

Nocardia asteroides グループの tosufloxacin に対する種特異的
薬剤感受性パターンと¹⁴C-tosufloxacin の細胞への結合

矢沢 勝清・三上 襄・宇野 潤

千葉大学真核微生物研究センター*

松 前 昭 廣

北里大学

(平成元年9月13日受付・平成元年10月19日受理)

最近、開発されたピリドンカルボン酸系抗菌剤 tosufloxacin (T-3262) の臨床分離の *Nocardia* 特に *Nocardia asteroides* グループ (*N. asteroides* 12 株, *Nocardia farcinica* 9 株, *Nocardia nova* 8 株) に対する *in vitro* の活性を、4 種類の抗菌剤 (enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin) と比較検討した。その結果、tosufloxacin が最も強い活性を示した。*Nocardia* のこれら薬剤に対する感受性を比較した結果、*N. farcinica* が最も感受性が高く、*N. asteroides* の MIC 値は広い範囲に分布し、一方 *N. nova* は耐性傾向を示した。

¹⁴C-tosufloxacin を用いた実験の結果、*N. nova* と *N. farcinica* との感受性の違いは tosufloxacin の菌体への蓄積量の差によることが強く示唆された。

Key words: *Nocardia*, ピリドンカルボン酸, 抗菌活性, Tosufloxacin (T-3262), Labeled compound

Nocardia 症は日和見感染症と考えられ¹⁻³⁾、近年増加傾向にあり、本邦では全身性エリテマトーデス (SLE) などの患者で多発することが知られている。本症の治療にはサルファ剤や ST 合剤⁴⁾ が第一次薬剤として使用されている。しかし最近では、サルファ剤に対する耐性菌の出現や副作用のために、アミカシン^{5,6)} やミノサイクリン^{7,8)} による治療成績の報告も見られるが、新たな優れた薬剤の開発が *Nocardia* 症の増加とともに望まれている。*Nocardia* 症の中では、本邦においては、特に *Nocardia asteroides* グループ (以下では細分類によって新たに提案された *N. asteroides sensu stricto* を *N. asteroides* として両者を区別した) による感染症が多い。我々はすでに、アミノ配糖体抗生物質アーベカシンさらにはカルバペネム系抗生物質イミペネム、またフロモキシセフの病原性 *Nocardia* に対する感受性を検討し、それらの薬剤が *Nocardia* に対して強い活性を示すことを報告⁹⁻¹¹⁾ してきた。

一方、新たに登場してきたフッ素を含む新しいタイプのピリドンカルボン酸系抗菌剤はグラム陰性菌のみならずグラム陽性菌にまで抗菌スペクトルが拡大し、殺菌性が強く、病巣への移行性にすぐれ、上気道および呼吸器感染症まで適用できるようになってきた¹²⁾。さらにこれらのピリドンカルボン酸系の薬剤の中には ofloxacin のように臨

的に抗結核剤として優れた効果を発揮することが報告^{13,14)} されているものもあり、抗酸菌の近縁微生物によって起こる *Nocardia* 症に対して、これらピリドンカルボン酸系の薬剤が臨床応用される可能性が高いことから、最近開発された tosufloxacin を中心に ciprofloxacin, enoxacin および norfloxacin の病原性 *Nocardia* に対する *in vitro* の活性を検討してきた。その研究中に、*Nocardia* の薬剤感受性が、種に特異的なパターンを示すことを見いだしたので、臨床株を用いて詳細に検討した。また、そのメカニズムについても ¹⁴C-tosufloxacin を用いて検討した結果、*Nocardia* の種に特異的な感受性は tosufloxacin の取り込みによることを示唆するデータが得られたので報告する。

I. 実験材料および方法

1) 使用菌株

1981 年以降、本邦の医療機関より同定依頼を受けた臨床分離株から *N. asteroides* グループに属する放線菌 (*N. asteroides* 12 株, *Nocardia farcinica* 9 株および *Nocardia nova* 8 株) とそれぞれの標準株を含めて検討した。

2) 使用薬剤

Norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), ofloxacin (OFLX, 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX, バイ

エル薬品), tosusfloxacina (T-3262, 富山化学工業) はそれぞれの原末を, enoxacin (ENX) は当研究グループで合成したものを、DMSO または 0.1 N NaOH に溶解し、蒸留水で希釈して濃度を調整した。

