

NY-198の細菌学的評価

廣瀬 徹・三橋 進

エビゾーム研究所

井上松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

NY-198はキノリン骨格の7位側鎖である piperazine 基の3位に C-methyl 基を, 6, 8位にそれぞれフッ素原子を導入した新ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤である。NY-198の抗菌活性を ofloxacin (OFLX), norfloxacin (NFLX) および pipemidic acid (PPA) を対照薬として比較検討し, 以下の結果を得た。

1. NY-198はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し, OFLX, NFLX と同様に幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性を有していた。
2. NY-198は, methicillin耐性 *Staphylococcus aureus*, nalidixic acid耐性 *Enterobacteriaceae*, gentamicin耐性 *Pseudomonas aeruginosa* および ampicillin耐性 *Haemophilus influenzae* に対しても, 交叉耐性を示さず優れた活性を示した。
3. NY-198の抗菌作用は殺菌的であった。
4. ウマ血清の添加, 培地の pH の変化, 培地の種類および接種菌量の変化により, NY-198の MIC 値は大きく変化しなかった。
5. NY-198 に対する自然耐性菌出現頻度は, OFLX および NFLX と同様に低率であった。
6. NY-198 は, *Escherichia coli* KL-16株 DNA gyrase の DNA スーパーコイル活性を強く阻害した。
7. グラム陽性菌およびグラム陰性菌を用いたマウス感染防御実験において, NY-198は経口投与で有効であり, その *in vivo* 効果は一般に NFLX および PPA より有意に優れ, OFLX とほぼ同等あるいはやや優れた感染防御効果を示した。

NY-198 [(±)1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid hydrochloride] は, 北陸製薬株式会社において合成された新ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤である。NY-198はキノリン骨格の6, 8位にそれぞれフッ素原子を, 7位の piperazine 基の3位に C-methyl 基を有している (Fig.1)。

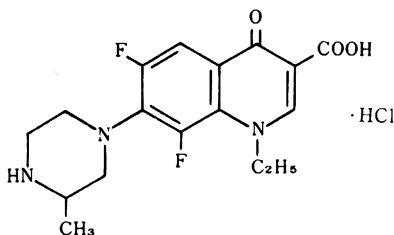


Fig. 1. Chemical structure of NY-198

今回, NY-198の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性を ofloxacin (OFLX)¹⁾, norfloxacin (NFLX)²⁾ および pipemidic acid (PPA)³⁾ と比較したので報告する。

I 実験材料および方法

1. 試験薬剤

NY-198は北陸製薬, OFLX および nalidixic acid (NA)は第一製薬, NFLX は杏林製薬, PPAは大日本製薬, gentamicin (GM) は塩野義製薬, ampicillin (ABPC) は明治製薬, methicillin (DMPPC) は萬有製薬からそれぞれ分与をうけた。

2. 使用菌株

標準菌株および各種臨床分離菌株は, 群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設の保存株を用いた。

3. 使用培地

感受性測定には、特に記載しない限り sensitivity disk agar (SDA, 日水製薬) および sensitivity test broth (STB, 日水製薬) を使用した。 *Pseudomonas aeruginosa* には前培養の際、STBに代えて0.4% KNO₃含有STBを用いた。 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* および *Enterococcus faecalis* の感受性測定には、brain heart infusion broth (BHIB, Difco) および10%ウマ脱繊維血液(日本生物材料センター)を添加したSDAを使用した。 *Legionella* sp.には penassay broth 17.5g/l, yeast extract 2g/l, 活性炭2g/l, L-cystein hydrochloride 80mg/l, ピロリン酸第二鉄0.2g/lを含む寒天培地を使用し、判定を3日後とした。 *Haemophilus influenzae* では hemin および β -nicotinamide adenine nucleotide (β -NAD, Sigma) をそれぞれ10 μ g/ml, 2 μ g/ml含有したBHIB およびこれに寒天を加えたBHIAを用いた。また、 *Neisseria gonorrhoeae* には GC agar (Difco) に1% hemoglobin および1% Iso Vitale X (Beckton Dickinson) を加えた培地を使用した。嫌気性菌の培地には、GAM broth (日水製薬) および GAM agar (日水製薬) を用いた。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

日本化学療法学会標準法^{4,5)}に準じて、寒天平板希釈法でMICを測定した。STBで37°C, 18時間培養した菌液を、約10⁸CFU/ml (嫌気性菌については約10⁶CFU/ml) となるよう buffered saline gelatin (BSG) で希釈した。この希釈菌液の約5 μ lをマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて薬剤含有寒天平板に接種し、37°C, 18時間培養後、被験菌の発育が認められない最小濃度をもってMICとした。ただし、 *S. pneumoniae* および *N. gonorrhoeae* については、前培養に液体培地を用いず、寒天平板より菌を直接かきとり、菌液を調製した。

5. 殺菌作用

1) 最小殺菌濃度 (MBC) の測定

試験菌には、化学療法学会設定の標準菌株を用いた。STBで37°C, 18時間培養した被験菌液を約10⁸CFU/mlとなるよう希釈し、種々の濃度の薬剤を含むSTB培地に接種した。37°Cで18時間培養後、肉眼で濁度の有無を観察し、濁度が認められない最小の薬剤濃度をMICとした。さらに、MIC以上の薬剤濃度の試験管から薬剤を含まないSDA平板上に菌液を5 μ lずつマイクロプランターを用いて接種し、37°Cで18時間培養後、生育菌の有無を判定し、生育菌がみられない最小薬剤濃度をもってMBCとした。

2) 増殖曲線におよぼす影響

被験菌をSTBで、37°C, 18時間培養後、約10⁸CFU/

mlとなるよう新鮮なSTB培地に接種し振とう培養を行った。培養開始から2時間後に薬剤を添加し、経時的にサンプリングし生菌数を測定した。

6. 諸因子の最小発育阻止濃度 (MIC) に及ぼす影響
馬血清の添加, 培地 pH の変化, 培地の種類および接種菌量の MIC 値に及ぼす影響は、寒天平板希釈法により調べた。

7. 自然耐性菌出現頻度

STBで37°C, 18時間培養した試験菌液を、8 MIC濃度の薬剤を添加したSDAプレートに塗抹し、37°C, 18時間培養後に生じたコロニー数を計数した。

8. 大腸菌のDNA gyraseのスーパーコイル活性の阻害作用

当研究所の佐藤らの方法⁶⁻⁸⁾に従ってNY-198の阻害作用を調べた。

1) DNA gyraseの精製

DNA gyraseは *Escherichia coli* KL-16株より精製した。菌を振とう培養しOD₅₄₀ 1.0で集菌した湿菌体と同量のTGED buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol (DTT, Sigma), 10% (w/v) glycerol) で菌体を浮遊させ、20mg/ml lysozyme (Sigma) で溶菌後、遠心により上清を得た。次に硫酸ストレプトマイシンによる除核酸、42%飽和硫酸による分画を行い、DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) によるカラムクロマトグラフィーおよびEpoxy-activated Sepharose CL-6B (Pharmacia) にノボピオシンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより、DNA gyraseを精製した。

2) スーパーコイル活性の阻害

基質としてプラスミドpBR322 DNAを用いた。菌体から抽出したcovalently closed circular (ccc) pBR322 DNAをウシ胸線由来のtopoisomerase I (BRL) により開いた環状型 (relaxed) DNAに変換し、基質として使用した。DNA gyraseは数mMのATP存在下でrelaxed DNAをccc DNAに変換する活性(スーパーコイル活性)を有している⁹⁾。今回、relaxed pBR322 DNAに、25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 2 mM spermidine (Sigma), 3 mM ATP, 1 mM DTT および2.5 μ g/ml *E. coli* t-RNAを添加し反応液とした。次に酵素(gyrase)液5 μ lおよび薬剤液5 μ lを混和し、4°C, 30分間放置した。ここに反応液10 μ lを加え、37°C, 1時間反応させた。反応後、0.8%アガロースゲル電気泳動によりccc DNAとrelaxed DNAを分離し、エチジウムブロマイド染色を行ない、デンシトメーターによりそれぞれのDNAを定量した。種々の薬剤濃度におけるスーパーコイル活性の阻害効果を調べ、50%阻害濃度

(ID₅₀) を決定した。

9. マウス感染防御効果

ICR 系雄マウス (体重: 18~21g) を、一群10匹使用した。被験菌には、*Staphylococcus aureus* Smith, *E. coli* ML4707, *Klebsiella pneumoniae* GN6445, *Proteus mirabilis* GN4754, *Serratia marcescens* GN7577 および *P. aeruginosa* GN11189 を用いた。

各被験菌は、BHIB で37°C、一晚培養した後、*E. coli* ML 4707 および *K. pneumoniae* GN 6445 は BHIB に、他の菌は 4% mucin (Difco) を含む BHIB に懸濁させ、マウス腹腔内に 0.2ml ずつ接種し、感染を惹起した。感染菌量は、各々 *S. aureus* Smith: 2.2×10^7 CFU/マウス, *E. coli* ML4707: 6.0×10^7 CFU/マウス, *K. pneumoniae* GN6445: 3.4×10^7 CFU/マウス, *P. mirabilis* GN 4754: 7.8×10^6 CFU/マウス, *S. marcescens* GN 7577: 1.0×10^6 CFU/マウス および *P. aeruginosa* GN11189: 6.4×10^6 CFU/マウス で約 60~1300 × LD₅₀

であった。薬剤は 0.5% carboxymethyl cellulose (和光純薬) に懸濁し、感染直後に一回経口投与を行なった。感染後五日目のマウスの生存率から、probit 法¹⁰⁾ により ED₅₀ および 95% 信頼限界を算出した。

II 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

NY-198 の標準菌株に対する抗菌力を、OFLX, NFLX, PPA および NA を対照薬剤として比較検討し Table 1 に示した。

Micrococcus luteus を除くグラム陽性菌 *S. aureus*, *S. pyogenes* および *Bacillus subtilis* に対して、NY-198 は 0.2~3.13 μg/ml の MIC 値を示し、その抗菌力は OFLX 0.1~0.78 μg/ml および NFLX 0.2~3.13 μg/ml と OFLX にはやや劣るものの NFLX と同程度で、PPA 6.25~>100 μg/ml よりもはるかに強い活性であった。

Table 1. Antibacterial activity of NY-198 against standard strains of bacteria

Organism	MIC* (μg/ml)			
	NY-198	OFLX	NFLX	PPA
<i>S. aureus</i> FDA209P JC-1	0.78	0.39	0.39	12.5
<i>S. aureus</i> Terajima	0.78	0.39	0.78	50
<i>S. pyogenes</i> Cook	3.13	0.78	3.13	>100
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	0.20	0.10	0.20	6.25
<i>M. luteus</i> ATCC9341	12.5	3.13	25	>100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.20	0.10	0.10	1.56
<i>E. coli</i> K12 C600	0.20	0.10	0.10	3.13
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.10	0.05	0.05	1.56
<i>S. typhimurium</i> IID971	0.20	0.10	0.10	1.56
<i>S. typhi</i> 901	0.10	0.05	0.05	1.56
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.05	0.025	0.025	0.78
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.20	0.10	0.10	1.56
<i>S. enteritidis</i> G14	0.05	0.025	0.025	0.78
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	0.39	0.20	0.20	3.13
<i>E. cloacae</i> 963	0.39	0.20	0.20	1.56
<i>P. mirabilis</i> IFO3849	0.39	0.39	0.20	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.05	0.05	0.05	1.56
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.05	0.0125	0.025	1.56
<i>P. rettgeri</i> IFO3850	0.39	0.39	0.10	3.13
<i>M. morgani</i> IFO3848	0.10	0.10	0.05	1.56
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0.39	0.39	0.20	1.56
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	1.56	1.56	1.56	12.5
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	0.78	0.78	1.56	6.25
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	1.56	1.56	0.78	12.5

* By the agar-dilution method (inoculum: 10⁶ CFU/ml)

グラム陰性菌について、種々の *Enterobacteriaceae* に対する NY-198 の MIC 値は $0.05 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ を示し、OFLX $0.0125 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ および NFLX $0.025 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ とほぼ同程度の抗菌活性を示した。この抗菌活性は、PPA $0.78 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ より強かった。また *P. aeruginosa* に対し、NY-198 は $0.78 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し、優れた抗菌活性を有していた。

以上のように、NY-198 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し、広域の抗菌スペクトラムと強い抗菌活性を示した。

2. 臨床分離菌株に対する抗菌力

近年臨床材料より分離された新鮮株を用い、NY-198 の抗菌力を検討した。

S. aureus 161 株の感受性ピークは NY-198 では $0.78 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ に見られ、 $3.13 \mu\text{g/ml}$ で全ての菌株の発育を阻じた (Fig. 2)。OFLX、NFLX および PPA は、それぞれ 0.39 、 1.56 および $50 \mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークを示した。

