

NY-198の試験管内抗菌力、細胞毒性、及び マウス培養マクロファージ (M ϕ) との協力的殺菌作用

横田 健・鈴木映子・新井京子

順天堂大学医学部細菌学教室

NY-198の *Staphylococcus aureus*, methicillin 耐性 *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* (R⁺), *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, ampicillin (ABPC) 耐性 *Haemophilus influenzae* 及び *Bacteroides fragilis* に対する MIC₈₀ はそれぞれ 0.78, 1.56, 12.5, 1.56, 1.56, 0.39, 3.13, 0.05 及び 12.5 μ g/ml で, norfloxacin と ofloxacin の中間的抗菌特性を示した。培養された CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, ヒト神経芽細胞 (IMR32) 及びマウス線維芽細胞の初代培養には 10 μ g/ml までほとんど影響せず, 細胞毒性が比較的弱いニューキノロンである。

NY-198 と補体との協力的殺菌作用は強くないが, マウス培養マクロファージ (M ϕ) は 1/8MIC の NY-198 存在下でも, ややフィラメント化した大腸菌細胞をよく食菌・消化し, 本剤が良好な生体内効果を示す可能性を示唆した。

DNA gyrase A subunit 阻害剤であるニューキノロンは, 二次的に DNA 合成を阻害するため, DNA と蛋白合成の不均衡から殺菌性が強い。北陸製薬で新たに合成された NY-198 はこのニューキノロンの一つである。この系統の薬剤は他系統のものに比べ抗菌域も広く, 組織移行も良いことが知られている。しかし選択毒性の理論は必ずしも確立されておらず, その安全性は多分に経験に頼ることになる。本研究では NY-198 の試験管内抗菌力, 補体及びマウス培養マクロファージ (M ϕ) との協力的殺菌作用を検討するとともに, 動物細胞に対する毒性を組織培養法で他のニューキノロンと比較した。

I 材料及び方法

1. 使用薬剤

NY-198 は北陸製薬研究所から分与された。対照薬剤として norfloxacin (NFLX : 杏林製薬), ofloxacin (OFLX : 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX : バイエル薬品), pipemidic acid (PPA : 大日本製薬) 及び cefaclor (CCL : 塩野義製薬) を使用した。

2. 使用菌株

順天堂大学附属病院中央検査室及び東京都養育院中央検査室から分与された臨床分離株 *Staphylococcus aureus* 50 株, methicillin 耐性 *S. aureus* (MRSA) 43 株, coagulase (-) staphylococci (CNS) 43 株, *Streptococcus pyogenes* 27 株, A 群以外の β -stre-

ptococci 14 株, *Streptococcus pneumoniae* 20 株, *Enterococcus faecalis* 37 株, *Enterococcus faecium* 41 株, 種々の R 因子を伝達した *Escherichia coli* CS 2 (R⁺) 52 垂株, *Klebsiella pneumoniae* 50 株, *Proteus mirabilis* 48 株, *Proteus vulgaris* 50 株, *Morganella morganii* 51 株, *Providencia rettgeri* 38 株, *Serratia marcescens* 49 株, *Enterobacter cloacae* 45 株, *Acinetobacter calcoaceticus* 45 株, *Pseudomonas aeruginosa* 50 株, *Pseudomonas cepacia* 40 株, *Xanthomonas maltophilia* 54 株, ampicillin (ABPC) 耐性 *Haemophilus influenzae* 27 株及び *Bacteroides fragilis* 50 株を被検菌とした。

3. 培養細胞

教室保存のハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, 東大医科研・獣医学研究部・山内教授から分与された神経芽細胞 (IMR32), ICR 妊娠 20 日胎児から初代培養した normal fibroblast 及び volunteer 腕の皮膚から初代培養したヒト normal fibroblast を使用した。

4. 試験管内抗菌力の検討

日本化学療法学会標準法¹⁾に準拠して平板法で最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。すなわち被検菌を 5 ml の L-broth²⁾ に 37°C, 一夜振盪培養し, 新鮮 L-broth でグラム陽性菌は 100 倍, グラム陰性菌は 1,000 倍に希釈し, 約 10⁶ CFU/ml の菌浮遊液を作った。マイクロプランターを使用し, 薬剤を倍々希釈濃度を含む Mueller-

Hinton 寒天 (Difco) の表面にスポット接種し、37°C 一夜培養後、菌発育の有無から MIC を定めた。ただしレンサ球菌群及び *H. influenzae* の前培養にはそれぞれ heart-infusion (HI) -broth (栄研) 及び HI-broth に 5% Fildes-extract (Oxoid) を加えたものを使用し、MIC 測定にはそれぞれ 5% 脱繊維ヒツジ血液加 HI 寒天及び 5% Fildes-extract 加 HI 寒天を用いた。又 *S. pneumoniae* の接種菌液は、血液平板上の菌をかき取り、HI-broth に浮遊したものを適当に希釈して調製した。嫌気性菌である *B. fragilis* は、前培養に GAM broth, 37°C 静置培養、MIC 測定には GAM 寒天のガスバック法による嫌気培養を行なった。

5. 細胞毒性の検討方法

24穴 FALCON multi dish の各 well に 1×10^4 個の CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, IMR32 細胞, マウス normal fibroblast 又はヒト normal fibroblast を含む 10% fetal calf serum 加 F12 培地 2ml ずつを接種した。一部の well には NY-198 又は OFLX を最終濃度 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えた。5% CO_2 存在下で 37°C 4 日間培養し、培養終了後各 well の培地を除き、0.002% EDTA 加 Tripsin で 37°C 10~15 分間処理して細胞をはがした。遠心で Tripsin 溶液を除き、3ml の Isoton 溶液に再浮遊して、coulter counter で細胞数を自動測定した。薬剤添加による影響は、薬剤無添加時 4 日目の細胞数を 100% とし、各濃度薬剤添加時の細胞数を相対比で表示した。各薬剤による細胞の形態変化は 4 日目に倒立位相差顕微鏡写真装置 (Nikon) で記録した³⁾。