3) 感受性測定法

被検菌液作製以外は化学療法学会標準法¹⁵⁾に準じ、感受性測定培地 (ニッスイ) を用いた寒天希釈法で行なった。被検菌液は前法⁹⁾に従い培養し、菌数を 10^6 CFU/ml に調整し接種菌液として用いた。菌液は薬剤添加培地にマイクロインキュレーター (Multipoint Inoculator A 400, Sussex, England) を用い、最終的にはスポットあたり約 10^4 個の CFU を接種し、27 °C、7 日間培養を行ない、肉眼的に菌の発育がまったく認められない最低濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

4) ^{14}C -T-3262 の菌体への結合量の測定

^{14}C -T-3262 (9.09 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; 富山化学工業) を使用した。使用菌株 (*N. farcinica* IFM 0284, *N. nova* 0290) は感受性測定と同様の方法で 4 日間培養し、遠心により集菌した。菌体はブレインハート液体培地 (BHI) に懸濁 (50 mg wet weight/ml) し、 ^{14}C -T-3262 を 0.18 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 添加し、32 °C で培養した。各時間ごとにガラスフィルター (Whatman GF/C) 上に集菌し、5% TCA にて洗浄後、ガラスフィルターを乾燥し、重量測定と放射能の測定を行なった。なおここでは、 ^{14}C -T-3262 の細胞内への取り込み、および単なる細胞への結合をふくめて結合量とした。

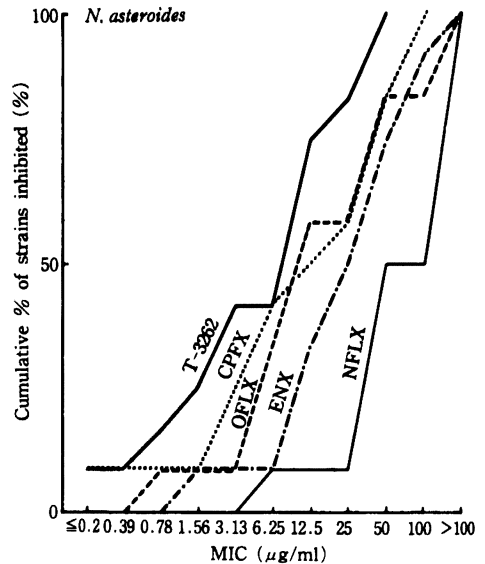
II. 実験成績

1) *N. asteroides* に対する抗菌活性

N. asteroides のピリドンカルボン酸系抗菌剤に対する MIC 分布を Fig. 1 に示した。MIC₇₀ で比較すると T-3262 が 11.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と最も強い活性を示し、次いで OFLX と CPFX が 36.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ENX が 45.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。Fig. 1 の感受性分布は 2 峰性を示すことから *N. asteroides* ではこれら薬剤に対し感受性と非感受性株が存在することが示唆された。

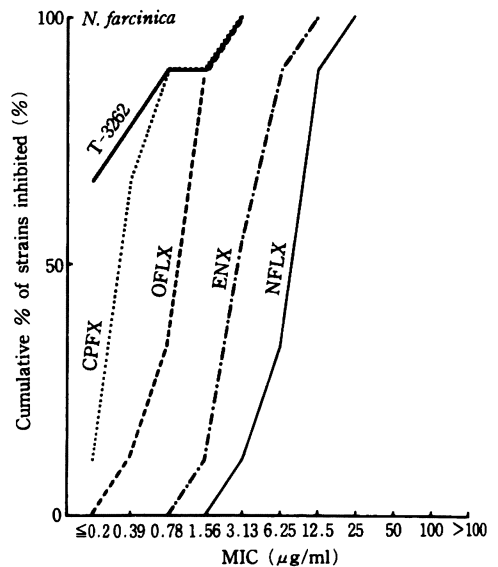
2) *N. farcinica* に対する抗菌活性

Fig. 2 に *N. farcinica* のこれら薬剤に対する感受性を示した。*N. farcinica* は全体にこれら試験した薬剤に対して高い感受性を示した。また *N. farcinica* に関しては、Fig. 2 に示した感受性分布は 1 峰性であり、耐性菌と思われる菌株は認められなかった。試験した薬剤の中で特に T-3262 は本菌種に強い活性を示し、次いで CPFX、OFLX の順に強い活性を示した。各々の MIC₇₀ 値は <0.39, 0.4 および 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これら 3 薬剤はすべての *N. farcinica* の菌株