DMPPC 耐性 *S. aureus* (MRSA) 44 株に対し、NY-198 の MIC₅₀ は $0.78 \mu\text{g/ml}$ を示し、OFLX より劣るものの NFLX よりやや優れた抗菌活性を有していた (Fig. 3)。

同様に *Staphylococcus epidermidis* 107 株に対しても、

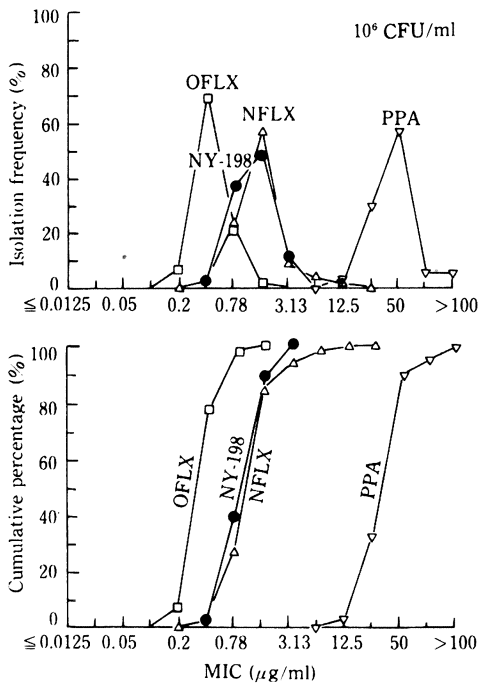


Fig. 2. Antibacterial activity of NY-198 against *S. aureus* (161 strains)

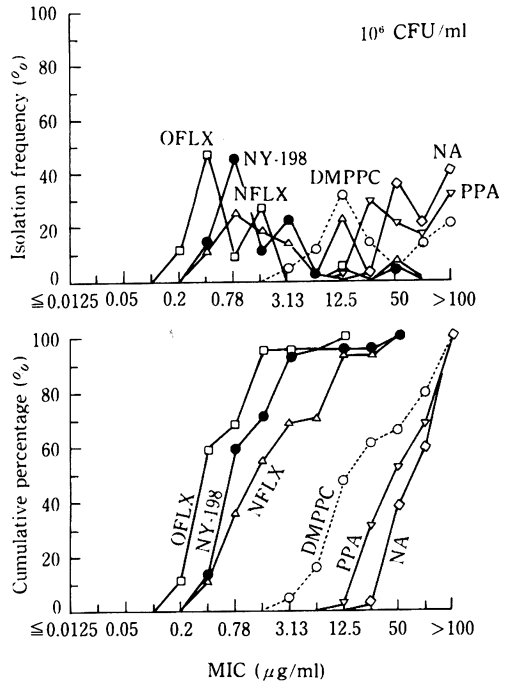


Fig. 3. Antibacterial activity of NY-198 against MRSA (44 strains)

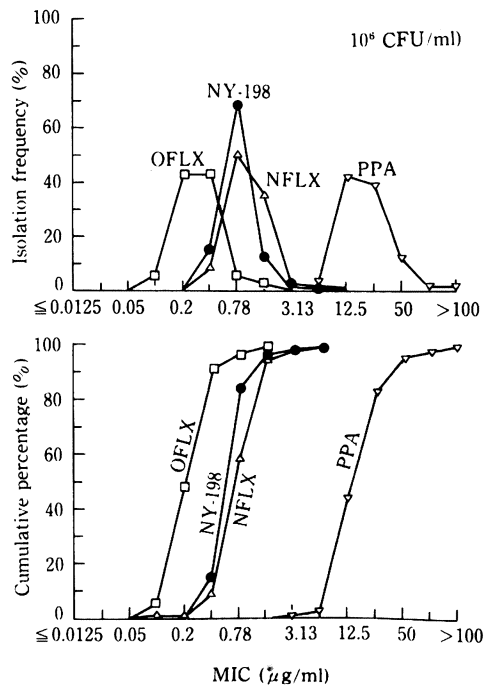


Fig. 4. Antibacterial activity of NY-198 against *S. epidermidis* (107 strains)

NY-198は0.78 $\mu\text{g/ml}$ にMIC値のピークを示し、6.25 $\mu\text{g/ml}$ で完全に発育を阻止した (Fig. 4)。このときのOFLX, NFLXおよびPPAのMIC値のピークは、それぞれ0.39, 0.78, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ を示した。

S. pyogenes 92株では、NY-198は3.13 $\mu\text{g/ml}$ にMIC値のピークを示し、OFLX, NFLX, PPAおよびNAのMIC値のピークはそれぞれ0.78, 1.56, >100, >100 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 5)。

S. pneumoniae 24株に対して、NY-198は6.25 $\mu\text{g/ml}$ で90%以上の菌株の発育を阻止した (Fig. 6)。OFLX, NFLX, PPAおよびNAのMIC値のピークは、それぞれ3.13, 12.5, >100, >100 $\mu\text{g/ml}$ であった。

E. faecalis 54株におけるNY-198のMIC値のピークは、OFLXおよびNFLXの3.13, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と同等の6.25 $\mu\text{g/ml}$ を示した (Fig. 7)。このときPPAおよびNAのMIC値のピークはいずれも100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。

一方、NY-198はグラム陰性菌群に対しても強い抗菌活性を示した。

E. coli 93株に対しNY-198は、OFLXおよびNFLXの0.1 $\mu\text{g/ml}$ の2倍である0.2 $\mu\text{g/ml}$ にMIC値のピークを示した (Fig. 8) が、中にはMIC1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$ を示す菌も存在した。PPAおよびNAは、それぞれ

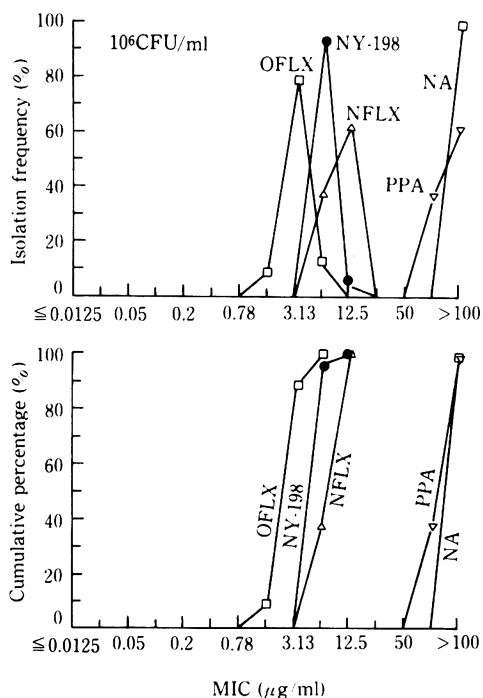


Fig. 6. Antibacterial activity of NY-198 against *S. pneumoniae* (24 strains)

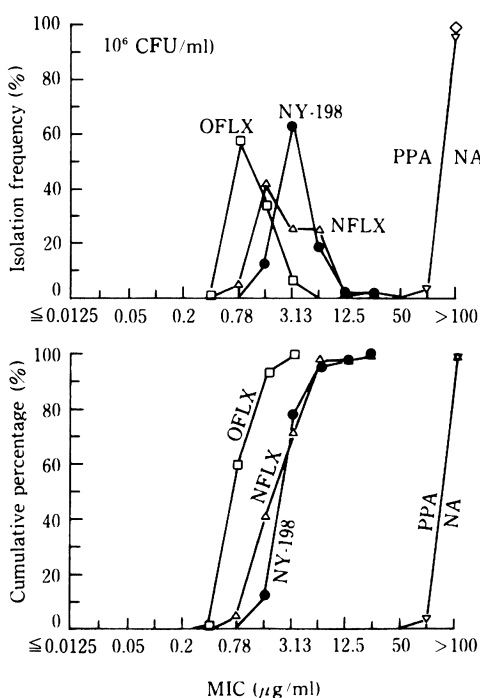


Fig. 5. Antibacterial activity of NY-198 against *S. pyogenes* (92 strains)

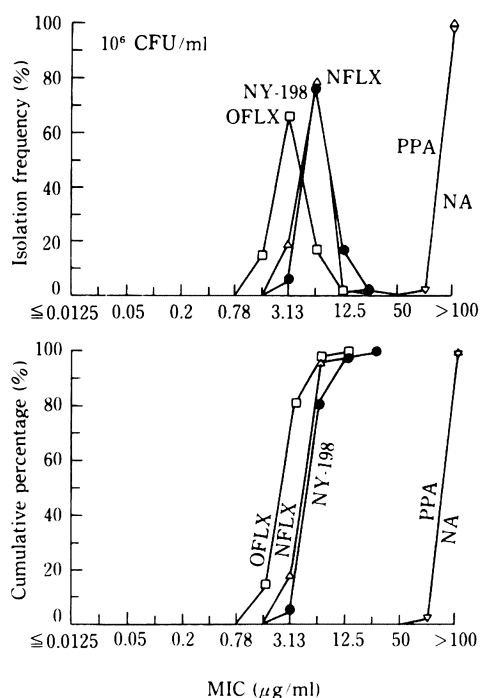


Fig. 7. Antibacterial activity of NY-198 against *E. faecalis* (54 strains)

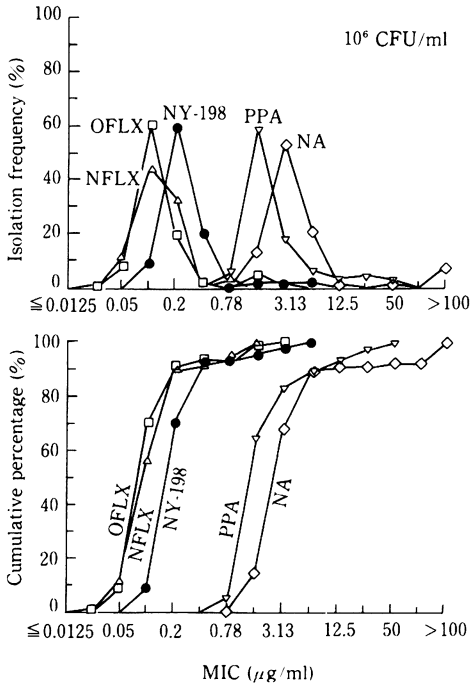


Fig. 8. Antibacterial activity of NY-198 against *E. coli* (93 strains)

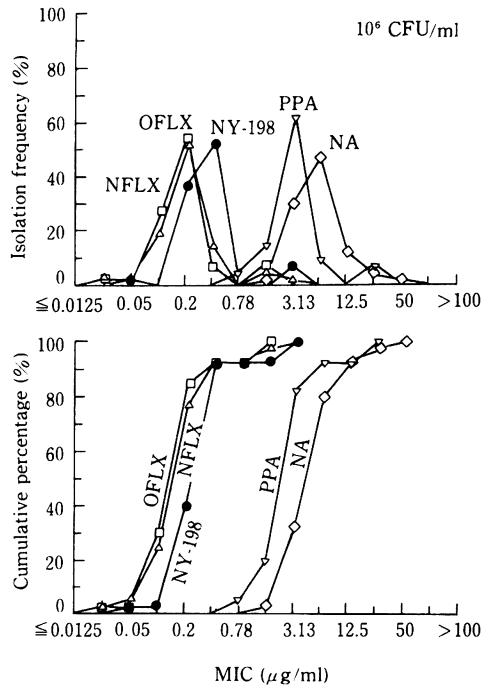


Fig. 9. Antibacterial activity of NY-198 against *K. pneumoniae* (40 strains)

1.56, 3.13 μg/mlに MIC 値のピークを示した。

K. pneumoniae 40株に対してNY-198は、MIC値が0.39 μg/mlにピークを示したが、OFLXおよびNFLXは0.2 μg/mlにMIC値のピークが認められた。NY-198は、PPAおよびNAの約32倍強い活性を示した (Fig. 9)。

Klebsiella oxytoca 56株も同様に、NY-198のMIC値のピークは0.2 μg/mlに見られOFLX, NFLX, PPAおよびNAのMIC値のピークは、それぞれ0.1, 0.1, 1.56, 3.13 μg/mlであった (Fig. 10)。

Citrobacter freundii 76株の感受性分布では、NY-198は0.39 μg/mlに主峰を有する幅広いMIC値分布を示し、0.39 μg/mlで63%、12.5 μg/mlで100%の菌株の増殖を阻止した (Fig. 11)。OFLX, NFLX, PPAおよびNAについても同様の傾向がみられた。

Shigella spp. 107株について、NY-198は0.39 μg/mlに鋭いMIC値のピークを示し、この濃度で約95%の菌株の増殖を阻止した (Fig. 12)。このとき、PPAおよびNAのMIC値のピークは1.56 μg/mlであった。

Salmonella spp. 107株に対してNY-198は0.39 μg/mlに鋭いピークがみられ、0.78 μg/mlで全株の増殖を阻止した (Fig. 13)。このときOFLX, NFLX, PPAおよびNAのMIC値のピークは、それぞれ0.2, 0.1, 3.13, 6.25 μg/mlであった。