6. 血清補体との協力的殺菌作用の検討

4本の 10ml L-broth に *E. coli* NIHJ JC-2 を 2×10^6 CFU/ml になるように接種した。1本はそのまま (対照), 2本目にこの菌の増殖に影響を与えない最高補体量 0.75 units/ml と 20% ヒト非働化血清を加えた。3本目には培養 5 時間後の生菌数を接種時の 50% に低下させる NY-198 (ID_{50}) を加えた。4本目の試験管には補体, ヒト非働化血清及び ID_{50} の NY-198 を添加した。37°C で振盪培養を続けながら、1, 3, 5 及び 24 時間目にそれぞれの培養液の一部を取り、適当に希釈して平板法で生菌計算を行ない、補体と薬剤の協力的殺菌作用をみた⁴⁾。

7. マウス培養 M ϕ との協力的食菌殺菌作用の検討

M ϕ は ICR σ 6 週令マウス腹腔内を 8 ml の 10% fetal calf serum 加 F12 培地で洗って採取し、遠心洗浄の後同培地 5 ml に再浮遊した。この 0.1 ml (約 10^4 cells) をカバースリップを沈めた 24穴 FALCON multi dish の各 well に接種し、37°C で 5% CO_2 存在下、30分静置した後同培地 1 ml ずつ加えて 5% CO_2 存在下一夜 37°C で培養した。翌日浮遊細胞を除き、L-CM (conditioned

medium of L-929)⁵⁾ 20% を添加した同培地 1 ml と交換し、さらに 2 時間培養を続けて、M ϕ を活性化した。さらに L-broth 中で 37°C 一夜振盪培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を M ϕ の 50 倍量 (5×10^5 CFU/well) 接種した。一部の well には 1 ~ 1/16 MIC の NY-198 を加えて培養した。培養 5 時間目にカバースリップを取り出し、Saline G で軽く洗浄後 methanol 固定、Giemsa 染色を行なって光顕像を撮影した。

II 成績

1. 試験管内抗菌力

NY-198 は *S. aureus* 臨床分離株に対し Fig. 1 のとおり OFLX や CPFX にわずかに劣る抗菌力を示し、全株 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下で増殖を阻止した。Fig. 2 のとおり MRSA に対する抗菌力も OFLX や CPFX に若干劣るが CCL や PPA よりはるかに優れていた。CNS 43 株に対しては、NY-198 は NFLX と同程度の抗菌力を示し、CPFX や OFLX にわずかに劣った (Fig. 3)。*S. pyogenes* に対する本剤の抗菌力は中等度にとどまり、CCL, CPFX, OFLX にはもちろん Fig. 4 のとおり NFLX より若干弱かった。Fig. 5 のとおり A 群以外の β -streptococci に対する抗菌力も、被検ニューキノロン中で最も弱かった。NY-198 の *S. pneumoniae* に対する抗菌力も Fig. 6 のとおり中等度で他のニューキノロンより弱い。*E. faecalis* に対しては NY-198 は NFLX と同程度の抗菌力を示したが、Fig. 7 のとおり CPFX や OFLX に劣った。*E. faecium* にはニューキノロン中で最も抗菌力は弱く、Fig. 8 のとおりその抗菌力は中等度にとどまった。

R 因子保有 *E. coli* に対しても、NY-198 の抗菌力は CPFX, NFLX, OFLX に劣ったが、Fig. 9 のとおり CCL や PPA よりかなり強く全株 1.56 $\mu\text{g/ml}$ で増殖が阻止された。*K. pneumoniae* に対しては Fig. 10 のとおり、NY-198 は CPFX や NFLX より若干弱い抗菌力だが、OFLX と同程度であった。*P. mirabilis* に対しては他のニューキノロンより抗菌力は弱かったが、Fig. 11 のごとく CCL や PPA よりかなり強かった。Fig. 12 のとおり *P. vulgaris* には、NY-198 は OFLX と NFLX の中間的な抗菌力を示した。*M. morgani* には NY-198 は OFLX と同程度の抗菌力で、Fig. 13 のとおり CPFX, NFLX に若干劣った。*P. rettgeri* に対する本剤の抗菌力も Fig. 14 のごとく OFLX と同程度であった。*S. marcescens* にも Fig. 15 のとおり NY-198 は OFLX と同程度の抗菌力を示し、CPFX, NFLX に若干劣った。*E. cloacae* には NY-198 は NFLX より若干強い抗菌力を示し、Fig. 16 のとおり OFLX よりわずかに劣った。*A. calcoaceticus* に対する NY-198 の抗菌力は Fig. 17

のとおり強く、NFLXより優れていた。*P. aeruginosa*にはNY-198はFig.18のごとく、OFLXと同程度の抗菌力を示し、CPFEXやNFLXには劣った。しかし、*P. cepacia*にはNY-198はFig.19のごとく、NFLXより若干強い抗菌力を示した。*X. maltophilia*に対する本剤の抗菌力は優れており、Fig.20のごとくOFLXと同程度でNFLXやCPFEXより優れていた。ABPC耐性*H. influenzae*に対するNY-198の抗菌力はFig.21のごとく良好で、他剤同様0.1 μ g/ml以下ですべての株を増殖阻止した。嫌気性菌*B. fragilis*に対する本剤の抗菌力はFig.22のとおり中等度にとどまり、NFLXより優れているものの、OFLXやCPFEXには劣った。

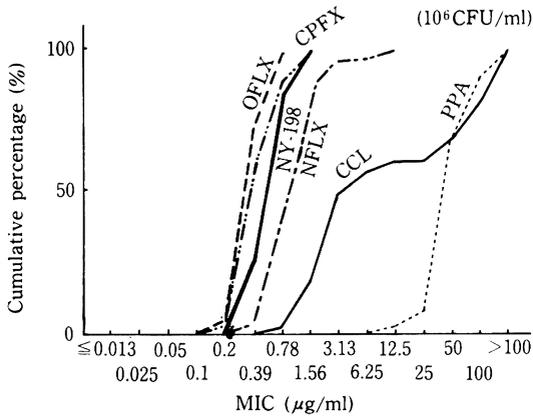


Fig. 1. Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *S. aureus* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