T-3262 : tosusfloxacina, CPFX : ciprofloxacina,
OFLX : ofloxacina, ENX : enoxacina, NFLX : norfloxacina
N. asteroides : *Nocardia asteroides*

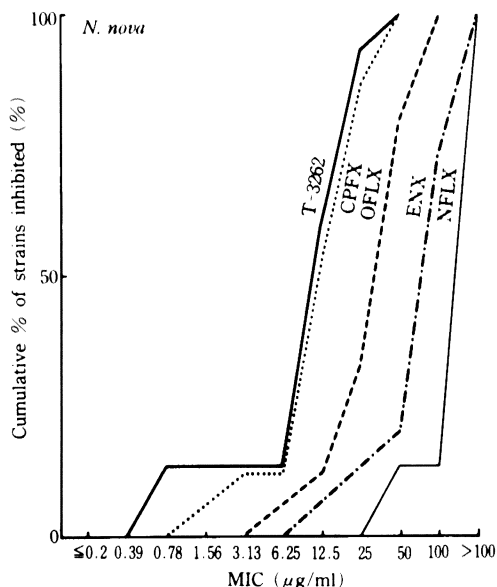
Fig. 1. Susceptibility of *Nocardia asteroides sensu stricto* to tosusfloxacina and other fluoroquinolones



T-3262 : tosusfloxacina, CPFX : ciprofloxacina,
OFLX : ofloxacina, ENX : enoxacina, NFLX : norfloxacina
N. farcinica : *Nocardia farcinica*

Fig. 2. Susceptibility of *Nocardia farcinica* to tosusfloxacina and other fluoroquinolones

に対していずれも 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で発育を阻止した。一方、ENX と NFLX は上記の薬剤よりやや



T-3262 : tosylfloxacin, CPFX : ciprofloxacin,
 OFLX : ofloxacin, ENX : enoxacin, NFLX : norfloxacin
N. nova : *Nocardia nova*

Fig. 3. Susceptibility of *Nocardia nova* to tosylfloxacin and other fluoroquinolones

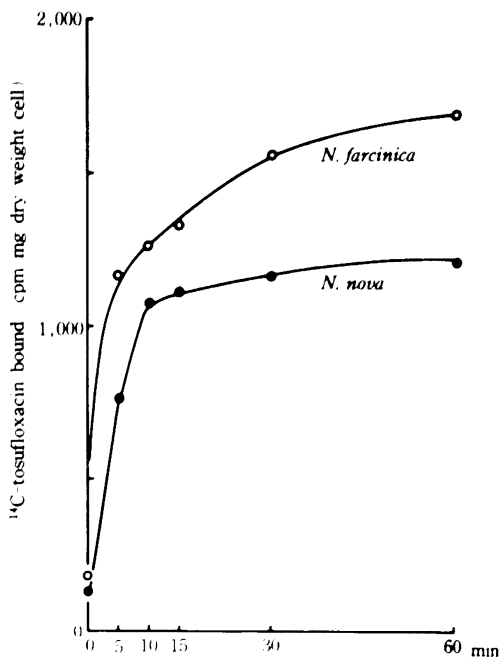
弱い活性を示し、その MIC₇₀ 値は ENX が 8.6 $\mu\text{g/ml}$ 、NFLX が 10.4 $\mu\text{g/ml}$ と、他の *Nocardia* に対する MIC₇₀ 値より低い値を示した。

3) *N. nova* に対する抗菌活性

N. nova のこれら薬剤に対する感受性を Fig. 3 に示した。*N. nova* は他の *Nocardia* と比較し高い MIC 分布を示した。MIC₇₀ 値で比較した場合、ENX 80.0, NFLX >100, OFLX 44.8, CPFX 18.6, T-3262 16.0 $\mu\text{g/ml}$ というようになりに高い MIC 値であった。またこれら薬剤のうち、T-3262, CPFX, NFLX は、2 峰性の感受性分布を示す傾向が見られた。

