

新キノロン系抗菌剤Fleroxacinのin vitro抗菌力

平井敬二・青山 博・庭田 寧・安江徳太郎
 福田秀行・鈴江清吾・入倉 勉
 杏林製薬株式会社 中央研究所*

新キノロン系抗菌剤である fleroxacin の *in vitro* 抗菌力について検討した。Fleroxacin は *Enterobacteriaceae*, *Neisseria* spp. 及び *Haemophilus influenzae* に対し強い抗菌力を示し、また、staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Branhamella catarrhalis* に対しても良好な抗菌活性が認められた。臨床分離株に対する fleroxacin の抗菌力は norfloxacin 及び ofloxacin と同程度であったが、ciprofloxacin よりは幾分劣っていた。なお、fleroxacin は methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* 及び gentamicin 耐性 *P. aeruginosa* に対しても優れた抗菌活性を示した。Fleroxacin の抗菌力は、培地の種類、培地の pH、接種菌量、金属イオンの添加及びヒト血清の添加による影響をほとんど受けなかった。MIC と MBC はほぼ一致していた。Fleroxacin は他のキノロン剤同様 *Escherichia coli* 及び *P. aeruginosa* から分離した DNA gyrase のスーパーコイリング活性を強く阻害した。Fleroxacin は大腸菌、緑膿菌、ブドウ球菌に対し良好な post antibiotic effect (PAE) を有していた。

Key words : Fleroxacin, キノロン, 抗菌力

Fleroxacin は、杏林製薬株式会社で合成された新キノロン系抗菌剤で、Fig. 1 に示す化学構造を有する。本剤は他の新キノロン剤同様幅広い抗菌スペクトルを示し、さらに優れた *in vivo* 効果を示すことが知られている¹⁾。

今回、我々は fleroxacin の臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌力について、最近臨床材料から分離された菌株も加え検討し、さらに fleroxacin の抗菌力に対する諸因子の影響、殺菌作用、DNA gyrase 阻害作用、及び post antibiotic effect について検討したので報告する。

I. 実験材料及び実験方法

1. 使用薬剤

Fleroxacin (Lot. No.830825, 830311 及び 840217), norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPF) 並びに pipemidic acid (PPA) は杏林製薬(株)で合成したものを使用した。Nalidixic acid (NA), gentamicin (GM), methicillin (DMPPC) は、市販品を使用した。

2. 使用菌株

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* は順天堂大学医学部細菌学教室、横田健教授より分与を受けた。*Branhamella catarrhalis* は長崎大学熱帯医学研究所内科、松本慶蔵教授より分与を受けた。標準菌株及び臨床分離株は当社中央研究所保存株を用いた。なお、臨床分離株は1979年から1989年の11年間に日本国内の病院で分離されたものである。

3. 感受性測定及び使用培地

日本化学療法学会標準法^{2,3)}に準じて最小発育阻止濃

度(MIC)を測定した。

感受性測定培地としては通常の場合 Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) を用いた。ただし、*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., 及び *Campylobacter jejuni* では10%馬血液を添加したMHAを用いた。また、*Neisseria* spp., *B. catarrhalis*, 及び *Haemophilus* spp. では熱変性させた馬血液を10%含むチョコレート寒天培地を使用した。嫌気性菌では GAM agar (日水製薬) を使用した。前培養培地としては主に Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) を用いたが、*Pseudomonas aeruginosa* の前培養に際しては MHB に KNO₃ を0.4% になるよう添加して使用した。また、*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. では Todd-Hewitt broth (Difco) を用いた。*Haemophilus* spp., *B. catarrhalis*, 及び嫌気性菌では、5% Fildes enrichment (Difco) を含む brain heart infusion broth (Difco) 及び GAM broth (日水製

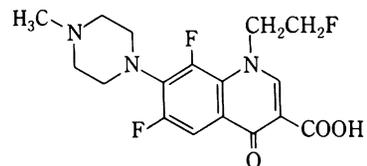


Fig. 1. Chemical structure of fleroxacin.

