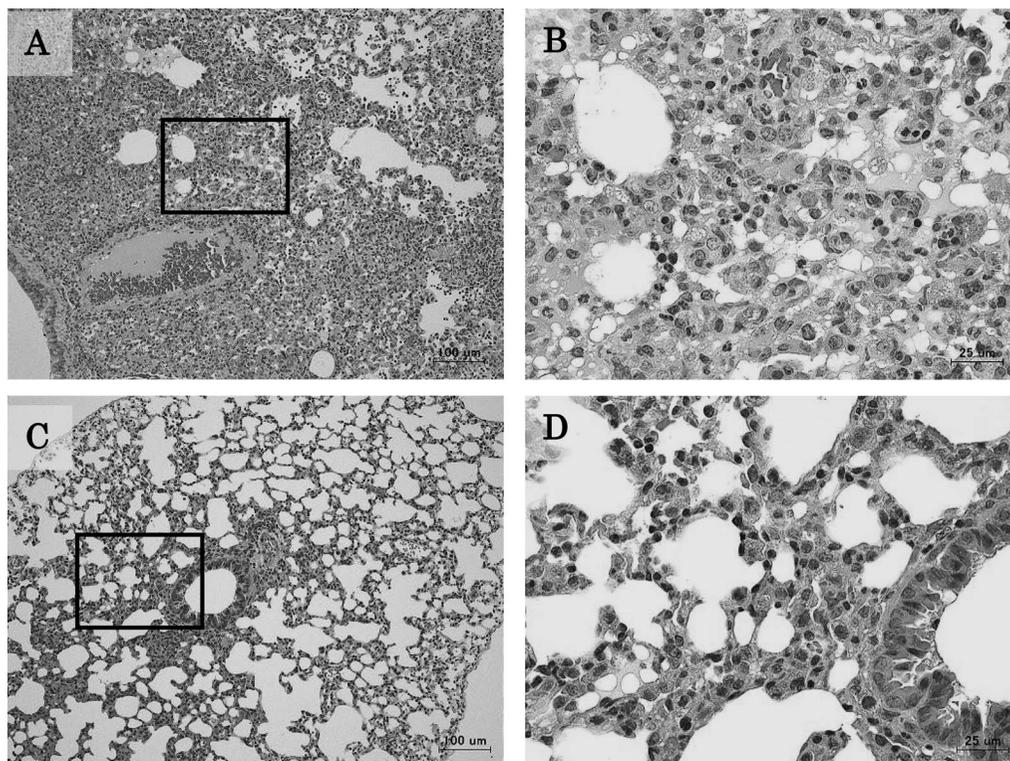
\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

図2. *L. pneumophila*肺炎モデルにおけるLVFXの治療効果（病理所見）

各所見について、軽度を1、中等度を2、重度を3とし、当該グレードの例数との積を合計し所見のスコアとした。各スコアを時点ごとに累積表示した。

C：対照群，LV：LVFX投与群。

図3. *L. pneumophila* 感染4日後のDBA/2NCrj マウス肺の光顕像 (HE 染色)



A : 対照群の肺低倍像, B : A 口部分の高倍像, C : LVFX 投与群の肺低倍像, D : C 口部分の高倍像

離菌に対して良好な抗菌活性を保持していることが確認された。

*Legionella* 属菌は通性細胞内寄生菌であり、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬などの細胞内移行性の低い薬剤では、*in vitro* で認められる抗菌活性を食細胞内に寄生している菌に対しては発現することが出来ない<sup>16)</sup>。このことから、非臨床における抗菌薬の *Legionella* 属菌に対する有効性研究では、実験感染動物の重要性は高いと考えられる。

本研究ではDBA/2系マウスの *L. pneumophila* 肺炎モデルを供試した。本感染モデルは、A/J系マウスの感染モデルに比較し感染初期の急激な肺内菌数の増加は認められないが<sup>12,17)</sup>、より長期に感染14日後まで肺あたり  $10^4 \sim 10^5$  CFU 程度の菌数で推移する遷延型の間質性肺炎病態を呈することが報告されている<sup>18)</sup>。薬力学的に、キノロン薬の

薬効発現にはAUCが関与することが知られていることから<sup>13)</sup>、2009年4月に本邦において新たに承認されたLVFXの新用量・用法である500 mg $\times$ 1日を経口投与した時にヒト血中で達成されるAUCをマウス血清中で再現させる用量を用いて、*Legionella* 肺炎モデルにおける治療効果を検討した。その結果、LVFXを投与したマウスにおいて、治療開始翌日から対照群に比較し有意な肺内菌数の減少が確認された。この早期の治療効果は病理学的にはより顕著であり、病態の進展を感染4日後から阻止することが示され、治療の有用性を示唆するものと考えられた。

LVFXは世界的に広く用いられ、多くの国で注射剤と経口剤の両剤型が用いられており、LVFXによる *Legionella* 肺炎の治療では、注射剤を用いた治療が一般的である。臨床では、LVFX注射剤

はマクロライド系抗菌薬に比較して速やかに薬効を発現し早期退院に寄与することが知られている<sup>8,9)</sup>。本邦で承認されているのは経口剤のみであるが、LVFX 500 mgの静脈内点滴投与時の血漿中AUCが48.3  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ であるのに対し、経口投与時のそれは47.9  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ <sup>14)</sup>と両投与経路間の血中暴露量がほぼ同等であることから、経口投与によっても薬効が期待出来るものと推察される。事実、日本呼吸器学会 成人市中肺炎診療ガイドライン<sup>6)</sup>では、軽症患者に対してはキノロン系やマクロライド系経口抗菌薬による治療も有効とされており、*Legionella*尿中抗原検出キットなどの迅速診断の普及により感染初期の軽症例の発見が可能であることから、経口剤による外来治療も重要な治療オプションとして期待される。今回の成績は、*Legionella*肺炎の治療におけるLVFX 500 mg $\times$ 1/日経口投与の有用性を示唆するものと考えられた。