4) *N. farcinica* と *N. nova* における T-3262 の菌体への結合量の比較

T-3262 に感受性である *N. farcinica* IFM 0284 (MIC 0.78 $\mu\text{g/ml}$) および非感受性の *N. nova* IFM 0290 (MIC 25 $\mu\text{g/ml}$) 株を用いて T-3262 に対する感受性の差の原因を検討するため ¹⁴C で標識した T-3262 の菌体への結合量を調べる実験を行なった。その結果 Fig. 4 に示したように、T-3262 に非感受性の *N. nova* と感受性の *N. farcinica* では ¹⁴C-T-3262 の菌体への取り込み量に明かな差が観察された。すなわち、T-3262 に感受性が低い *N. nova* で



N. farcinica : *Nocardia farcinica*, *N. nova* *Nocardia nova*
 Fig. 4. Binding of ¹⁴C-tosylfloxacin to the cells of *Nocardia farcinica* (fluoroquinolone-sensitive species) and *N. nova* (fluoroquinolone-resistant species)

は ¹⁴C-T-3262 の菌体への結合および引き続いておこると考えられる細胞内への取り込み量が、少なく、一方 *N. farcinica* のように T-3262 に対して感受性が高いものでは、T-3262 の細胞への結合、さらに細胞内への取り込み量も多くなると思われる結果が得られた。

III. 考 察

ピリドンカルボン酸系薬剤の *Nocardia* に対する *in vitro* での抗菌活性についてはいくつか報告がみられる¹⁶⁻¹⁸⁾。それらの報告で、特に *N. asteroides* グループにおいて MIC 値がかなり幅広く分布するとされている。

Nocardia 症を最も多く引き起こす *N. asteroides* グループは、これまでその生理学的、生化学的性状において、かなりヘテロジナスな菌種であることが指摘¹⁹⁾されてきた。我々もすでに、薬剤感受性において同様の結果を報告²⁰⁾してきた。新しく出版された Bergey's Manual²¹⁾ではこれまでの *N. asteroides* グループを細分類し、*N. asteroides* と *N. farcinica* の 2 種にすべきであることが提案されている。また東村²²⁾は、新たに *N. asteroides* グループから、*N. nova* を

分けるべきであることを提案している。今回、我々はこれまでの *N. asteroides* グループを3種 (*N. asteroides*, *N. farcinica* および *N. nova*) に細分して検討した。その結果、*N. farcinica* では使用した各々のキノロン剤に対して、それぞれの MIC 値の分布がかなり狭い範囲に納まること、さらに *N. nova* の多くの株が、キノロン剤に対し非感受性で、他種の *Nocardia* と区別が可能なことなどが明らかとなり、これまでの *N. asteroides* グループが細分化により、より均一な種になったように思われる。また *N. farcinica* の菌株のすべてが T-3262, CPFIX, OFLX に対し感受性であること、さらに *N. nova* の大多数の菌株が使用したすべてのキノロン剤に対し非感受性であること等から、これら *Nocardia* の薬剤感受性は、耐性菌の出現によって影響を受けるものではなく、むしろ各 *Nocardia* 菌種に固有な“種特異的性質”であると考えられた。

ピリドンカルボン酸系抗菌剤の抗菌作用は DNA gyrase 活性の阻害²³⁾ および良好な膜透過性により発揮される²⁴⁾ といわれている。一方、耐性の発現のメカニズムは、標的酵素である DNA gyrase の変化と外膜の透過性の変化の2つが、関与していることが種々の細菌で証明されている^{23,24)}。 *N. farcinica* が極めて感受性が高く、*N. nova* のほとんどの菌株が耐性傾向(非感受性)を示すことが明らかになったことから、これらピリドンカルボン酸系の薬剤の *Nocardia* に対する活性の違いが、いかなる機構によるかを調べる目的で、まず¹⁴C 標識した T-3262 を用いて検討した。その結果、感受性である *N. farcinica* は非感受性である *N. nova* より多量の T-3262 を結合することが観察された。今回は、*Nocardia* に結合した¹⁴C-3262 が、実際に細胞のいかなる部位に結合しているかは検討しなかったが、TCA で細胞を洗浄していること等から考えると、今回の実験では、用いた¹⁴C-T-3262 の多くが細胞内まで、取り込まれているものと考えられる。したがって、すでに *Pseudomonas aeruginosa*^{25,26)} や *Escherichia coli*^{27,28)} で報告されているキノロン剤耐性と同様、*Nocardia* でも感受性の差が薬剤の取り込み量の違いにより発揮されている可能性が高いように思われる。なお現在、取り込み部位の詳細な検討を進めている。