薬)をそれぞれ使用した。*Neisseria* spp.は上述の各感受性測定培地上に生育させた菌を約 10^8 CFU/mlになるように生理食塩水に懸濁させ使用した。

前培養菌液及び菌懸濁液はbuffered saline gelatin (BSG)で約 10^8 CFU/mlに希釈した。この菌希釈液を薬剤含有寒天平板に $5\mu\text{l}$ 接種し、 37°C で18時間培養を行い、被験菌の発育の認められない最小濃度をMICとした。ただし、*C. jejuni*は48時間培養後判定した。また、*Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *B. catarrhalis*及び*C. jejuni*はGas Pak system(BBL)を用いて、また嫌気性菌は嫌気的条件下でそれぞれ培養した。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

(1) 培地の種類

MHA, modified Mueller-Hinton agar(MMHA, 日本製薬), Trypto-soya agar(TSA, 日本製薬), Nutrient agar(NA, 日本製薬), Heart infusion agar(HIA, 日本製薬)及びBrain heart infusion agar(BHI, 日本製薬)の6種類の培地を用い、接種菌量を約 10^8 CFU/mlとしてMICを測定した。

(2) 培地のpH

MHAのpHを塩酸または水酸化ナトリウムを用いて調整し、約 10^8 CFU/mlの菌液を接種しMICを測定した。

(3) 金属イオン

MHAに塩化ナトリウム、塩化マグネシウム及び塩化カルシウムを添加してMICを測定した。接種菌量は約 10^8 CFU/mlとした。

(4) 接種菌量

37°C 一夜培養した菌液を菌量が約 $10^5\sim 10^8$ CFU/mlとなるように調整し、その $5\mu\text{l}$ を接種(最終接種菌量は $10^3\sim 10^7$ CFU/spot)してMICを測定した。

(5) 血清

ヒト血清(モントロールI)をMHBに50%となるように添加し、最終菌量が 10^8 CFU/mlとなるように接種して液体希釈法によりMICを測定した。

5. 最小殺菌濃度(MBC)の測定

試験菌をMHBで 37°C 、1夜培養した菌液を生理食塩水を用いて希釈し、2倍希釈系列の薬剤を含むMHBに 10^8 CFU/mlになるように接種した。 37°C 、18時間培養し、肉眼で濁りの有無を判定し濁りの認められない最小薬剤濃度をMICとした。MIC以上の各培養液をMHAに $5\mu\text{l}$ 接種し、 37°C 、18時間培養後、菌の生育の認められない最小薬剤濃度をMBCとした。

6. キノロン耐性変異株に対する抗菌力

キノロン剤に対する大腸菌の耐性機構としては、標的酵素であるDNA gyraseのAサブユニットの変異⁵⁾及び細菌菌体外膜タンパク質の欠失を伴う菌体内透過性変化⁶⁾

が考えられている。そこで、gyrA変異株及び外膜タンパク質欠失変異株に対するMICの測定を行った。

7. DNA gyrase阻害作用

DNA gyraseはSatoら⁴⁾の方法により大腸菌NIHJ JC-2及び緑膿菌PAO 1840株から分離した。DNA gyraseのスーパーコイル活性は、Topoisomerase I (BRL)により弛緩させたpBR322plasmid DNA($0.14\mu\text{g}$)を基質として 37°C で2時間反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、デンシトメーターによりDNAを定量することにより測定した。薬剤の阻害作用はDNA gyraseのスーパーコイル活性を50%阻害する濃度(IC₅₀)で比較した。

8. Post antibiotic effect(PAE)の測定

Chinらの報告する方法⁵⁾に準じてPAEの測定を行った。PAEは薬剤と菌を2時間接触後、薬剤をフィルター上で洗浄除去した菌が $1\log_{10}$ CFU/ml増殖するのに要する時間(T)と同様に洗浄した薬剤と接触していない菌が $1\log_{10}$ CFU/ml増殖するのに要する時間(C)との差として表わした[PAE(単位:h)=T-C]。

II. 実験結果

1. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床材料から分離された各種の菌株に対するfloxacinの抗菌力をNFLX, OFLX, 及びCPFXを対照薬剤として検討した。その結果をTable 1に示した。