## 引用文献

- 1) 酒井英明, 赤井畑美津子, 新妻一直, 他: 乳児院におけるレジオネラ症の集団発生例。感染症学雑誌 78: 404~410, 2004
- 2) 中村博幸, 柳生久永, 岸 厚次, 他: レジオネラ肺炎の集団発生事例と臨床症例 1) 集団発生事例 (1) 石岡市の事例。化学療法の領域 20: 588~591, 2004
- 3) 中村博幸, 柳生久永, 岸 厚次, 他: レジオネラ肺炎の集団発生事例と臨床症例 1) 集団発生事例 (2) 静岡県掛川市の温泉レジャー施設の事例。化学療法の領域 20: 592~596, 2004
- 4) 藪内英子, 縣 邦雄: 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生。感染症学雑誌 78: 90~98, 2004
- 5) 布施 (都築) 闊, 館田一博, 山口恵三: 尿中抗原診断: 臨床に与えるインパクト。臨床と微生物 32: 335~340, 2005
- 6) 成人市中肺炎診療ガイドライン, 日本呼吸器学会, 2005
- 7) YU, V. L.; R. N. GREENBERG, N. ZADEIKIS, *et al.*: Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired legionellosis. Chest. 125: 2135~2139, 2004
- 8) MYKIETIUK, A.; J. CARRATALÀ, N. FERNÁNDEZ-SABÉ, *et al.*: Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella* pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. Clin. Infect. Dis. 40: 794~799, 2005
- 9) BLÁZQUEZ GARRIDO, R. M.; F. J. ESPINOSA PARRA, L. ALEMANY FRANCÉS, *et al.*: Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: levofloxacin versus macrolides. Clin. Infect. Dis. 40: 800~806, 2005
- 10) BENIN, A. L.; R. F. BENSON & R. E. BESSER: Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clin. Infect. Dis. 35: 1039~1046, 2002
- 11) SAWATARI, K.; N. ITOH, M. NAGASAWA, *et al.*: New susceptibility testing medium (B-SYE agar) for *Legionella* and *Legionella*-like organisms. Chemother. 32: 718~723, 1984
- 12) TATEDA, K.; T. A. MOORE, M. W. NEWSTEAD, *et al.*: Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella* pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. Infect. Immun. 69: 2017~2124, 2001
- 13) CRAIG, W. A.: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin. Infect. Dis. 26: 1~12, 1998
- 14) Package insert of Levaquin, Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc. 2004
- 15) FALCO, V.; T. FERNANDEZ de SEVILLA, J. ALEGRE, *et al.*: *Legionella pneumophila*. A cause of severe community-acquired pneumonia. Chest. 100: 1007~1011, 1991
- 16) HIGA, F.; N. ARAKAKI, M. TATEYAMA, *et al.*: *In vitro* and *in vivo* activity of olamufloxacin (HSR-903) against *Legionella* spp. J. Antimicrob. Chemother. 52: 920~924, 2003
- 17) BRIELAND, J.; P. FREEMAN, R. KUNKEL, *et al.*: Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legion-

- naires' disease. Am. J. Pathol. 145: 1537~1546, 1994
- 18) 檜本佳典, 黒坂勇一, 菊部幸江, 他: *Legionella pneumophila* による DBA/2 系マウス肺炎モデル。Jpn. J. Antibiotics 62: 445~451, 2009

---

## Therapeutic efficacy of levofloxacin against a model of replicable *Legionella pneumophila* lung infection in DBA/2 mice

YOSHINORI KASHIMOTO<sup>1</sup>), YUICHI KUROSAKA<sup>1</sup>), YUKIE KARIBE<sup>1</sup>),  
SAORI UOYAMA<sup>1</sup>), KATSUKO FUJIKAWA<sup>1</sup>), KENJI NAMBA<sup>2</sup>), TSUYOSHI OTANI<sup>1</sup>)  
and KEIZO YAMAGUCHI<sup>3</sup>)

<sup>1</sup>) Daiichi Sankyo Co. Ltd., Biological Research Laboratories IV

<sup>2</sup>) Daiichi Sankyo Pharma Development, USA

<sup>3</sup>) Department of Microbiology and Infectious Disease,  
Toho University School of Medicine

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of levofloxacin (LVFX), a quinolone antibacterial, against clinically isolated *Legionella pneumophila* were investigated in comparison with those of existing antimicrobial agents approved for legionnaires disease.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the agents against 42 strains of *L. pneumophila* isolated in Japan were determined using agar dilution methods with buffered starch yeast extract agar. MIC<sub>90</sub> of LVFX was 0.03 µg/ml and this activity was similar to ciprofloxacin and pazufloxacin, and higher than telithromycin and minocycline.

Therapeutic efficacy of LVFX was studied against a pneumonia model induced by intranasal of *L. pneumophila* strain suzuki serogroup 1 in DBA/2 mice. Therapeutic doses in mice were selected that would closely match human exposure profile, area under the concentration-time curve (AUC) for a human oral dose of LVFX at 500 mg once a day. LVFX decreased significantly the bacterial burden in the lungs from the next day of commencing treatment.

These results, including *in vitro* antibacterial activity against clinical isolates and therapeutic efficacy of a humanized dosing regimen, provide good evidence to support the use of LVFX at 500 mg once a day for treating patient with legionnaires disease.