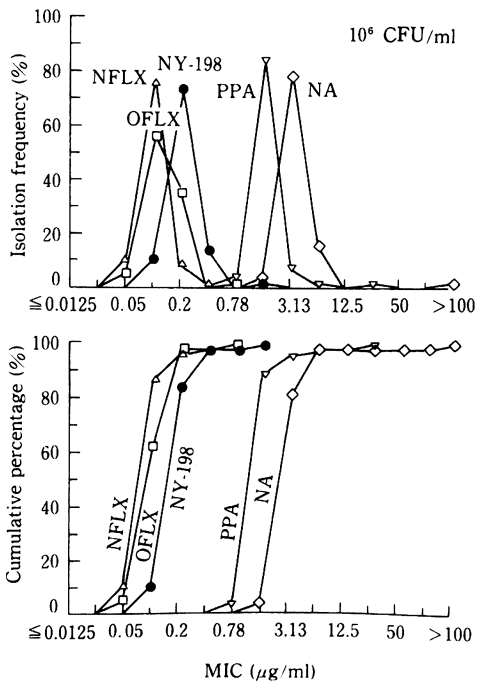


Fig. 10. Antibacterial activity of NY-198 against *K. oxytoca* (56 strains)

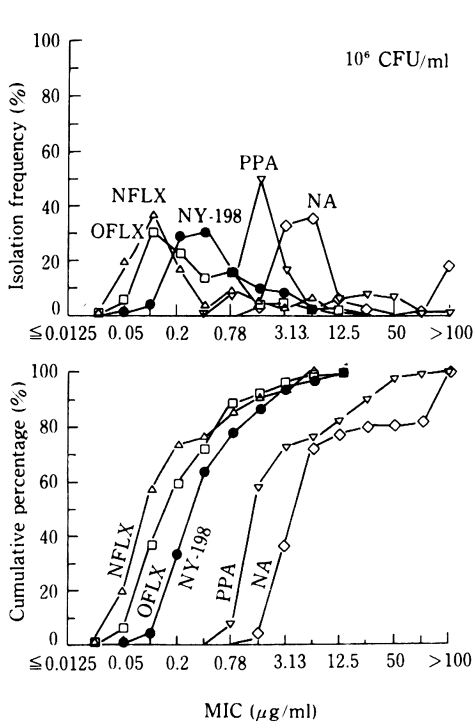


Fig. 11. Antibacterial activity of NY-198 against *C. freundii* (76 strains)

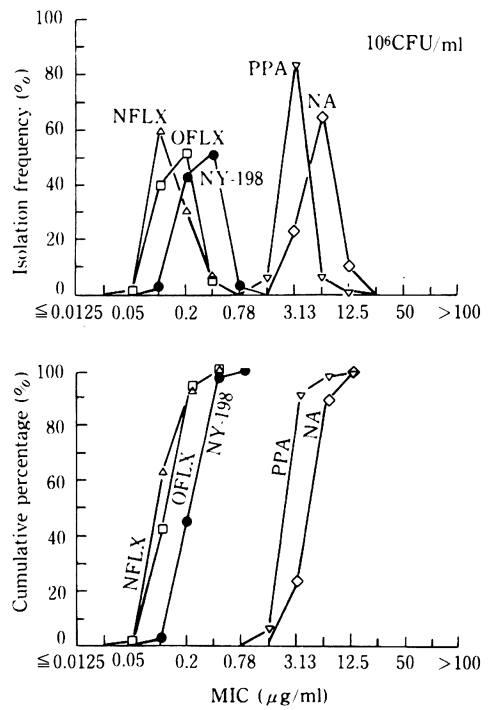


Fig. 13. Antibacterial activity of NY-198 against *Salmonella* spp. (107 strains)

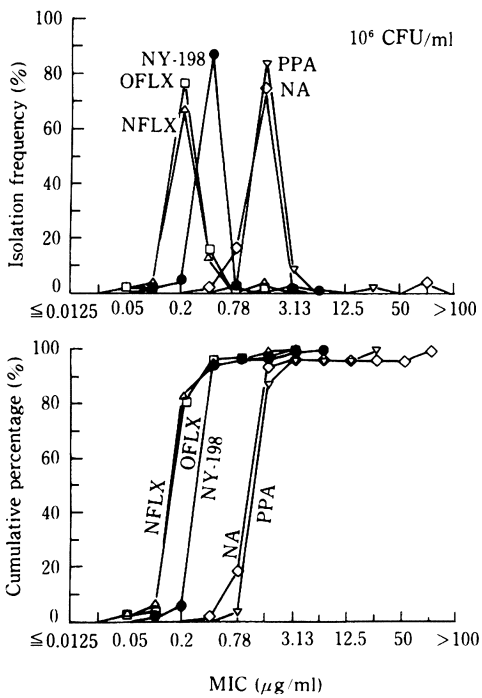


Fig. 12. Antibacterial activity of NY-198 against *Shigella* spp. (107 strains)

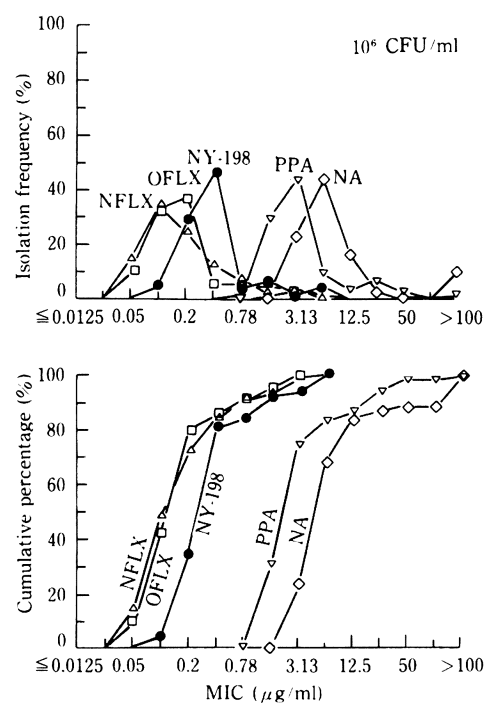


Fig. 14. Antibacterial activity of NY-198 against *E. cloacae* (100 strains)

Enterobacter cloacae 100株における感受性分布では、 $0.39\mu\text{g/ml}$ に NY-198の感受性ピークがみられ、OFLX および NFLX の0.2, $0.1\mu\text{g/ml}$ より劣り、PPA, NA の3.13, $6.25\mu\text{g/ml}$ より強い抗菌活性を示した (Fig. 14)。

P. mirabilis 99株では、NY-198は $0.39\sim 0.78\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークを示した (Fig. 15)。

Proteus vulgaris 79株および *Morganella morganii* 50株における NY-198の MIC 値のピークはいずれも $0.2\mu\text{g/ml}$ と強い抗菌活性を示した (Fig. 16, 17)。

Proteus inconstans 88株に対し、NY-198は OFLX と同等の $0.39\sim 0.78\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークがみられたが、NFLX の MIC 値のピークは $0.1\sim 1.56\mu\text{g/ml}$ に 広く分布していた (Fig. 18)。

S. marcescens 100株は、NA に対して MIC 値 $100\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示す菌株が約40%存在し、他菌種とは異なる感受性分布を示した (Fig. 19)。NY-198は OFLX および NFLX と同等の抗菌活性を示し、 $0.39\mu\text{g/ml}$ と $6.25\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークがみられた。NY-198の MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ $0.78\mu\text{g/ml}$, $12.5\mu\text{g/ml}$ と比較的広い感受性分布であり、PPA および NA と比較して 8~32倍の抗菌活性を有していた。

これら臨床分離菌株中の *E. coli* 8株, *K. pneumoniae*

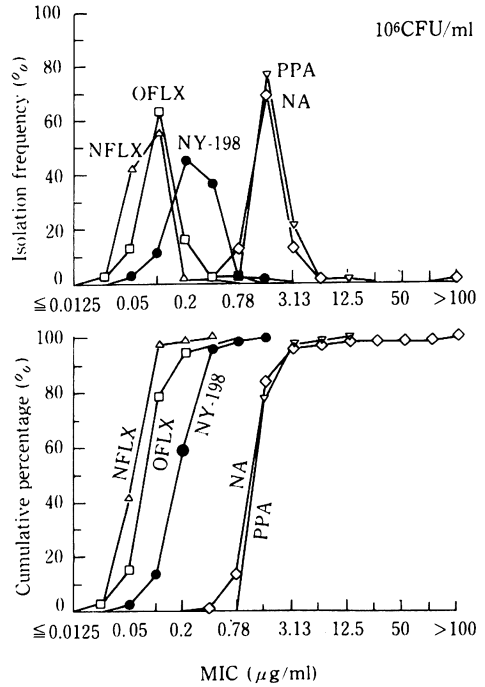


Fig. 16. Antibacterial activity of NY-198 against *P. vulgaris* (99 strains)

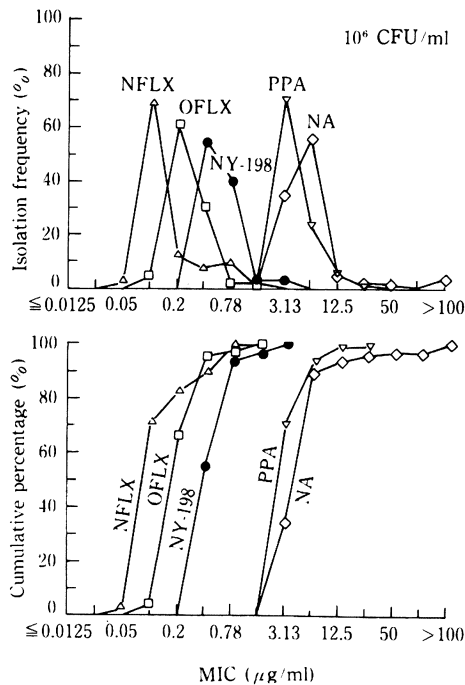


Fig. 15. Antibacterial activity of NY-198 against *P. mirabilis* (99 strains)

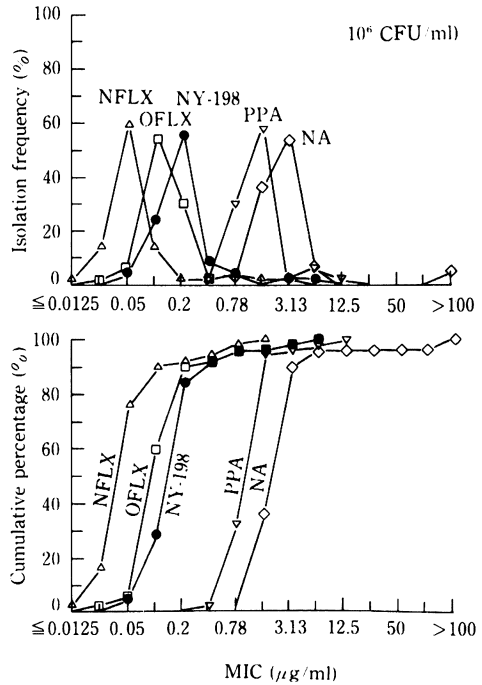


Fig. 17. Antibacterial activity of NY-198 against *M. morganii* (50 strains)

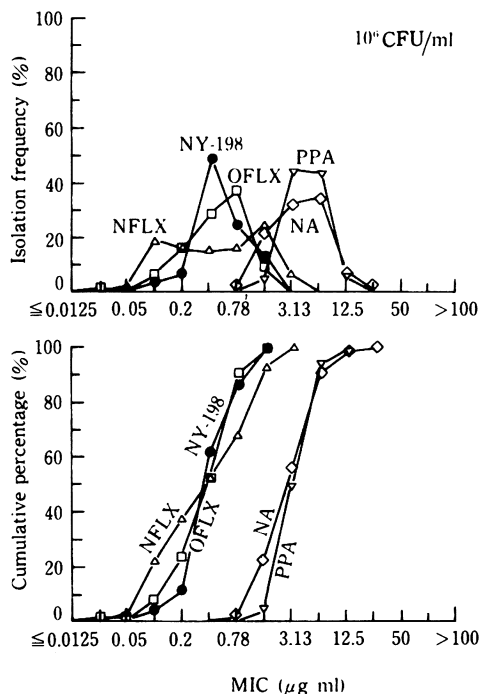


Fig. 18. Antibacterial activity of NY-198 against *P. inconstans* (88 strains)

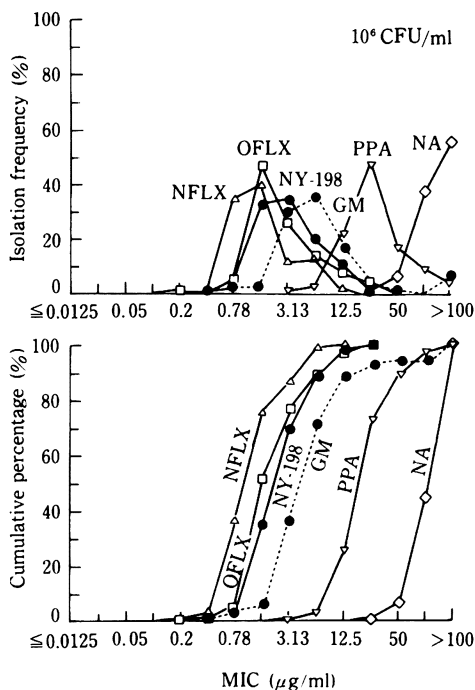


Fig. 20. Antibacterial activity of NY-198 against *P. aeruginosa* (99 strains)