S. aureus 34株に対するfloxacinのMIC₉₀はCPFXと同じ $0.78\mu\text{g/ml}$ を示した。OFLX及びNFLXのMIC₉₀は、それぞれ $0.39, 3.13\mu\text{g/ml}$ であった。Floxacinは、メチシリン耐性*S. aureus* 41株にもOFLX, CPFXとはほぼ同程度の抗菌力を示したが、最近増加しているキノロン耐性*S. aureus* 15株には他の新キノロン同様無効であった。*Staphylococcus epidermidis* 26株に対するfloxacin, NFLX, OFLX及びCPFXのMIC₉₀はそれぞれ $0.78, 1.56, 0.39, 0.39\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、キノロン耐性*S. epidermidis* 26株には4剤とも抗菌力を示さなかった。*Staphylococcus haemolyticus* 25株, *Staphylococcus hominis* 15株, *Staphylococcus saprophyticus* 8株に対する新キノロンのMIC分布は幅広くMIC₉₀も高値を示した。*Streptococcus pneumoniae* 15株, *S. pyogenes* 6株, *S. agalactiae* 4株, *Enterococcus faecalis* 14株, *E. faecium* 12株に対するfloxacinのMIC₅₀は $3.13\sim 12.5\mu\text{g/ml}$ とこれらの菌種に対する抗菌力は弱かった。

E. coli 26株に対しfloxacinは $0.10\mu\text{g/ml}$ で全ての菌株の生育を阻止した。Floxacinの抗菌力はNFLX, OFLXと同様であったが、CPFXより4倍劣っていた。*Klebsiella pneumoniae* 24株, *Enterobacter cloacae* 25株, *Citrobacter freundii* 12株, *Serratia marcescens* 25株に対するfloxacinのMIC₉₀は、それぞれ $1.56, 0.20, 1.56,$

Table 1-1. Antibacterial activities of fleroxacin and other quinolones against clinical isolates

Organism (No. of isolates)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Staphylococcus aureus</i> (34)	floxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.78
	norfloxacin	0.39 ~ 3.13	1.56	3.13
	ofloxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.78
Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (41)	floxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	3.13
	norfloxacin	0.39 ~ 25	1.56	12.5
	ofloxacin	0.20 ~ 1.56	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.20 ~ 3.13	0.78	3.13
	methicillin	25 ~ >100	50	>100
Quinolone-resistant <i>S. aureus</i> (15)	floxacin	3.13 ~ >100	25	>100
	norfloxacin	25 ~ >100	100	>100
	ofloxacin	1.56 ~ 50	12.5	50
	ciprofloxacin	3.13 ~ >100	25	>100
<i>S. epidermidis</i> (26)	floxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	0.78
	norfloxacin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
	ofloxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.39
Quinolone-resistant <i>S. epidermidis</i> (26)	floxacin	6.25 ~ >100	>100	>100
	norfloxacin	12.5 ~ >100	>100	>100
	ofloxacin	1.56 ~ >100	12.5	>100
	ciprofloxacin	1.56 ~ >100	50	>100
<i>S. haemolyticus</i> (25)	floxacin	0.39 ~ >100	6.25	25
	norfloxacin	0.39 ~ >100	12.5	100
	ofloxacin	0.20 ~ 50	1.56	12.5
	ciprofloxacin	0.20 ~ 100	1.56	12.5
<i>S. hominis</i> (15)	floxacin	0.39 ~ >100	0.78	>100
	norfloxacin	0.39 ~ >100	0.78	>100
	ofloxacin	0.20 ~ 100	0.39	50
	ciprofloxacin	0.10 ~ >100	0.39	100
<i>S. saprophyticus</i> (8)	floxacin	3.13 ~ >100	3.13	>100
	norfloxacin	0.78 ~ >100	1.56	>100
	ofloxacin	0.39 ~ 50	0.78	50
	ciprofloxacin	0.20 ~ 100	0.39	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (15)	floxacin	6.25 ~ 12.5	6.25	12.5
	norfloxacin	3.13 ~ 12.5	6.25	12.5
	ofloxacin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
<i>S. pyogenes</i> (6)	floxacin	6.25 ~ 12.5	6.25	12.5
	norfloxacin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	ofloxacin	1.56	1.56	1.56
	ciprofloxacin	0.39 ~ 0.78	0.39	0.78
<i>S. agalactiae</i> (4)	floxacin	6.25 ~ 12.5	6.25	12.5
	norfloxacin	3.13 ~ 6.25	6.25	6.25
	ofloxacin	1.56	1.56	1.56
	ciprofloxacin	0.39	0.39	0.39
<i>Enterococcus faecalis</i> (14)	floxacin	3.13 ~ 12.5	3.13	12.5
	norfloxacin	3.13 ~ 25	3.13	25
	ofloxacin	1.56 ~ 6.25	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	1.56