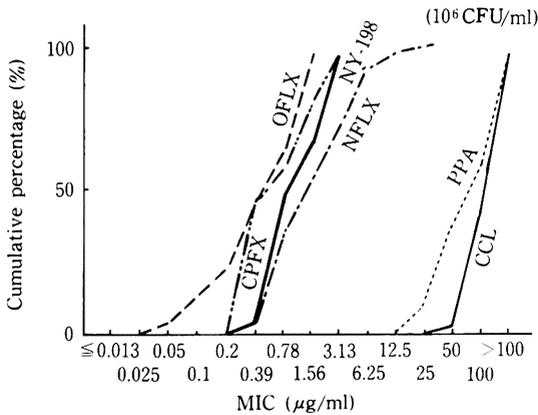


Fig. 2. Cumulative sensitivities of 43 clinical isolates of MRSA to NY-198 and other chemotherapeutic agents

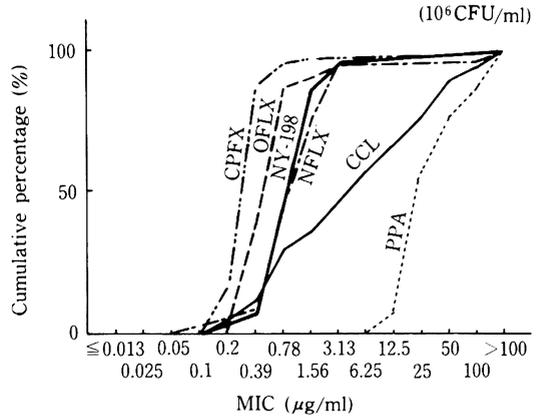


Fig. 3. Cumulative sensitivities of 43 clinical isolates of coagulase (-) staphylococci (CNS) to NY-198 and other chemotherapeutic agents

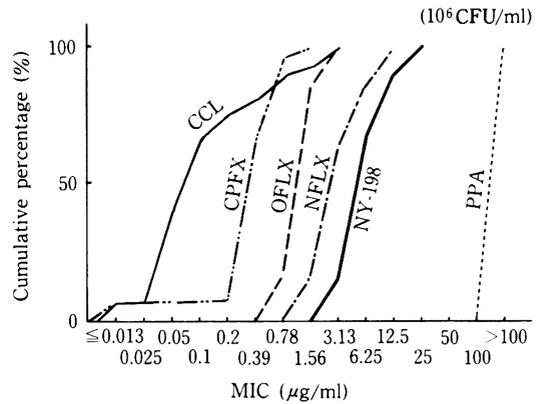


Fig. 4. Cumulative sensitivities of 27 clinical isolates of *S. pyogenes* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

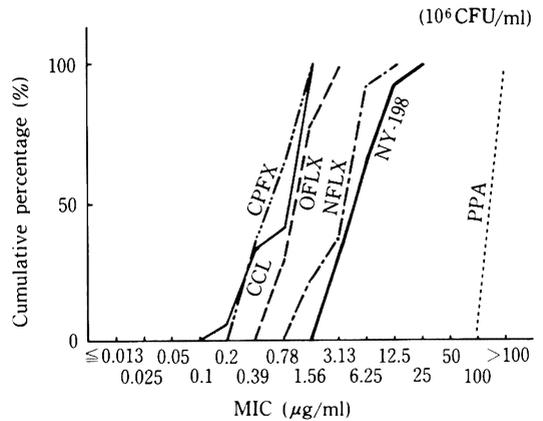


Fig. 5. Cumulative sensitivities of 14 clinical isolates of β -streptococci to NY-198 and other chemotherapeutic agents

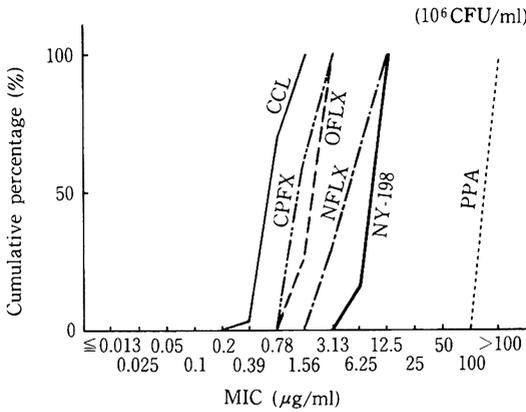


Fig. 6. Cumulative sensitivities of 20 clinical isolates of *S. pneumoniae* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

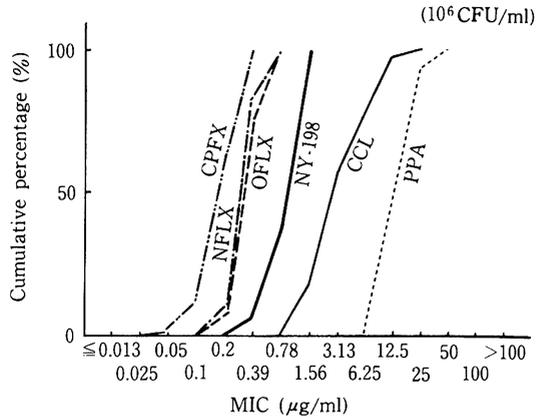


Fig. 9. Cumulative sensitivities of 52 subclones of *E. coli* carrying various R (bla) plasmids to NY-198 and other chemotherapeutic agents

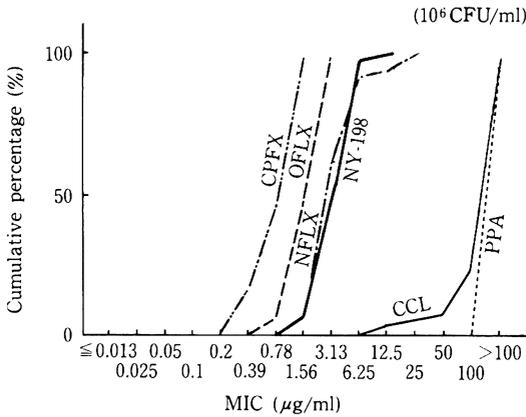


Fig. 7. Cumulative sensitivities of 37 clinical isolates of *E. faecalis* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