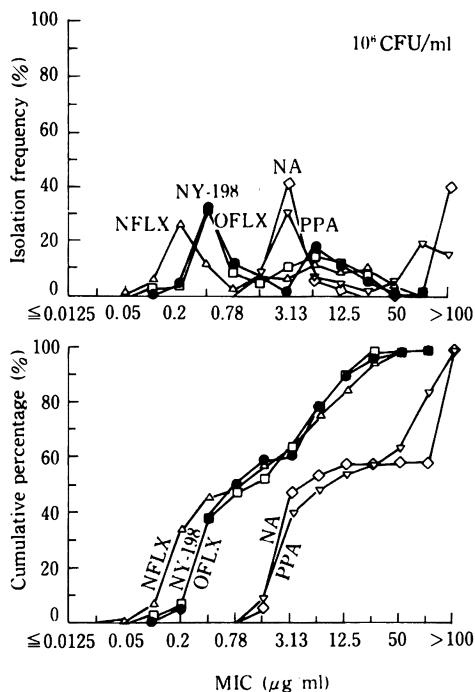


Fig. 19. Antibacterial activity of NY-198 against *S. marcescens* (100 strains)

3株, *Sigella* spp. 4株, *C. freundii* 17株, *P. mirabilis* 6株, *P. vulgaris* 1株, *M. morgani* 2株, *S. marcescens* 42株を含むNA耐性腸内細菌群 (NAのMIC >12.5μg/ml) に対しても, NY-198は抗菌活性を有していた。

P. aeruginosa 99株に対して, NY-198は3.13μg/mlにMIC値のピークを示し, この濃度で約80%の菌株の発育を阻止した (Fig.20)。NFLXはOFLXおよびNY-198と同等かやや強い活性を示した。さらに, GM耐性菌に対する本剤のMICのピーク値は6.25μg/mlで, GM感受性菌に比べ2倍程度と劣るものの, GMに比べはるかに強い抗菌力を示した (Fig. 21)。

Pseudomonas cepacia 51株では, NY-198, OFLXおよびNFLXは25μg/mlに, NAは50μg/mlに鋭いMIC値のピークを示したが他の菌種に比べMICは劣っていた (Fig. 22)。なお, 約50%の菌株がPPAに対して100μg/ml以上のMIC値を示した。

Xanthomonas maltophilia 50株の感受性分布ではNY-198は12.5μg/mlにMIC値のピークを示し, OFLXと同等の抗菌力を有していたが, NFLX感受性分布はNAのそれとほぼ同等で, NY-198の約1/4~1/8の抗菌力であった (Fig. 23)。

Acinetobacter calcoaceticus 49株に対して, NY-198はOFLXと同様に0.39μg/mlにMIC値のピークを示

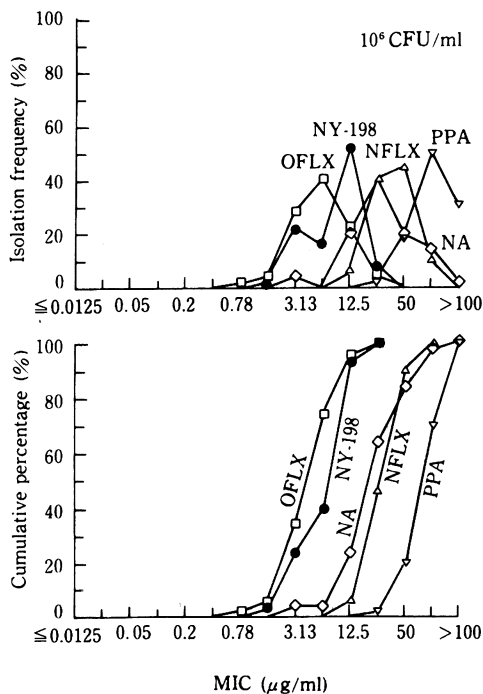
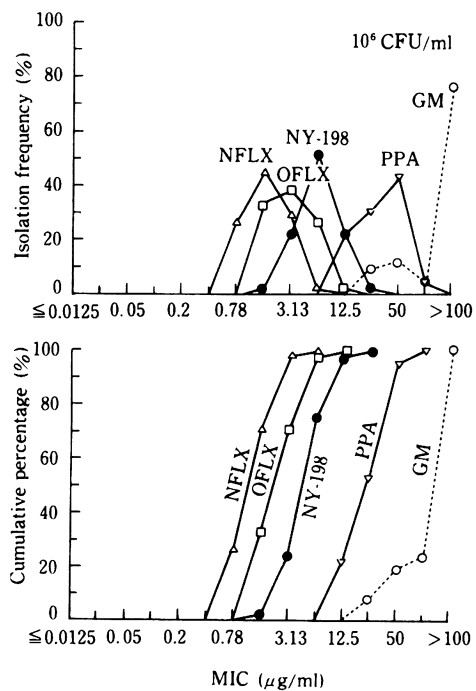


Fig. 21. Antibacterial activity of NY-198 against GM-resistant *P. aeruginosa* (45 strains)

Fig. 23. Antibacterial activity of NY-198 against *X. maltophilia* (50 strains)

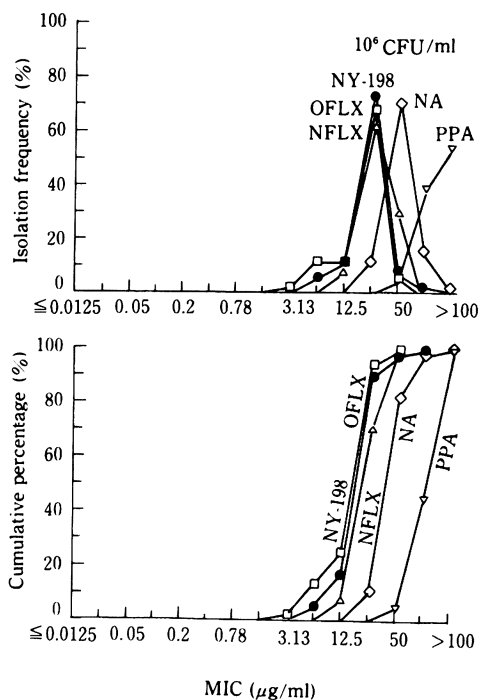


Fig. 22. Antibacterial activity of NY-198 against *P. cepacia* (51 strains)

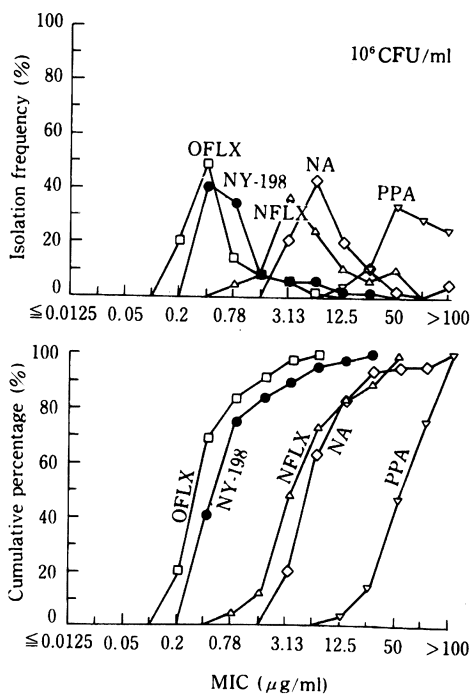


Fig. 24. Antibacterial activity of NY-198 against *A. calcoaceticus* (49 strains)

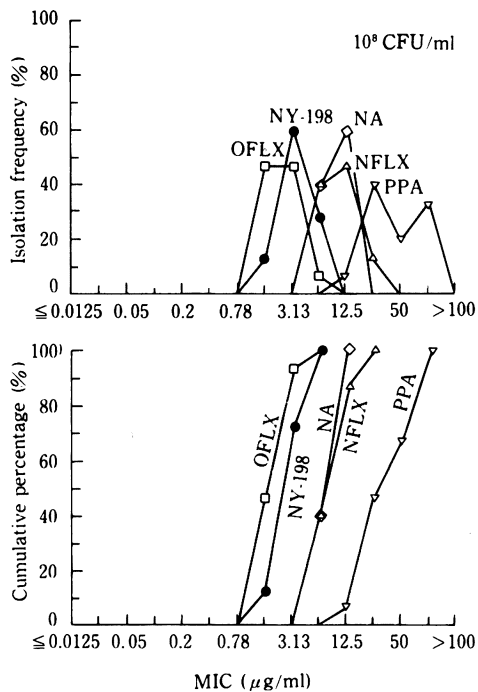


Fig. 25. Antibacterial activity of NY-198 against *Legionella* spp. (15 strains)

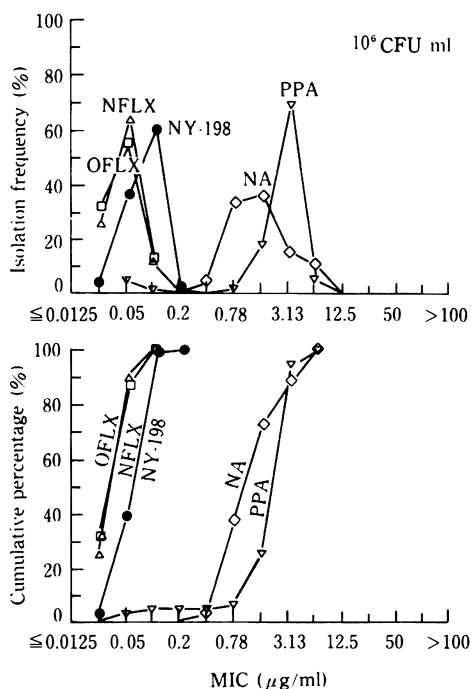


Fig. 26. Antibacterial activity of NY-198 against *H. influenzae* (72 strains)

し、以下 NFLX 3.13 $\mu\text{g/ml}$, NA 6.25 $\mu\text{g/ml}$, PPA 50 $\mu\text{g/ml}$ の順に MIC 値のピークを示した (Fig. 24)。

近年レジオネラ症の起原菌として注目されている *Legionella* spp. 15株について NY-198は3.13 $\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークがみられ、OFLX (1.56 $\mu\text{g/ml}$)に近い抗菌力を示した (Fig. 25)。NAはNFLXと同じく6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークを示した。

H. influenzae 72株の場合、NY-198は0.1 $\mu\text{g/ml}$ にシャープな MIC 値のピークを示し、この濃度でほとんどの菌株の増殖を阻止した (Fig. 26)。OFLXおよびNFLXは0.05 $\mu\text{g/ml}$, NAは1.56 $\mu\text{g/ml}$ に、PPAは3.13 $\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークがみられた。また、ABPC耐性 *H. influenzae* に対する NY-198の MICはABPC感受性菌のそれと差が認められなかった (Fig. 27)。

N. gonorrhoeae 17株に対し、NY-198は0.1 $\mu\text{g/ml}$ ではほぼ95%の菌株の増殖を阻止し、その抗菌活性はPPA, NAおよびABPCより優れていた (Fig. 28)。

嫌気性グラム陰性桿菌である *Bacteroides fragilis* 27株の感受性分布では、NY-198は12.5 $\mu\text{g/ml}$ に、OFLXは3.13 $\mu\text{g/ml}$ に MIC 値のピークがみられ、NY-198はNFLXの約4~8倍の抗菌活性を示した。NAでは、90%以上の菌株が100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した (Fig.