東村は本邦ではこれまで *N. nova* による感染は確認できなかったとしているが²⁹⁾、我々が当研究室で同定した、多くの臨床分離株について検討した結果、本邦の *Nocardia* の感染症にも、*N. nova* による例がか

なりあることを確認しており、今後これらピリドンカルボン酸系の薬剤の臨床応用を検討する場合、今回に実験結果は考慮する必要があると思われる。

OFLX をはじめ、いくつかのピリドンカルボン酸系の薬剤が、結核菌に対して *in vitro* のみならず、臨床的にも有効であることが報告¹⁴⁾ されている。*Nocardia* 症の多くが、肺感染であり、さらに *Nocardia* と結核菌との間に多くの共通性があることより、これらキノロン剤が *Nocardia* 症の有効な治療薬になる可能性が高いと思われる。

謝 辞

この研究の一部は平成元年度科学研究費補助金(奨励研究(B))課題番号01921011の交付を受けて行なわれたものである。

文 献

- 1) SIMPSON G L, STINSON E B, EGGER M J, REMINGTON J S: *Nocardia* infections in the immunocompromised host; a detailed study in a defined population. Rev. Infect. Dis. 3: 492 ~ 507, 1981
- 2) BEAMAN B L, BURNSIDE J, EDWARD B, CAUSEY W: Nocardial infection in the United States, 1972-1974. J. Infect. Dis. 134: 286 ~ 289, 1976
- 3) STEVENS D A, PIER A C, BEAMAN B L, MOROZUMI P A, LOVETT I S, HOUANG E T: Laboratory evaluation of an outbreak of nocardiosis in immunocompromised host. Am. J. Med. 71: 928 ~ 934, 1981
- 4) SMEGO R A Jr, MOELLER M B, GALLIS H A: Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for *Nocardia* infections. Arch. Intern. Med. 143: 711 ~ 718, 1983
- 5) COCKERILL III F R, EDSON R S, ROBERTS G D, WALDORF J C: Trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Nocardia asteroides* causing multiple hepatic abscesses. Am. J. Med. 77: 558 ~ 560, 1984
- 6) MEIER B, METZGER U, MULLER F, SIEGENTHALER W, LUTHY R: Successful treatment of a pancreatic *Nocardia asteroides* abscess with amikacin and surgical drainage. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 150 ~ 151, 1986
- 7) BACH M C, MONACO A P, FINLAND M: Pulmonary nocardiosis. Therapy with minocycline and with erythromycin plus ampicillin. J. M. A. M., 224: 1378 ~ 1381, 1973
- 8) 森野正明, 甲能深雪, 吉川俊夫: 小児期ノカルジア症の2例. 日本小児科学会誌 87: 573 ~ 579, 1983
- 9) 矢沢勝清, 三上 襄, 音在清高, 新井 正: 病原性 *Nocardia* のアミノ配糖体抗性物質に対する感受性. Chemotherapy 36: 897 ~ 904, 1988