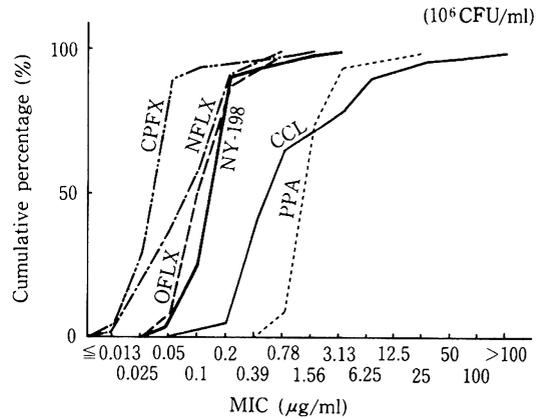


Fig. 10. Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *K. pneumoniae* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

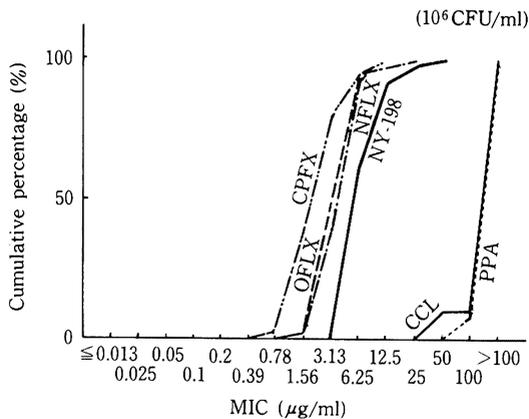


Fig. 8. Cumulative sensitivities of 41 clinical isolates of *E. faecium* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

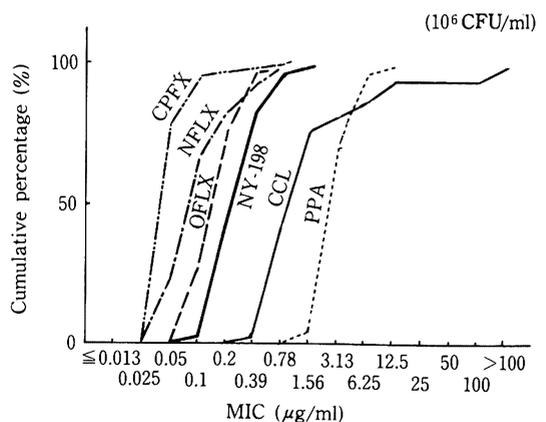


Fig. 11. Cumulative sensitivities of 48 clinical isolates of *P. mirabilis* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

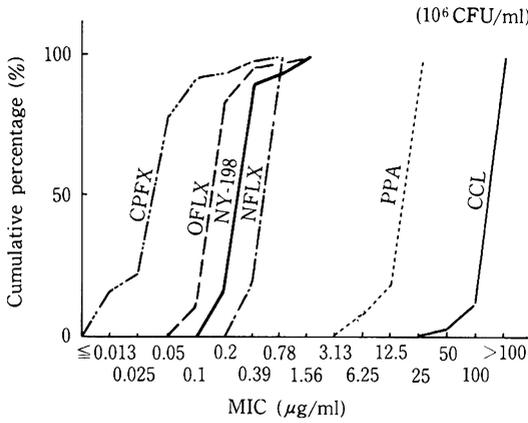


Fig. 12. Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. vulgaris* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

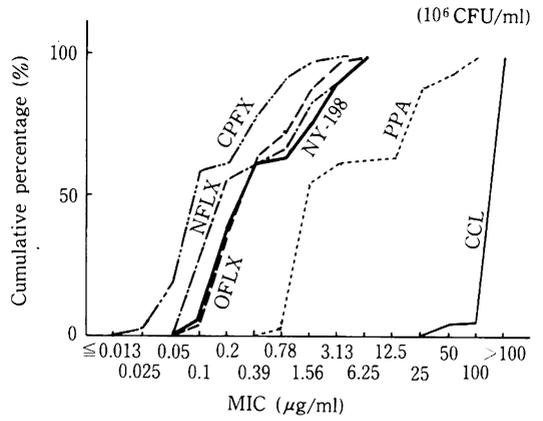


Fig. 15. Cumulative sensitivities of 49 clinical isolates of *S. marcescens* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

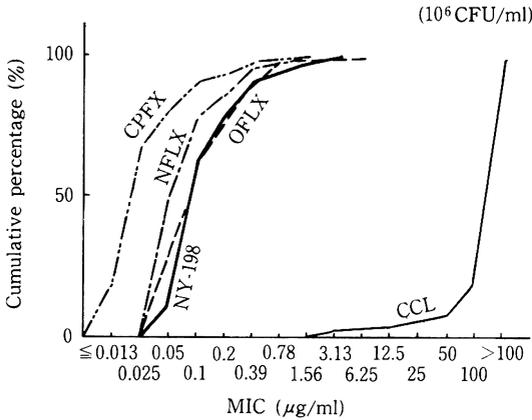


Fig. 13. Cumulative sensitivities of 51 clinical isolates of *M. morgani* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

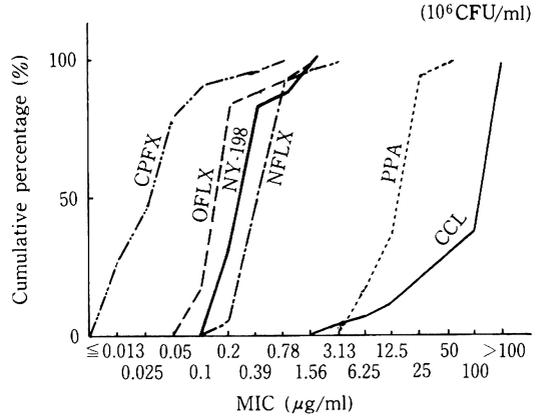


Fig. 16. Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *E. cloacae* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