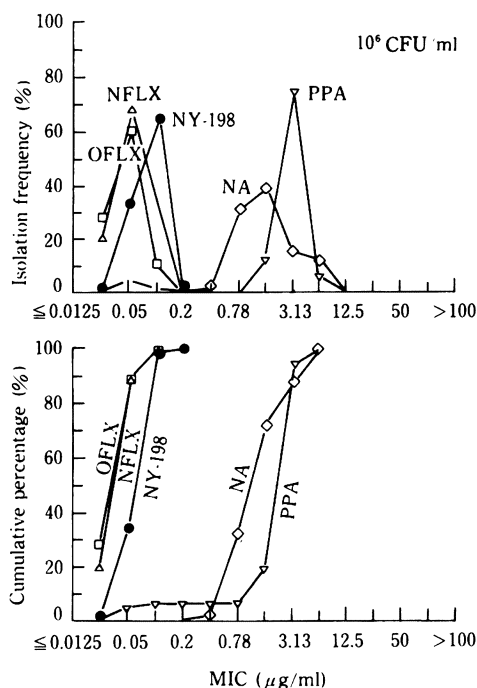


Fig. 27. Antibacterial activity of NY-198 against ABPC-resistant *H. influenzae* (64 strains)

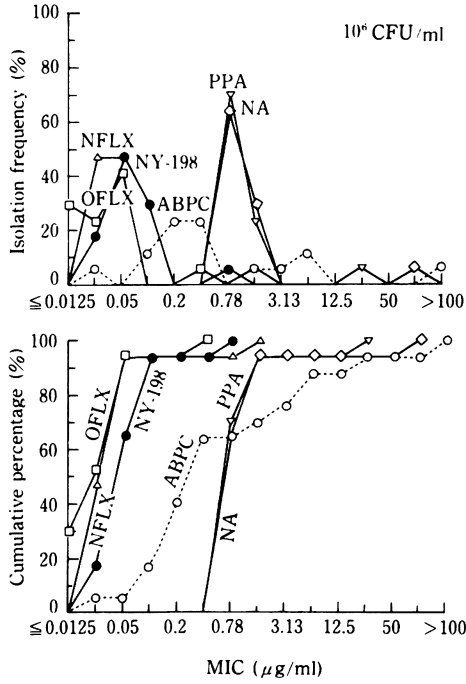


Fig. 28. Antibacterial activity of NY-198 against *N. gonorrhoeae* (17 strains)

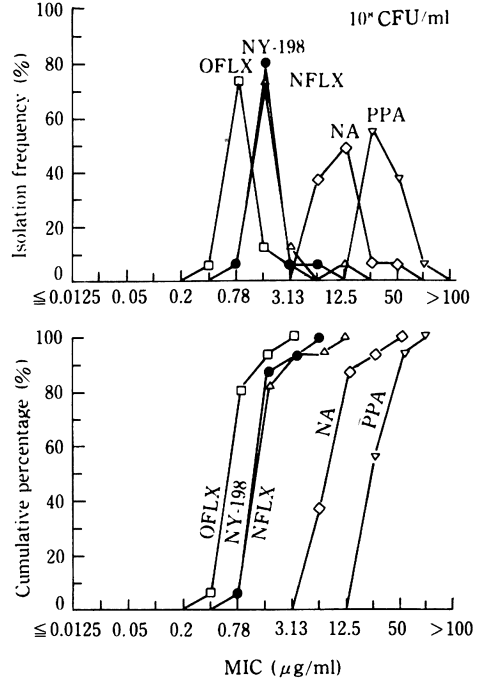


Fig. 30. Antibacterial activity of NY-198 against *C. perfringens* (16 strains)

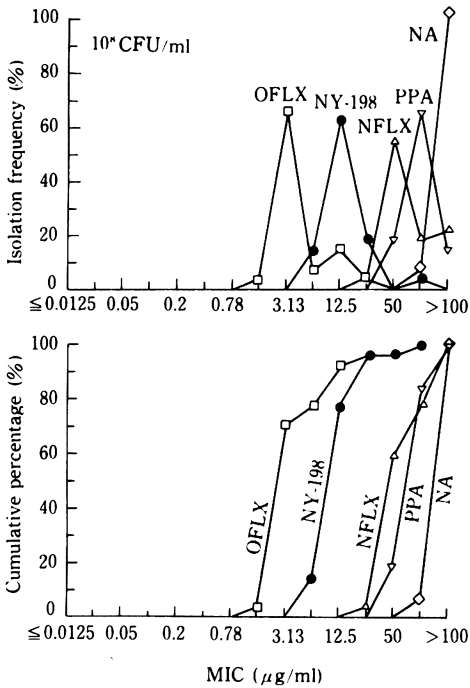


Fig. 29. Antibacterial activity of NY-198 against *B. fragilis* (27 strains)

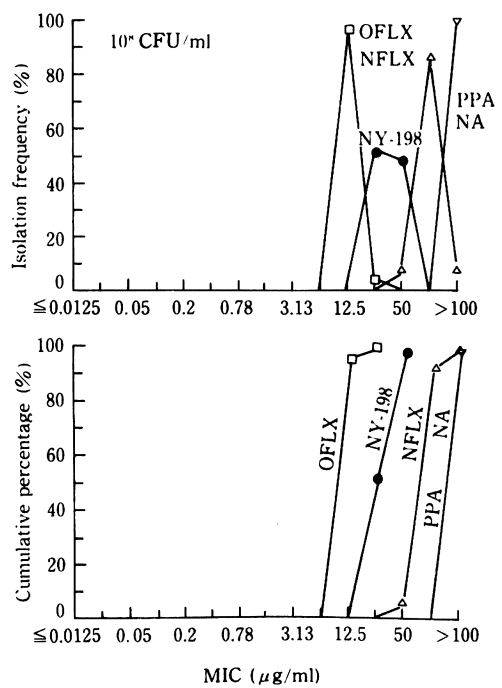


Fig. 31. Antibacterial activity of NY-198 against *C. difficile* (27 strains)

Table 2. Bactericidal activity of NY-198 against standard strains

Organism	NY-198		OFLX		NFLX		PPA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> FDA209P JC-1	0.78	0.78	0.20	0.39	0.20	0.39	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> Terajima	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39	0.39	12.5	25
<i>S. aureus</i> MS353	3.13	3.13	0.78	1.56	6.25	12.5	200	400
<i>S. pyogenes</i> Cook	1.56	3.13	0.78	0.78	0.78	0.78	100	200
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	3.13	6.25
<i>M. luteus</i> ATCC9341	6.25	6.25	1.56	1.56	12.5	25	100	200
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56	1.56
<i>E. coli</i> K12 C600	0.10	0.20	0.05	0.10	0.05	0.10	0.78	1.56
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.05	0.78	0.78
<i>S. typhimurium</i> IID971	0.20	0.20	0.10	0.10	0.05	0.10	1.56	1.56
<i>S. typhi</i> 901	0.10	0.10	0.05	0.05	0.05	0.10	1.56	3.13
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.10	0.10	0.03	0.05	0.05	0.05	0.78	0.78
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10	0.20	1.56	3.13
<i>S. enteritidis</i> G14	0.05	0.10	0.03	0.05	0.05	0.05	0.78	0.78
<i>M. morgonii</i> IFO3848	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.05	0.78	1.56
<i>P. mirabilis</i> IFO3849	0.39	0.78	0.20	0.39	0.20	0.20	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.10	0.10	0.03	0.05	0.05	0.05	1.56	1.56
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.78	1.56
<i>P. rettgeri</i> IFO3850	0.39	0.78	0.20	0.39	0.78	1.56	12.5	50
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	0.39	0.39	0.20	0.20	0.20	0.20	3.13	3.13
<i>E. cloacae</i> 963	0.39	0.39	0.10	0.20	0.20	0.39	6.25	6.25
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0.39	0.39	0.20	0.20	0.20	0.20	1.56	1.56
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	1.56	3.13	0.78	3.13	0.39	3.13	6.25	100
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	0.78	3.13	0.39	1.56	0.39	1.56	6.25	50
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.78	1.56	0.39	0.78	0.20	0.78	6.25	12.5

(MIC, MBC: $\mu\text{g/ml}$)

29)。

さらに、嫌気性グラム陽性桿菌の *Clostridium perfringens* 16株および *Clostridium difficile* 27株に対して NY-198は、それぞれ1.56 $\mu\text{g/ml}$ および25 $\mu\text{g/ml}$ に MIC値のピークを示し、*C. difficile*に対する抗菌力は OFLX>NY-198>NFLXの順であった (Fig. 30, 31)。

3. 殺菌作用

標準菌株に対する NY-198の MIC値と MBC値の関係を OFLX, NFLX および PPA と比較して Table 2に示した。NY-198の MBC値はいずれも MIC値とほぼ一致しており、*P. aeruginosa*における PPAの成績を除いて、OFLX, NFLX, PPAについても MIC値と MBC値との間には大差はみられなかった。Fig. 32, 33, 34に示すように、*S. aureus* Smith, *E. coli* ML4707 および *P. aeruginosa* GN11189株に対して、NY-198は

MIC以上の濃度で細菌の増殖を顕著に抑制し、強い殺菌的作用が認められた。また24時間培養後においても、NY-198をはじめ OFLX, NFLX は、1 MIC以上の濃度で細菌の再増殖は見られなかった。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

Fig. 35に示すように、20, 40%の馬血清添加により NAの MIC値は大きく増加し、PPAの MIC値もやや増加する傾向がみられたが、NY-198では OFLX および NFLX と同様、MIC値の大きな変動はみられなかった。

培地 pHの変化により、NY-198, OFLX および NFLX はアルカリ側で抗菌力がやや増加したのに対し、NAはアルカリ側で抗菌力が減少した (Fig. 36)。