- 10) 矢沢勝清, 三上 真, 青在清高, 宇野 潤, 新井正: β -ラクタム系抗生物質, 特に imipenem の病原性 *Nocardia* に対する *in vitro* の抗菌作用. Jpn. J. Antibiot. : in press.
- 11) YAZAWA K, MIKAMI Y, UNO J, ARAI T: *In vitro* activity of flomoxef, a new oxacephem group antibiotic against *Nocardia*. J. Antimicrob. Chemother., 1989, in press.
- 12) DANIEL T W, FERNANDES P B: Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 131 ~ 135, 1989
- 13) LEYSEN D C, HAEMERS A, PATTYN S R: Mycobacteria and the new quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1 ~ 5, 1989
- 14) TSUKAMURA M, NAKAMURA E, YOSHII S, AMANO H: Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL-8280) on pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 131: 352 ~ 356, 1985
- 15) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. Chemotherapy 29: 76 ~ 79, 1981
- 16) GUTMANN L, GOLDSTEIN F W, KITZIS M D, HAUTEFORT B, DARMON C, ACAR J F: Susceptibility of *Nocardia asteroides* to 46 antibiotics, including 22 β -lactams. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 284 ~ 251, 1983
- 17) GOMBERT M E, AULICINO T M, Du BOUCHET L, BERKOWITZ L R: Susceptibility of *Nocardia asteroides* to new quinolones and β -lactams. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 2013 ~ 2014, 1987
- 18) AUCKENTHALER R, MICHEA-HAMZEHPUR M, PECHERE J C: *In vitro* activity of newer quinolones against aerobic bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 17: Suppl. B, 29 ~ 39, 1986
- 19) TSUKAMURA M: Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. J. Gen. Microbiol. 45: 253 ~ 273, 1969
- 20) MIKAMI Y, YAZAWA K: Susceptibility patterns of pathogenic *Nocardia* to some selected antimicrobial agents and its taxonomic implication. Bullet. Japan Federation for Culture Collections. 5: 89 ~ 95, 1989
- 21) LECHEVALIER H A: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Nocardiforms (SNEATH P H A ed), pp. 1458 ~ 1471, Williams & Wilkins 1986
- 22) TSUKAMURA M: Numerical analysis of the taxonomy of nocardiae and rhodococci. Division of *Nocardia asteroides sensu stricto* into two species and description of *Nocardia paratuberculosis* sp. nov. Tsukamura (formerly the Kyoto-I group of Tsukamura), *Nocardia nova* sp. nov. Tsukamura, *Rhodococcus aichiensis* sp. nov. Tsukamura, *Rhodococcus chubuensis* sp. nov. Tsukamura, and *Rhodococcus obuensis* sp. nov. Tsukamura. Microbiol. Immunol. 26: 1101 ~ 1119, 1982
- 23) SATO K, INOUE Y, YAMASHITA S, INOUE M, MITSUHASHI S: Inhibitory effects of ofloxacin and other new pyridone carboxylic acids on the activities of DNA gyrase isolated from *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacterioides fragilis*. P. 21 ~ 25. Ofloxacin: A new quinolone antibacterial agent. In MITSUHASHI S, DAIKOS G K (ed) Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy. University of Tokyo Press, 1986
- 24) HIRAI K, AOYAMA H, IRIKURA T, IYOBE S, MITSUHASHI S: Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 535 ~ 538, 1986
- 25) ROBILLARD N J, SCARPA A L: Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAD. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 535 ~ 539, 1988
- 26) LEGAKIS N J, TZOUVELEKIS L S, MAKRIAS A, KOTSIFAKI H: Outer membrane alteration in multi-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* selected by ciprofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 124 ~ 127, 1989
- 27) COHEN S P, HOOPER D C, WOLFSON J S, SOUZA K S, McMURRY L M, LEVY S B: Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1187 ~ 1191, 1988
- 28) HOOPER D C, WOLFSON J A, SOUZA K S, Ng E Y, McHUGH G L, SWARTZ M N: Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli*: Characterization of *nfxB* and *cfxB*, two mutant resistance loci decreasing norfloxacin accumulation. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 283 ~ 290, 1989
- 29) 東村道雄: *Nocardia* 感染症. 結核 63: 23 ~ 31, 1988

SPECIES-SPECIFIC SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF *NOCARDIA*
ASTEROIDES GROUP TO TOSUFLOXACIN, A NEW
FLUOROQUINOLONE AND BINDING PROFILES OF ¹⁴C-LABELLED
COMPOUND TO SENSITIVE AND NON-SENSITIVE *NOCARDIA* CELLS

KATSUKIYO YAZAWA, YUZURU MIKAMI and JUN UNO

Department of Experimental Chemotherapy, Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial
Toxicoses, Chiba University, 1-8-1, Inohana Chiba 280, Japan

AKIHIRO MATSUMAE
Kitasato University

The *in vitro* activity of tosufloxacin, a new fluoroquinolone, was compared with those of ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin and enoxacin against the *Nocardia asteroides* group (*N. asteroides sensu stricto*, *Nocardia nova* and *Nocardia farcinica*).

Tosufloxacin was the most active fluoroquinolone and, in general, two to five times more active than other quinolones. Among the *N. asteroides* group, *N. farcinica* was highly sensitive and *N. nova* was resistant to tosufloxacin.

The mechanisms of these species-specific susceptibility patterns of the *N. asteroides* group were further studied using ¹⁴C-labelled tosufloxacin.