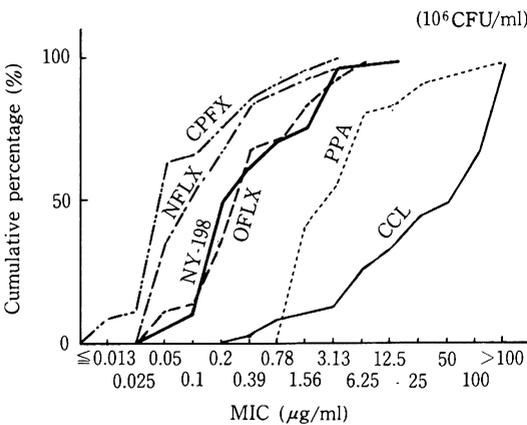


Fig. 14. Cumulative sensitivities of 38 clinical isolates of *P. rettgeri* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

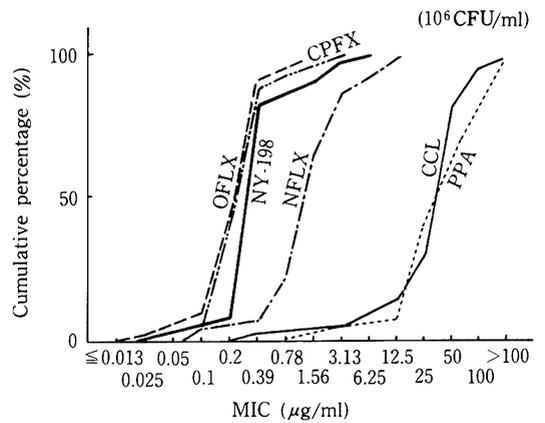


Fig. 17. Cumulative sensitivities of 45 clinical isolates of *A. calcoaceticus* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

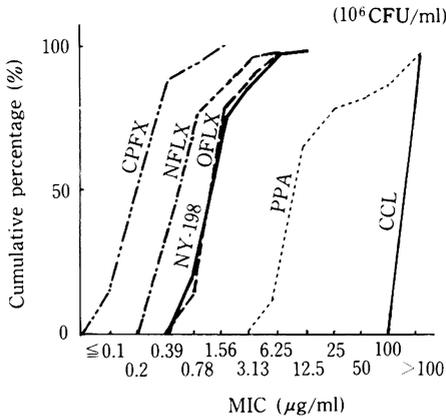


Fig. 18. Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *P. aeruginosa* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

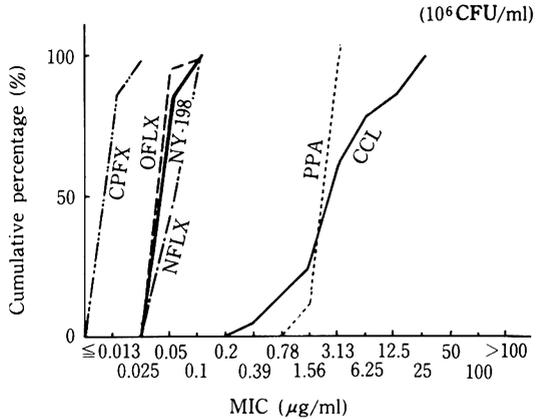


Fig. 21. Cumulative sensitivities of 27 clinical isolates of ABPC resistant *H. influenzae* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

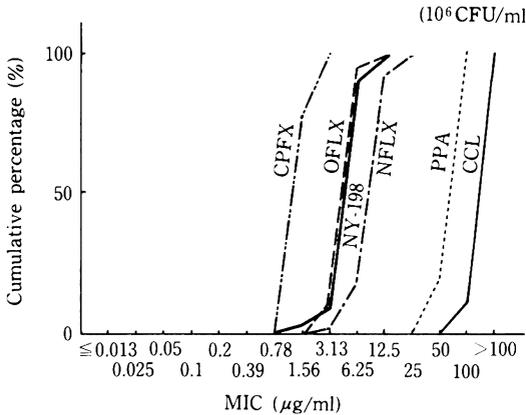


Fig. 19. Cumulative sensitivities of 40 clinical isolates of *P. cepacia* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

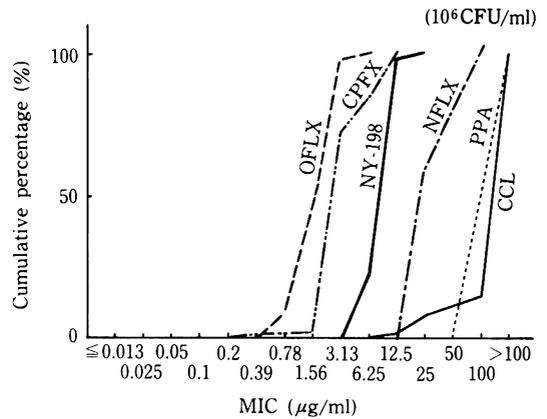


Fig. 22. Cumulative sensitivities of 50 clinical isolates of *B. fragilis* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

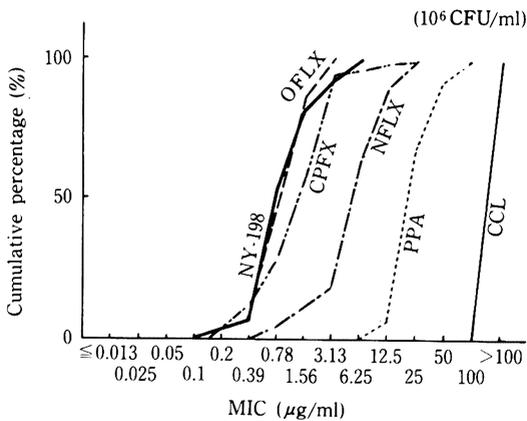


Fig. 20. Cumulative sensitivities of 54 clinical isolates of *X. maltophilia* to NY-198 and other chemotherapeutic agents

2. 細胞毒性

Fig.23, 24のとおり, CHO-K1細胞及び HeLa細胞に対する NY-198の毒性は比較的弱く, OFLX 同様10 μ g/mlまではほとんど影響せず, 100 μ g/mlで両細胞に対する増殖阻止効果がみられた。Clone 化されたヒト神経芽細胞 IMR32に対しても, NY-198は10 μ g/mlまで増殖に影響しなかった (Fig.25)。

一般に株化された腫瘍細胞より正常細胞の方がニューキノロンの影響を受けにくい。本剤も Fig.26及び27のとおりマウス及びヒト normal fibroblast には100 μ g/mlでも増殖阻止力は弱い。しかし OFLX よりは若干強い影響を示した。