接種菌量を増加させた場合は、5薬剤ともに MIC値がやや大きくなる傾向がみられ、この傾向は *P. aer-*

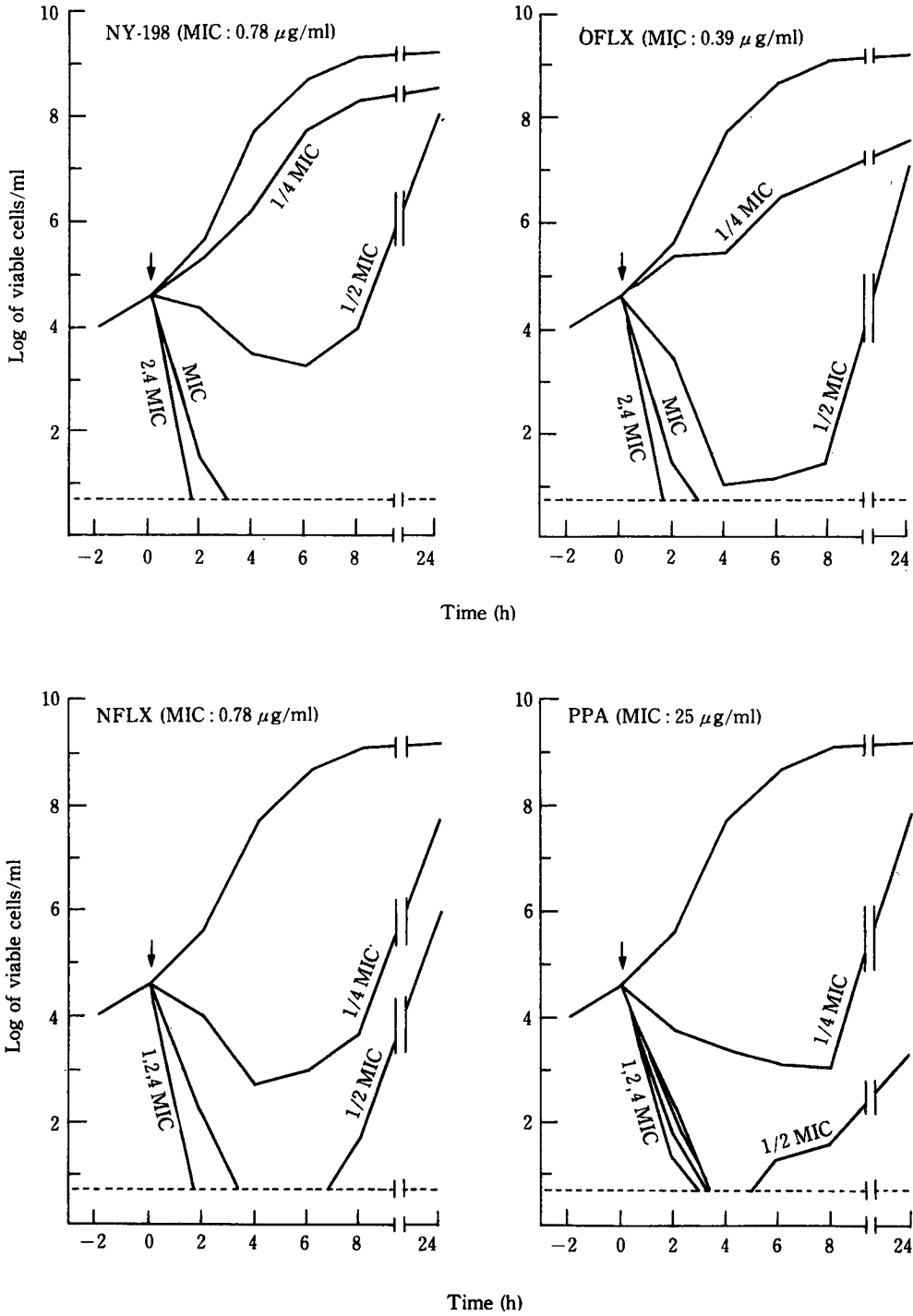


Fig. 32. Bactericidal activity of NY-198 against *S. aureus* Smith

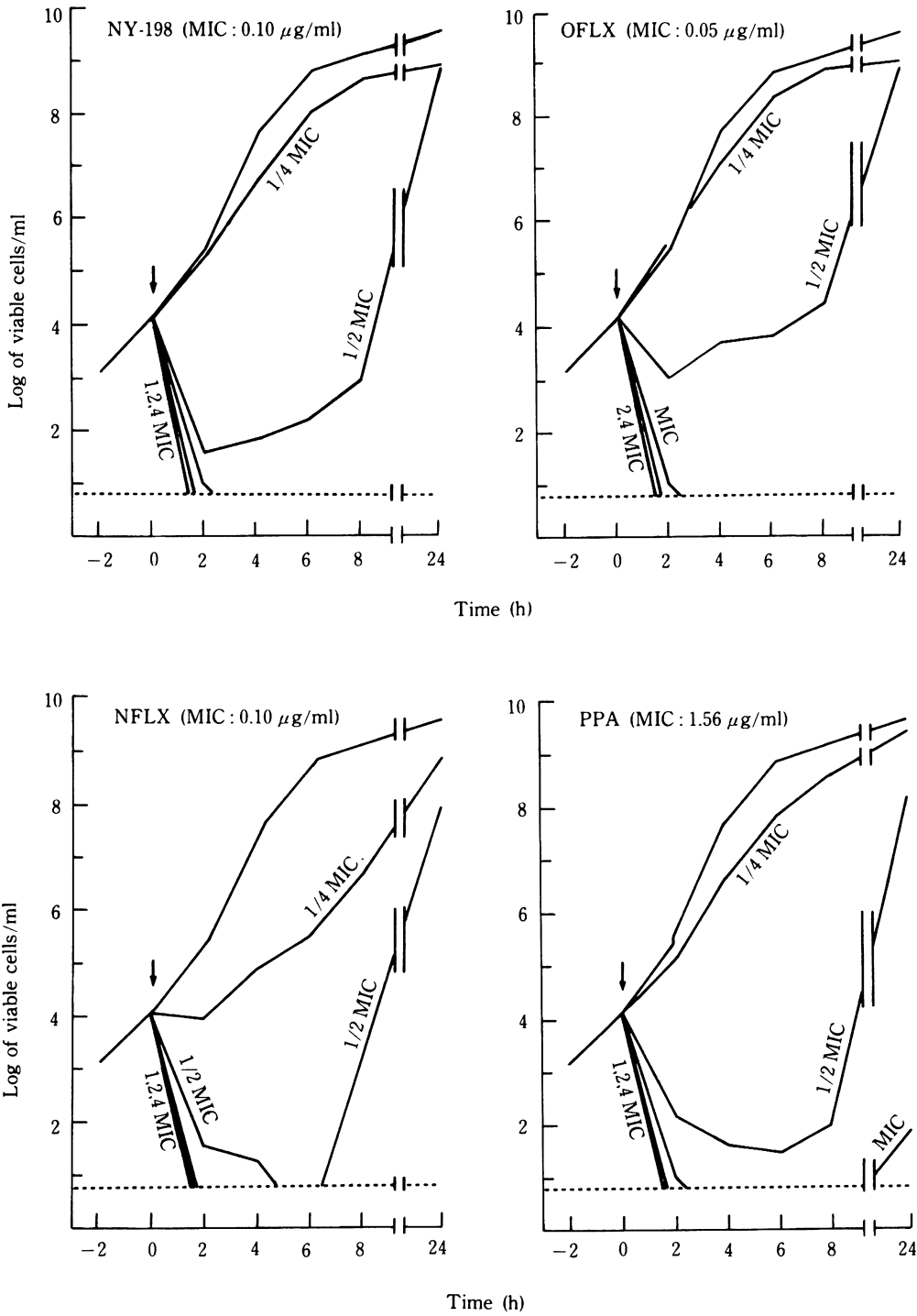


Fig. 33. Bactericidal activity of NY-198 against *E. coli* ML4707

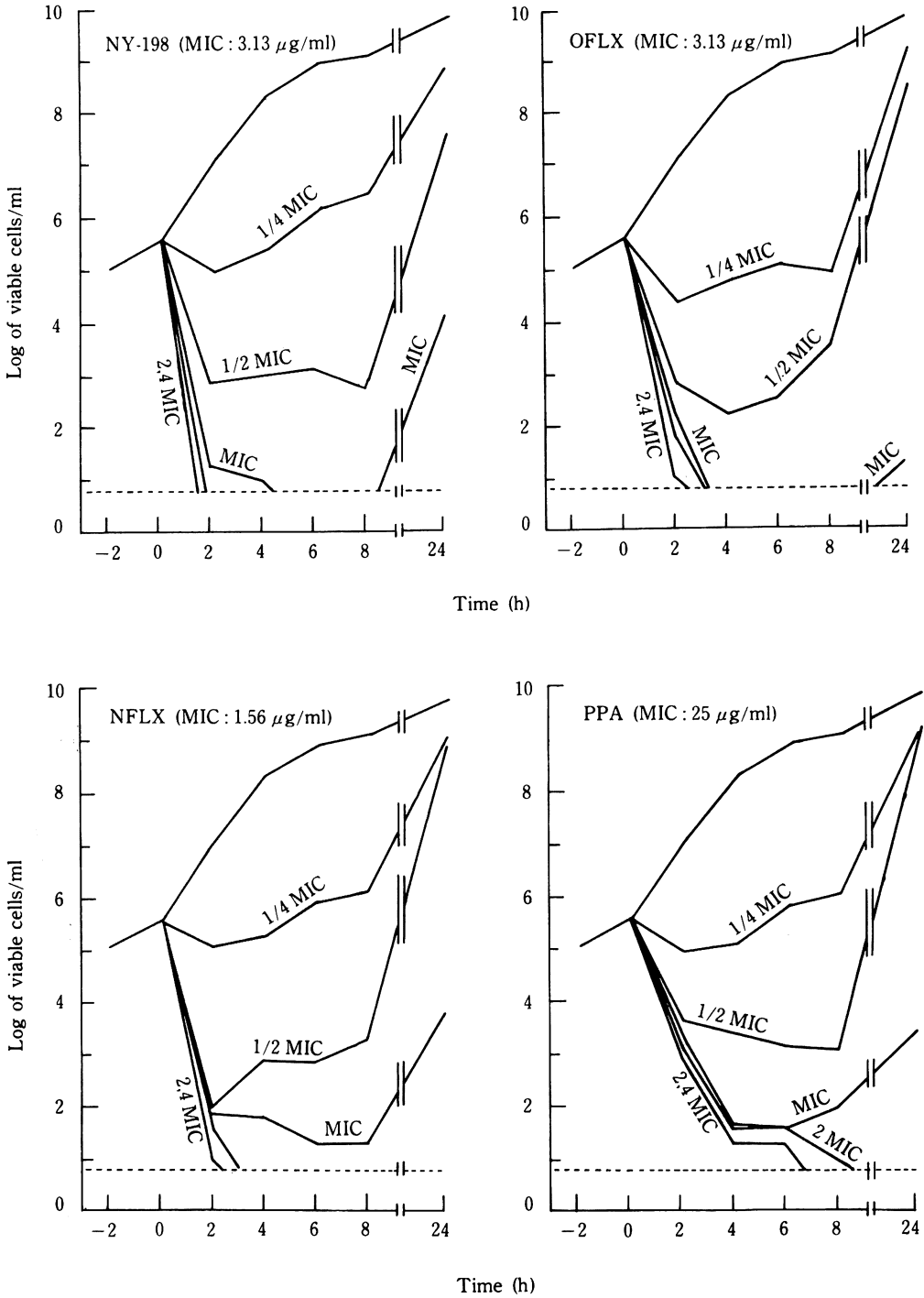


Fig. 34. Bactericidal activity of NY-198 against *P. aeruginosa* GN11189

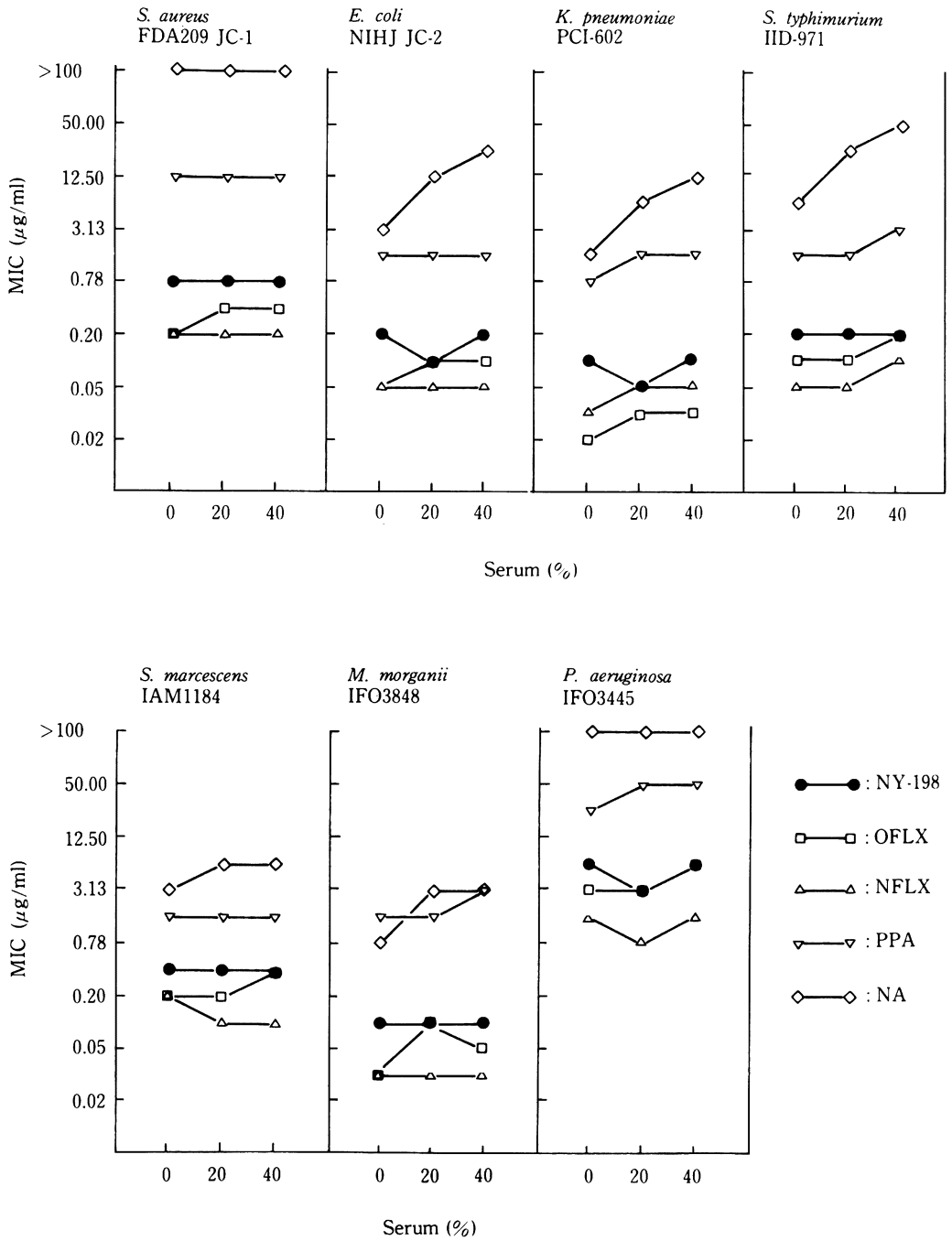


Fig. 35. Influence of horse serum on MIC

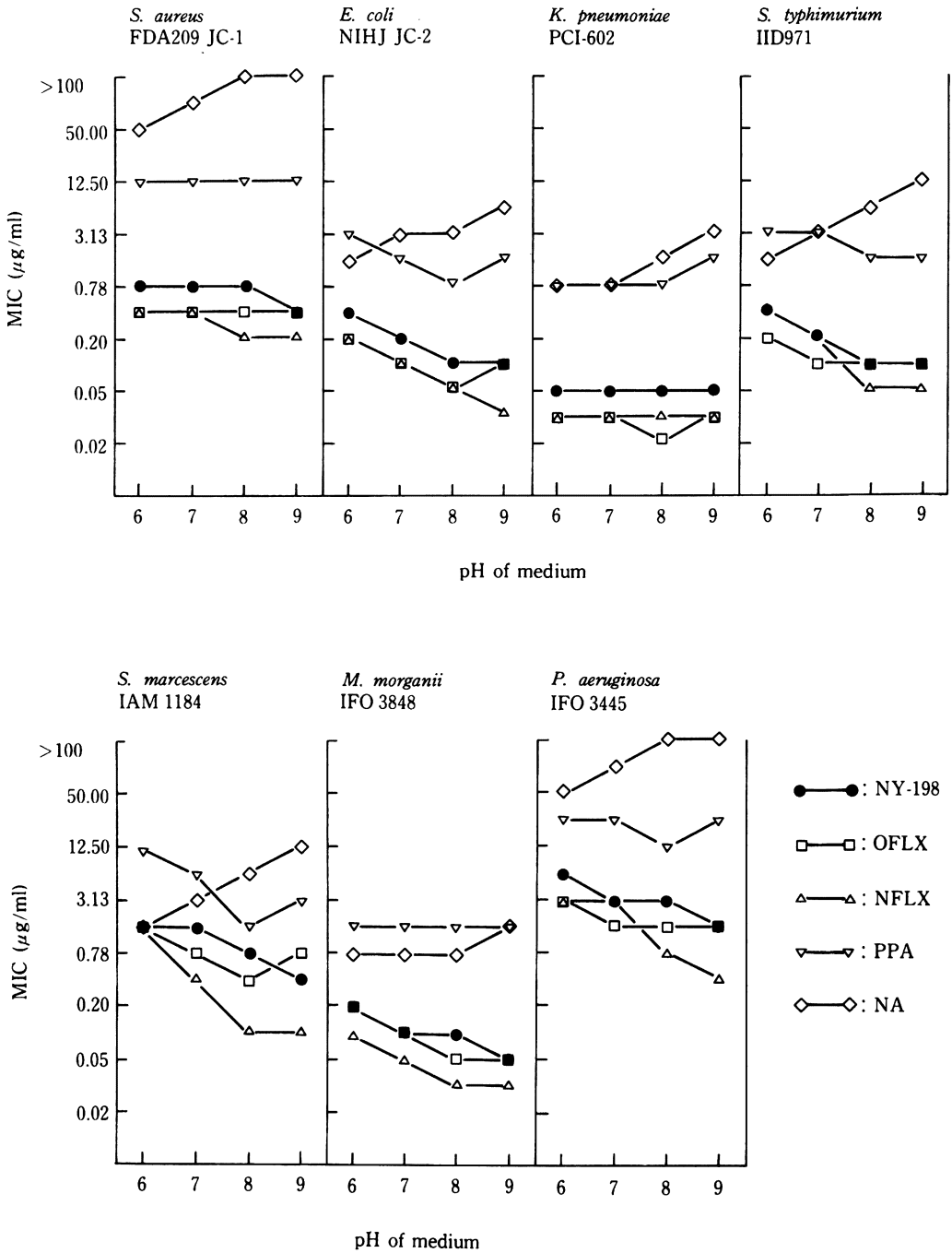


Fig. 36. Influence of medium pH on MIC

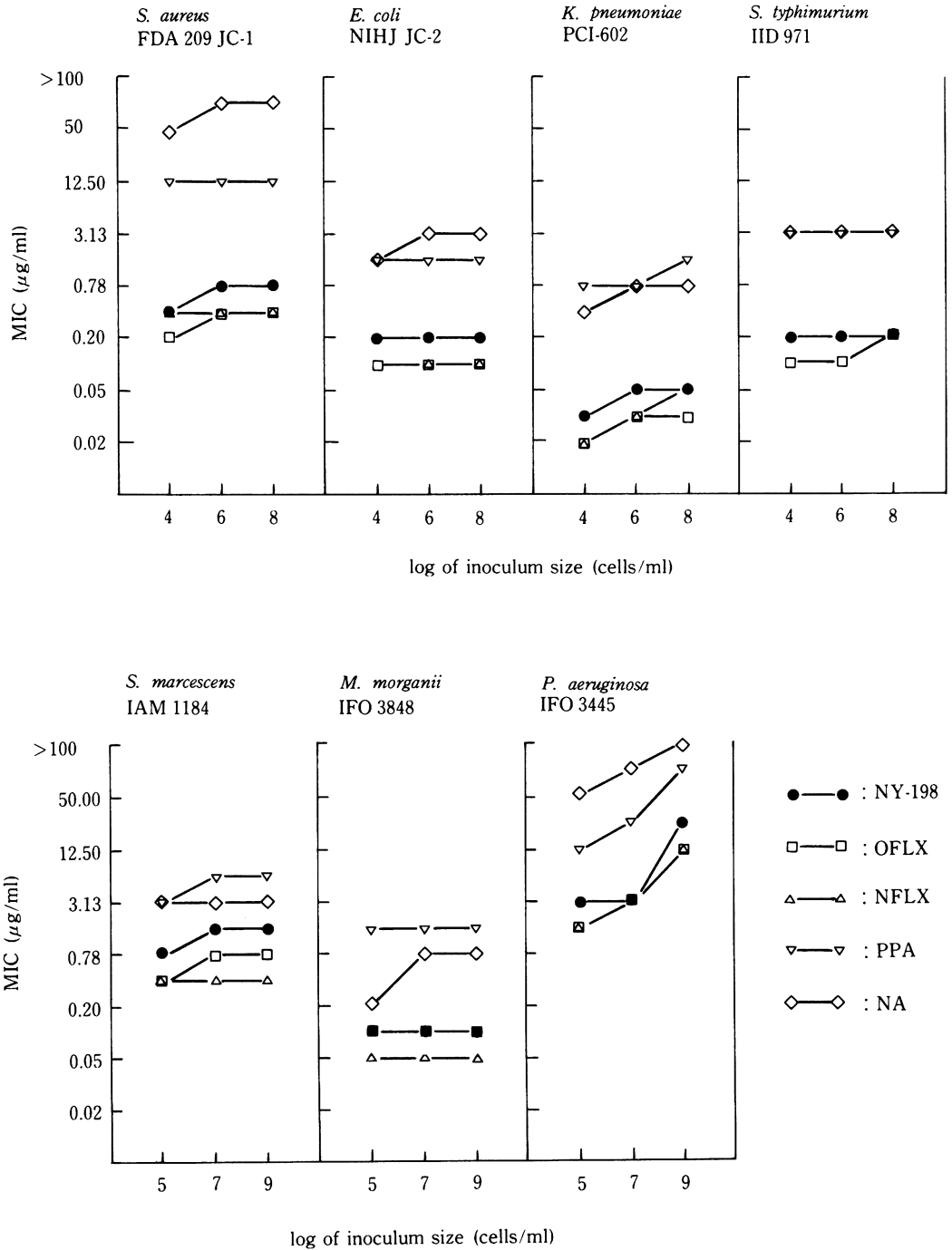


Fig. 37. Influence of inoculum size on MIC

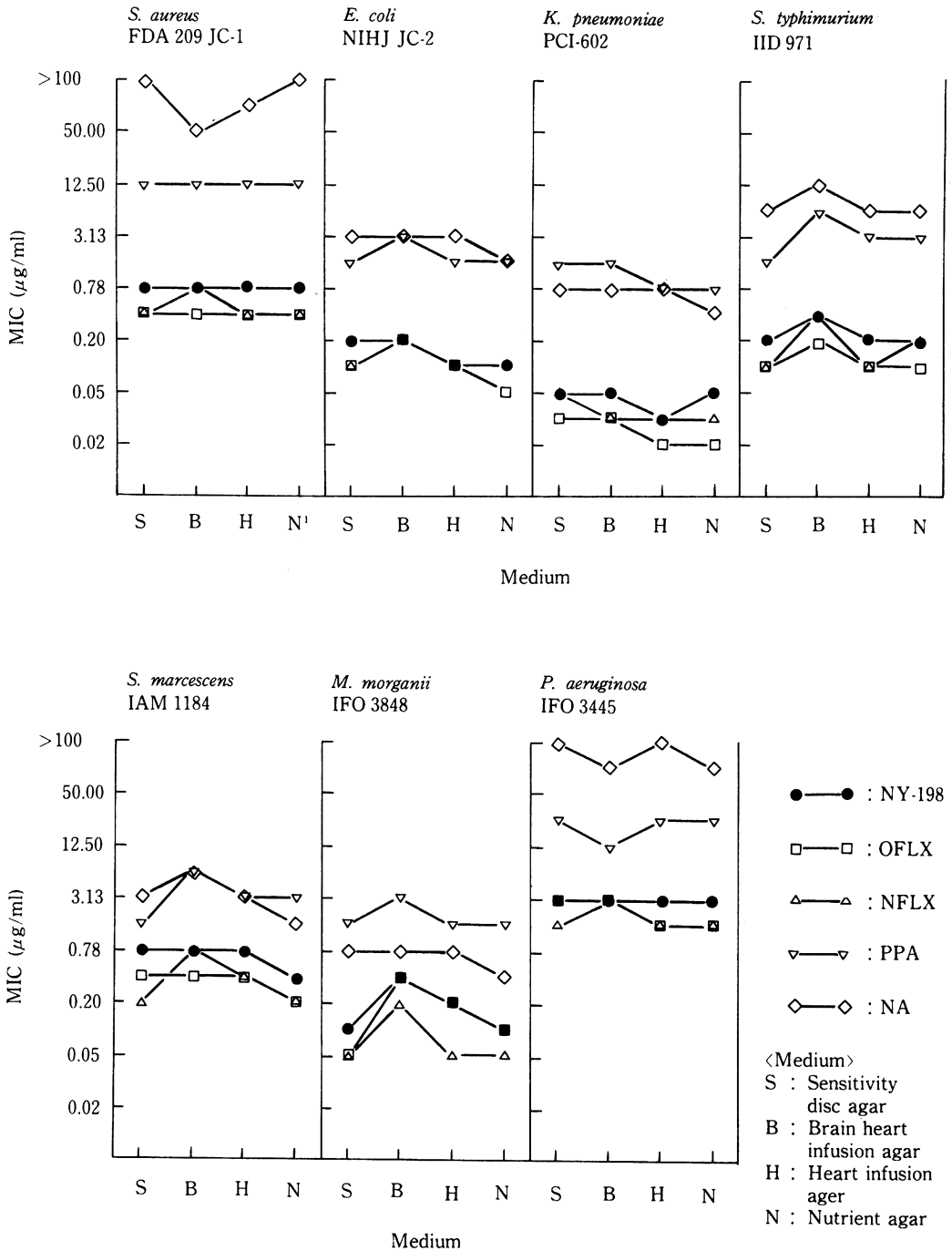


Fig. 38. Influence of medium on MIC

Table 3. Frequency of spontaneous mutants resistant to NY-198

Organism	NY-198	OFLX	NFLX	PPA	NA
<i>S. aureus</i> FDA209P JC-1	$<9.2 \times 10^{-9}$	$<9.2 \times 10^{-9}$	$<9.2 \times 10^{-9}$	$<9.2 \times 10^{-9}$	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	$<5.8 \times 10^{-9}$	$<5.8 \times 10^{-9}$	$<5.8 \times 10^{-9}$	$<5.8 \times 10^{-9}$	2.9×10^{-8}
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	$<4.5 \times 10^{-8}$	$<4.5 \times 10^{-8}$	$<4.5 \times 10^{-8}$	4.5×10^{-8}	5.0×10^{-7}
<i>S. typhimurium</i> IID971	$<1.8 \times 10^{-9}$	1.8×10^{-9}	3.6×10^{-9}	3.6×10^{-9}	1.8×10^{-9}
<i>S. marcescens</i> IAM1184	$<2.3 \times 10^{-8}$	$<2.3 \times 10^{-8}$	$<2.3 \times 10^{-8}$	1.1×10^{-7}	2.3×10^{-8}
<i>M. morgani</i> IFO3848	$<5.2 \times 10^{-9}$	$<5.2 \times 10^{-9}$	$<5.2 \times 10^{-9}$	5.2×10^{-9}	1.6×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	$<1.2 \times 10^{-9}$	$<1.2 \times 10^{-9}$	$<1.2 \times 10^{-9}$	$<1.2 \times 10^{-9}$	—

Selective concentration: 8 times the MIC value

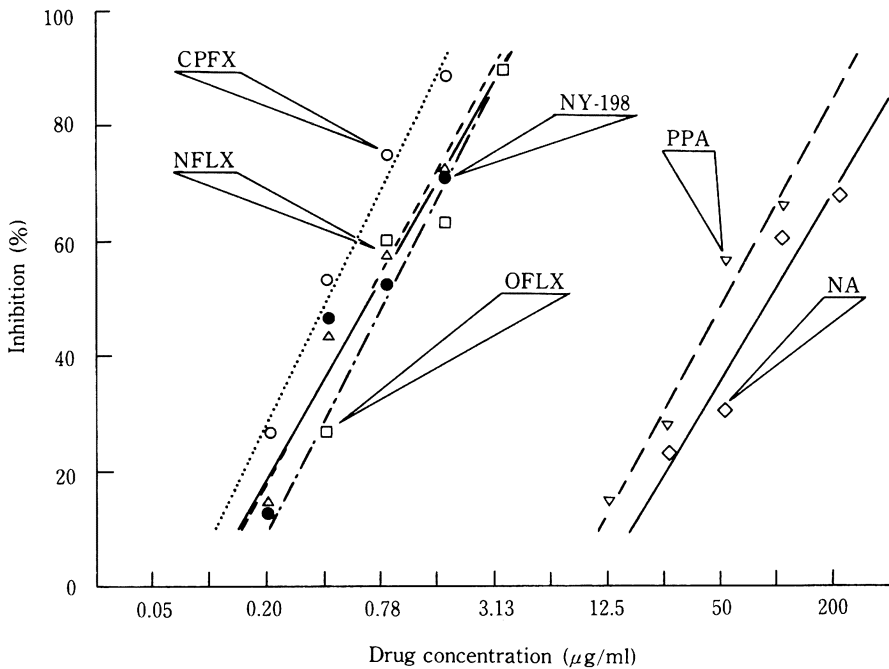


Fig. 39. Inhibition of *E. coli* KL-16 DNA gyrase supercoiling activity by NY-198

uginosa IFO3445株において特に顕著であった (Fig. 37)。

また、培地を変えても NY-198の抗菌力に大きな変化はみられなかった (Fig. 38)。

5. 自然耐性菌出現頻度

Table 3に示すとおり、PPAは7菌種中4菌種において 10^{-7} ~ 10^{-9} の頻度で自然耐性菌の出現が認められた。これに対して NY-198の耐性菌の出現はいずれも 10^{-8} ~ 10^{-9} 以下の頻度であった。