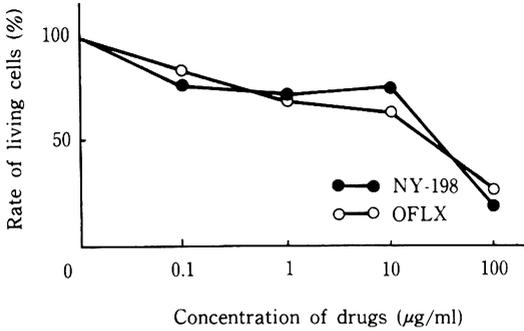


Fig. 23. Influence of NY-198 and OFLX on the growth of CHO-K1 cells

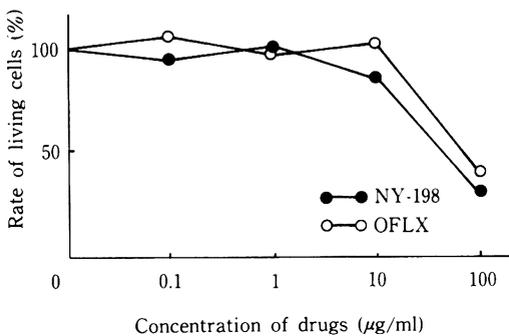


Fig. 24. Influence of NY-198 and OFLX on the growth of HeLa-cells

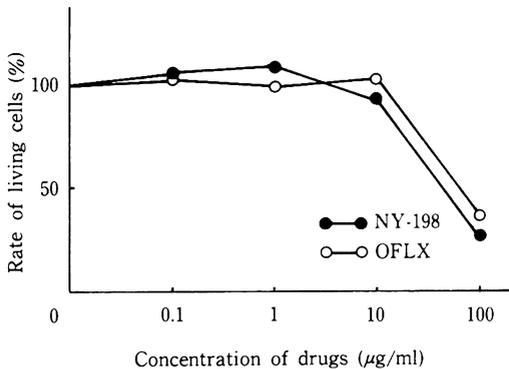


Fig. 25. Influence of NY-198 and OFLX on the growth of IMR 32 cells

3. 血清補体との協力的殺菌作用

E. coli NIHJ JC-2の増殖に影響を与えない最高量の補体に20%ヒト非働化血清を加え、それに ID₅₀の NY-198を共存させても、Fig.28に示すとおり ID₅₀の薬剤単独の場合に比べ、殺菌力はそれほど強くない。すなわち本剤と補体との協力的殺菌作用は見られなかった。

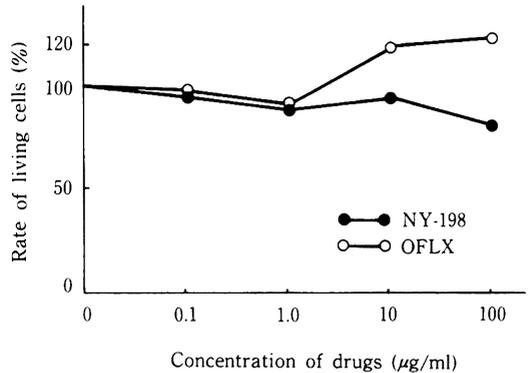


Fig. 26. Influence of NY-198 and OFLX on growth of mouse fibroblasts (primary culture)

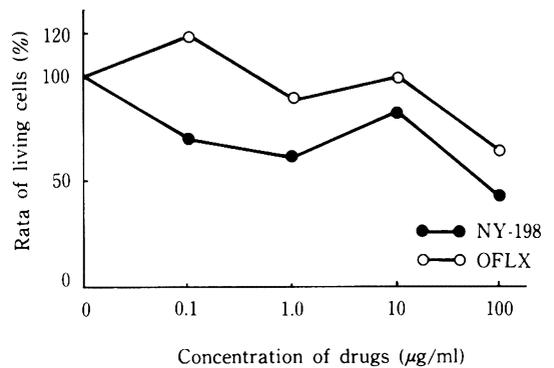


Fig. 27. Influence of NY-198 and OFLX on the growth of human fibroblasts (primary culture)

4. 白血球との協力的食菌殺菌作用

マウス培養 Mφ に *E. coli* NIHJ JC-2 を食菌させ5時間たつと Fig.29に示すとおり、薬剤非存在下では培養 Mφ は生体内ほどの力を持たないため、食菌された菌細胞は細胞内で増殖し、Mφ を破壊して遊出する。これに対し 1 MIC の NY-198 が共存すると Fig.30 のとおり DNA 合成が阻害されたため、核を一つだけ持って紡錘型にフィラメント化した細胞はよく食菌消化され、Mφ は正常にとどまる。この状態は Fig.31 に示す 1/4 MIC NY-198 存在下でも認められ食菌した菌細胞の消化が進み、Mφ は障害されない。写真は省略するが、1/8 MIC の NY-198 存在下でも同様で Mφ は障害されなかった。Fig.32 に示すとおり 1/16 MIC の NY-198 存在下では一部の Mφ は食菌した菌細胞を消化して健全にとどまるが、一部の Mφ は菌によって破壊される像が認められる。

III 考 察

NY-198の試験管内抗菌力は、*S. aureus*, MRSA, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *A. calcoaceticus* 及び *B. fragilis* には NFLX より抗菌力が強く、CPFX や OFLX にやや劣る。しかしレンサ球菌群では CPFX, OFLX, NFLX よりも抗菌力が弱く、内服剤としては臨床効果は期待しにくい。グラム陰性菌では、R 因子保有 *E. coli*, *P. mirabilis* では既存のニューキノロンにやや抗菌力は劣るが、*M. morganii*, *P. rettgeri*, *S. marcescens* 等では OFLX と同程度である。*P. aeruginosa* では NFLX, CPFX に劣るが、*P. cepacia* では NFLX より抗菌力が強い。

以上を考えると本剤はレンサ球菌、肺炎球菌の感染を除き、各種感染症に臨床効果が期待される。

NY-198の血清補体との協力作用は顕著でないが、培養マウス $M\phi$ は $1/8$ MIC の NY-198 存在下でも、ややフィラメント化した大腸菌細胞をよく食菌消化するので、本剤の体内動態が良ければ優れた臨床効果を示すであろう。又、本剤は $10\mu\text{g/ml}$ までヒトを含め各種培養細胞の増殖にほとんど影響しないので、分配率が脂溶性に傾いて脳血管関門を通過しやすいという性質がなければ、安全性も心配が少ない。

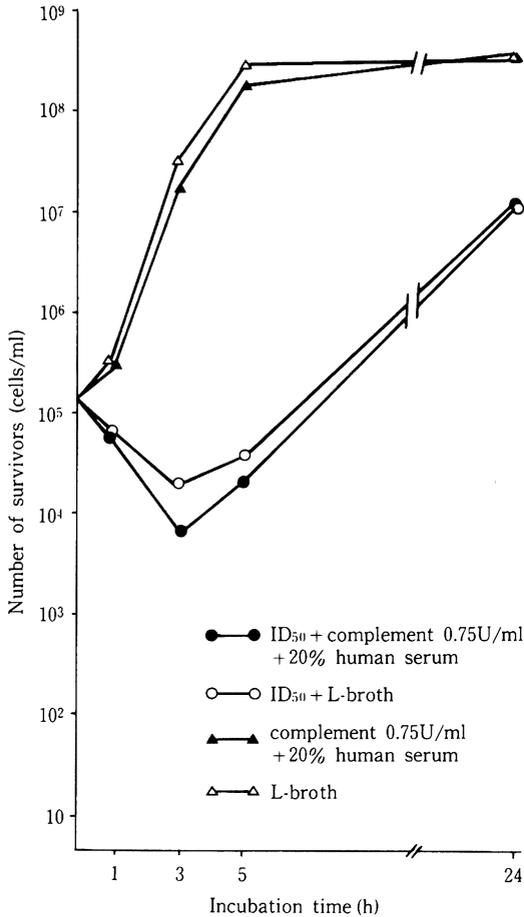


Fig. 28. Influence of JD_{50} of NY-198 ($0.079\mu\text{g/ml}$) on the bactericidal effect of serum complement against *E. coli* NIHJ JC-2

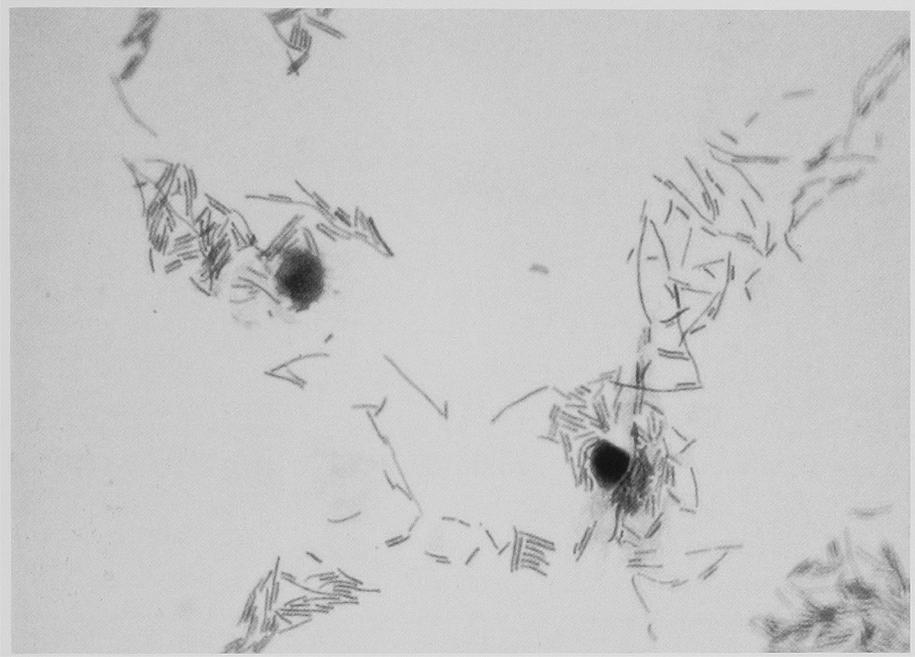


Fig. 29. Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown without drugs, at 5h after infection

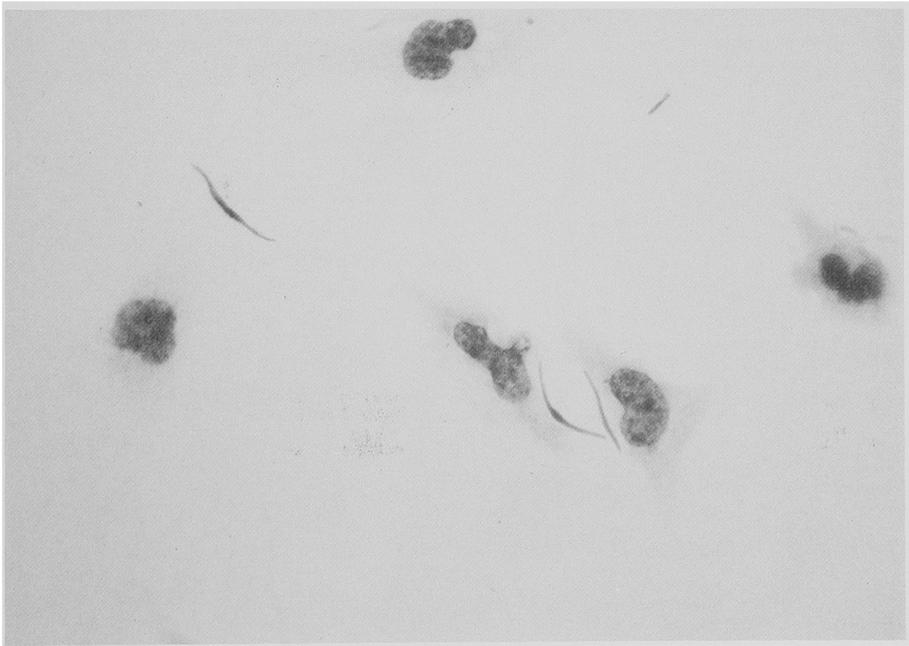


Fig. 30. Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1 MIC of NY-198, at 5h after infection