6. 大腸菌の DNA gyrase のスーパーコイル活性の阻害作用

各種キノロン系薬剤による大腸菌 DNA gyrase のスーパーコイル活性阻害効果を Fig. 39に、また MIC と ID_{50} の比較を Table 4 に示した。 ID_{50} 値で比較すると NY-198 ($0.67 \mu\text{g/ml}$) は、NA ($87.6 \mu\text{g/ml}$) や PPA ($50.5 \mu\text{g/ml}$) よりはるかに強く、OFLX ($0.80 \mu\text{g/ml}$) および NFLX ($0.64 \mu\text{g/ml}$) とほぼ同等の DNA gyrase 阻害活性を有していた。また、今回調べた薬剤の中では、MIC 値・ ID_{50} 値ともに ciprofloxacin (CPFX) が最も

優れていた。

7. マウス感染防御効果

NY-198の *in vivo* 抗菌活性を、マウス感染症に対する感染防御効果で、OFLX, NFLX および PPA と比較検討し Table 5 に示した。

S. aureus Smith 感染症に対する NY-198の ED₅₀値は6.66mg/kgで、OFLXの7.07mg/kgとほぼ同等であり、NFLXの13.4mg/kgより低い値を示した。PPAは142.1mg/kgと NY-198よりはるかに高い ED₅₀値であった。

E. coli ML4707感染症に対し、NY-198は1.45mg/kgという ED₅₀値を示し、OFLXの1.38mg/kgとほぼ同等で、NFLXの3.91mg/kgの約1/3、PPAの29.3mg/kgの約1/20であった。

Table 4. Inhibition of *E. coli* KL-16 DNA gyrase supercoiling activity by quinolonecarboxylic acids

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID ₅₀	
		($\mu\text{g/ml}$)	($\times 10^{-5}$ mol/l)
NA	6.25	87.6	37.7
PPA	3.13	50.5	16.7
NFLX	0.10	0.64	0.20
OFLX	0.10	0.80	0.22
CPFEX	0.025	0.39	0.12
NY-198	0.20	0.67	0.19

Table 5. Protective effects of NY-198 on systemic infections in mice

Organism ^{a)}	Challenge dose (CFU/mouse)	Drug ^{b)}	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% confidence limit (mg/kg)
<i>S. aureus</i> Smith	2.2 $\times 10^7$ with mucin	NY-198	0.78	6.66	5.26—8.38
		OFLX	0.20	7.07	5.80—8.60
		NFLX	0.39	13.4	9.95—17.0
		PPA	12.5	142.1	112—180
<i>E. coli</i> ML4707	6.0 $\times 10^7$	NY-198	0.20	1.45	1.18—1.84
		OFLX	0.05	1.38	1.10—1.74
		NFLX	0.05	3.91	2.84—5.35
		PPA	1.56	29.3	20.1—42.6
<i>K. pneumoniae</i> GN6445	3.4 $\times 10^7$	NY-198	0.20	1.78	1.48—2.13
		OFLX	0.05	3.06	2.42—3.88
		NFLX	0.10	6.25	4.78—8.47
		PPA	1.56	22.3	18.0—27.7
<i>P. mirabilis</i> GN4754	7.8 $\times 10^6$ with mucin	NY-198	0.39	1.39	1.11—1.73
		OFLX	0.20	1.91	1.49—2.45
		NFLX	0.39	3.81	2.64—5.01
		PPA	12.5	32.5	23.0—42.1
<i>S. marcescens</i> GN7577	1.0 $\times 10^6$ with mucin	NY-198	3.13	14.4	11.6—17.8
		OFLX	1.56	30.2	23.1—41.5
		NFLX	1.56	46.6	35.3—63.4
		PPA	50	>200	—
<i>P. aeruginosa</i> GN11189	6.4 $\times 10^6$ with mucin	NY-198	3.13	32.2	26.0—39.8
		OFLX	1.56	47.1	38.4—57.7
		NFLX	1.56	57.7	44.0—76.5
		PPA	25	>200	—

a) Administered intraperitoneally.

b) Single oral medication immediately after infection.

K. pneumoniae GN6445 感染症に対し、NY-198のED₅₀値は1.78mg/kgであり、OFLX (3.06mg/kg) の2倍、NFLX (6.25mg/kg) の3.5倍、PPA (22.3mg/kg) の13倍の感染防御効果を示した。

S. marcescens GN7577 感染症に対し、NY-198のED₅₀値は14.4mg/kgで、OFLX (30.2mg/kg) の2倍、NFLX (46.6mg/kg) の3倍の強い活性を示した。

P. mirabilis GN4754 感染症に対するNY-198のED₅₀値は1.39mg/kgであり、OFLX (1.91mg/kg) とほぼ同等で、NFLX (3.81mg/kg) の3倍、PPA (32.5mg/kg) の23倍の優れた効果を示した。

P. aeruginosa GN11189 感染症に対し、NY-198は32.2mg/kgというED₅₀値を示し、この値はOFLXの47.1mg/kgより1.5倍、NFLXの57.7mg/kgより2倍優れた効果であった。

III 考 察

NY-198は標準菌株および臨床分離株のグラム陽性菌、グラム陰性菌に対し、幅広い抗菌スペクトルを示し、その抗菌活性はNFLX、OFLXとほぼ同等であり、PPAよりはるかに優れていた。しかもこれらの抗菌活性はDMPPC耐性 *S. aureus*、GM耐性 *P. aeruginosa*、ABPC耐性 *H. influenzae*、さらにNA耐性 *Enterobacteriaceae* のいずれに対しても有効であった。

増殖曲線に及ぼす影響でも、NY-198添加直後から生菌数の急激な減少がみられ、細菌に対するNY-198の殺菌的作用が示された。この強い殺菌的作用は突然変異株選択の実験系からも予想された。すなわち、8 MICを用いた場合NY-198耐性変異株の出現頻度が10⁻⁸以下であった。GELLERTらはNA、oxolinic acidのDNA合成阻害作用に関して、これらの薬剤が *E. coli* のDNA gyrase subunit Aに作用してDNAのスーパーコイル化を阻害し、ひいてはDNA合成を阻害すると報告した^{9,11)}。DNA gyraseはDNAの立体的構造変換を担っており、DNA複製等に深く関与していることから、細菌に必須の酵素であると考えられる¹²⁻¹⁴⁾。近年開発された同系薬剤であるNFLXおよびOFLXについても、このDNA gyraseのスーパーコイリング活性を強く阻害する事がわかっている⁸⁾。今回、NY-198も他のキノロン同様、DNA gyraseのスーパーコイリング活性を強く阻害した。このDNA gyrase阻害作用が、NY-198の強い抗菌活性の主因と考えられる。

NY-198の *in vitro* 抗菌活性は、NFLXおよびOFLXとほぼ同等あるいはわずかに劣るものの、*in vivo* マウス感染防御効果においてNY-198は、NFLXより優れ、OFLXとほぼ同等あるいはそれ以上の感染防御効果を示した。このようにNY-198について優れた感

染防御効果が得られたことは、NY-198の優れた *in vitro* 抗菌活性だけでなく、NY-198のマウスにおける高いbioavailability¹⁵⁾を反映していると考えられる。以前、当研究所ではOFLXが、優れた *in vitro* 抗菌活性を有するCPFEXとも同等の *in vivo* 感染防御効果を示すという報告¹⁶⁾をしており、今回の結果と併せると、NY-198はOFLX、CPFEXと同様に、既存のキノロンの中で最も優れた *in vivo* マウス感染防御効果を有するものと考えられる。

このようにNY-198がマウス全身感染症において優れた感染防御効果を示した事、さらにNY-198はヒトにおいても優れた体内動態を有する事¹⁷⁾から、将来ヒトについても尿路感染症のみならず、全身感染症に対しても有用な薬剤となることが期待される。

文 献

- 1) SATO, K.; Y. MATSUURA, M. INOUE, T. UNE, Y. OSADA, H. OGAWA & S. MITSUHASHI : *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 : 548~553, 1982
- 2) ITO, A.; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI : *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* 77 : 103~108, 1980
- 3) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, A. MINAMI, K. NAKATA, S. INOUE, M. ISHIYAMA & Y. KUBO : Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa* : *in vitro* properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8 : 132~138, 1975
- 4) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 5) 嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会 : 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。 *Chemotherapy* 27 : 559~560, 1979
- 6) GELLERT, M.; L. M. FISHER & M. H. O'DEA : DNA gyrase : Purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 6289~6293, 1979
- 7) STAUDENBAUER, W. L. & E. ORR : DNA gyrase : affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties. *Nucleic Acid Res.* 9 : 3589~3609, 1981
- 8) SATO, K.; Y. INOUE, T. FUJII, H. AOYAMA, M. INOUE & S. MITSUHASHI : Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone resistant strain of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 : 777~780,

- 1986
- 9) GELLERT, M. ; K. MIZUUCHI, M. H. O'DEA & H. A. NASH : DNA gyrase : An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 : 3872~3876, 1976
 - 10) MILLER, L. C. & M. L. TAINTER : Estimation of the ED₅₀ and its error by means of logarithmic-probit graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57 : 261~264, 1944
 - 11) SUGINO, A. ; C. L. PEEBLES, K. N. KREUZER & N. R. COZZARELLI : Mechanism of action of nalidixic acid : Purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nickingclosing enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 4767~4771, 1977
 - 12) KREUZER, K. N. & N. R. COZZARELLI : *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A : Effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription and bacteriophage growth. J. Bacteriol. 140 : 424~435, 1979
 - 13) ORR, E. ; N. F. FAIRWEATHER, I. B. HOLLAND & R. H. PRITCHARD : Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the *cou* gene of *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 177 : 103~112, 1979
 - 14) GELLERT, M. : DNA topoisomerases. Ann. Rev. Biochem. 50 : 897~910, 1981
 - 15) KATO, H. ; O. NAGATA, E. OKEZAKI, T. YAMADA, Y. ITO, T. TERASAKI & A. TSUJI : NY-198, a new antimicrobial agent of quinolone : Absorption, distribution and excretion in animals. Program Abstr. 25th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. no. 568, 1985
 - 16) 山下 悟, 矢島英彦, 井上松久, 三橋 進 : BAY。9867 (Ciprofloxacin) の抗菌作用. Chemotherapy 33 S-7 : 1~17, 1985
 - 17) NAKASHIMA, M. ; T. UEMATSU, Y. TAKIGUCHI, A. MIZUNO, M. KANAMARU, A. TSUJI, S. KUBO, O. NAGATA, E. OKEZAKI & Y. TAKAHARA : A new quinolone, NY-198 : Pharmacokinetics in healthy volunteers. Program Abstr. 26th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. no. 430, 1986

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF NY-198

TOHRU HIROSE and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute, Gunma

MATSUHISA INOUE

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine, Gunma University, Gunma

NY-198, a new oral difluorinated quinolone, is characterized by the presence of a C-methyl group at the 3-position of the piperazine moiety. We compared the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of NY-198 with those of ofloxacin (OFLX), norfloxacin (NFLX), and piperidic acid (PPA). The results are summarized as follows :

- 1) NY-198 had a broad spectrum, with strong antibacterial activity against both Gram-positive and -negative bacteria. Its *in vitro* activity was similar to those of OFLX and NFLX.
- 2) NY-198 showed no cross-resistance with methicillin, gentamicin, ampicillin, and nalidixic acid.
- 3) The action of NY-198 was bactericidal.
- 4) Variation in medium pH, medium, inoculum size, and addition of horse serum had no effect on MICs of NY-198.
- 5) The frequency of spontaneous mutation resistance to NY-198 was relatively low.
- 6) NY-198 strongly inhibited the supercoiling activity of DNA gyrase purified from *E. coli* KL-16.
- 7) *In vivo* antibacterial activity of NY-198 against systemic infections in mice was 2-to 4-fold that of NFLX and 1-to 2-fold that of OFLX.