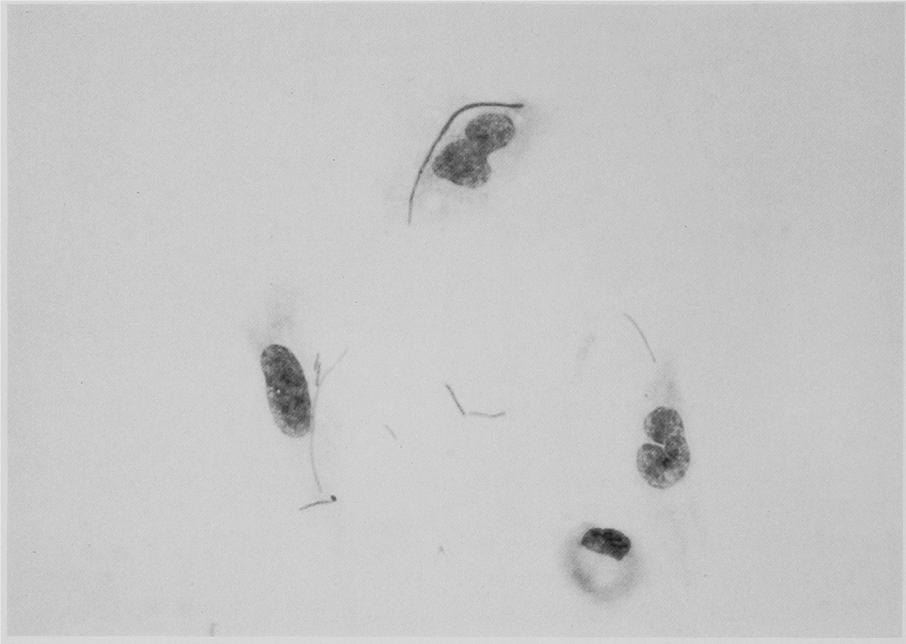


Fig. 31. Mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with $\frac{1}{4}$ MIC of NY-198, at 5h after infection

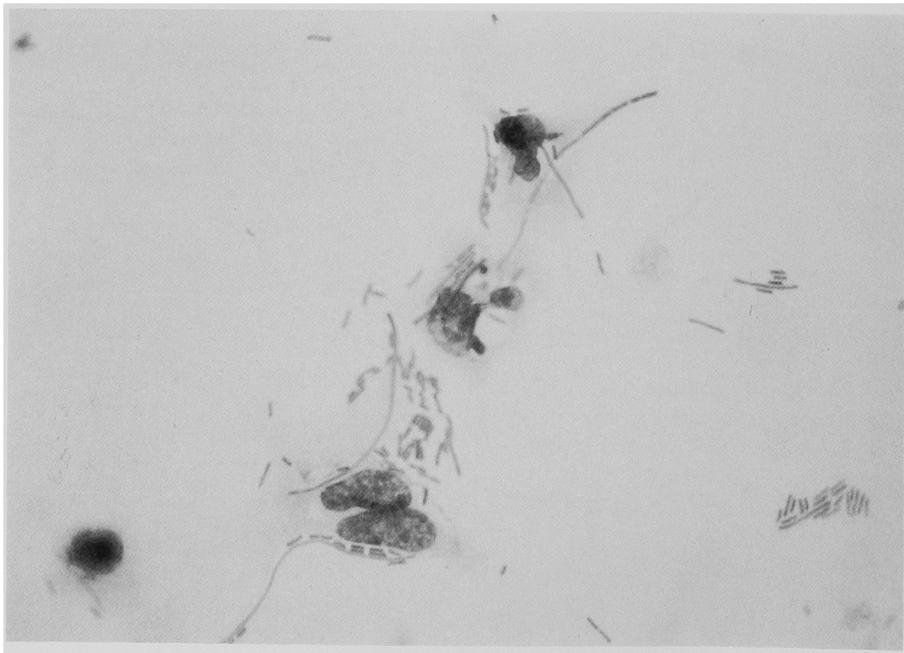


Fig. 32. Death of some mouse macrophages phagocytizing cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with $\frac{1}{16}$ MIC of NY-198, at 5h after infection

文 献

- 1) 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
- 2) LENNOX, E.S. : Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P 1. Virology 1 : 190~206, 1955
- 3) 横田 健, 関口玲子 : DL-8280の細胞毒性に関する研究。Chemotherapy 32 : 99~108, 1984
- 4) 横田 健, 関口玲子 : T-1982と血清・補体および白血球の協力的殺菌作用。Chemotherapy 30 : 20~27, 1982
- 5) NOZAWA, R.T. & T. YOKOTA : Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth) Cell. Physiol. 100 : 351~364, 1979

NY-198, A NOVEL NEW QUINOLONE : ITS *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY, CYTOTOXICITY FOR MAMMALIAN CELLS, AND SYNERGY OF BACTERICIDAL ACTIVITY WITH MOUSE-CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, EIKO SUZUKI and KYOKO ARAI

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo

MIC_{90s} of NY-198 against 14-54 clinical isolates of *S. aureus*, MRSA, *S. pneumoniae*, *E. coli* carrying R plasmids, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, ABPC-resistant *H. influenzae*, and *B. fragilis* were 0.78, 1.56, 12.5, 1.56, 1.56, 0.39, 3.13, 0.05, and 12.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. NY-198 manifested intermediate antibacterial activity between norfloxacin and ofloxacin. NY-198 did not affect the growth of cultured CHO-K1 cells, HeLa cells, human neuroblastoma IMR 32 cells, or primary culture of mouse fetal fibroblasts, up to 10 $\mu\text{g/ml}$, indicating that this agent is a rather weakly cytotoxic new quinolone.

Synergy of bactericidal effect between NY-198 and serum complement was not prominent, although mouse cultured macrophages engulfed well and rapidly digested cells of *E. coli*, which were converted to a spindle/filament shape, in the presence of higher than 1/8 MIC of NY-198, suggesting that NY-198 manifests good *in vivo* effect.