Table 1-2. Antibacterial activities of fleroxacin and other quinolones against clinical isolates

Organism (No. of isolates)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>E. faecium</i> (12)	floxacin	6.25 ~ 25	12.5	25
	norfloxacin	6.25 ~ 25	6.25	12.5
	ofloxacin	3.13 ~ 12.5	6.25	6.25
	ciprofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
<i>Escherichia coli</i> (26)	floxacin	0.05 ~ 0.10	0.05	0.10
	norfloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.10
	ofloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.10
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 0.05	0.025	0.025
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (24)	floxacin	0.10 ~ 1.56	0.20	1.56
	norfloxacin	0.10 ~ 1.56	0.20	1.56
	ofloxacin	0.10 ~ 1.56	0.20	1.56
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.39	0.05	0.39
<i>Enterobacter cloacae</i> (25)	floxacin	0.10 ~ 0.78	0.20	0.20
	norfloxacin	0.05 ~ 0.78	0.20	0.39
	ofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 0.10	0.025	0.05
<i>Citrobacter freundii</i> (12)	floxacin	0.10 ~ 12.5	0.10	1.56
	norfloxacin	0.05 ~ 6.25	0.05	1.56
	ofloxacin	0.10 ~ 6.25	0.10	1.56
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 1.56	0.025	0.20
<i>Serratia marcescens</i> (25)	floxacin	0.39 ~ 12.5	1.56	3.13
	norfloxacin	0.20 ~ 12.5	3.13	12.5
	ofloxacin	0.39 ~ 12.5	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.78	1.56
<i>Proteus vulgaris</i> (11)	floxacin	0.10 ~ 0.78	0.20	0.20
	norfloxacin	0.05 ~ 0.39	0.05	0.20
	ofloxacin	0.10 ~ 0.39	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.10	0.025	0.10
<i>P. mirabilis</i> (10)	floxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.20
	norfloxacin	0.05 ~ 0.39	0.05	0.10
	ofloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.20
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.10	0.025	0.05
<i>Morganella morganii</i> (13)	floxacin	0.05 ~ 0.10	0.05	0.10
	norfloxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.05
	ofloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.10
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 0.025	0.0125	0.025
<i>Providencia rettgeri</i> (11)	floxacin	0.10 ~ >100	12.5	25
	norfloxacin	0.05 ~ >100	50	100
	ofloxacin	0.10 ~ >100	6.25	25
	ciprofloxacin	0.0125 ~ >100	12.5	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (50)	floxacin	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	norfloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	1.56
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.10 ~ 0.78	0.20	0.39
Gentamicin-resistant <i>P. aeruginosa</i> (19)	floxacin	1.56 ~ 12.5	3.13	12.5
	norfloxacin	0.78 ~ 12.5	1.56	12.5
	ofloxacin	1.56 ~ 12.5	3.13	12.5
	ciprofloxacin	0.20 ~ 1.56	0.39	1.56
	gentamicin	25 ~ >100	100	>100

Table 1-3. Antibacterial activities of fleroxacin and other quinolones against clinical isolates

Organism (No. of isolates)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Quinolone-resistant				
<i>P. aeruginosa</i> (34)	fleroxacin	25 ~ >100	>100	> 100
	norfloxacin	12.5 ~ >100	50	>100
	ofloxacin	12.5 ~ >100	100	>100
	ciprofloxacin	3.13 ~ 100	25	50
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (13)	fleroxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	norfloxacin	6.25 ~ 25	12.5	25
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.78 ~ 6.25	3.13	6.25
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (17)	fleroxacin	0.20 ~ 0.39	0.39	0.39
	norfloxacin	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	ofloxacin	0.20 ~ 0.39	0.20	0.39
	ciprofloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.39
<i>Alcaligenes faecalis</i> (15)	fleroxacin	0.39 ~ 50	12.5	12.5
	norfloxacin	3.13 ~ >100	100	>100
	ofloxacin	0.78 ~ 50	25	25
	ciprofloxacin	0.78 ~ 100	25	25
<i>Flavobacterium</i> spp. (26)	fleroxacin	0.78 ~ >100	>100	>100
	norfloxacin	1.56 ~ >100	>100	>100
	ofloxacin	0.78 ~ >100	100	>100
	ciprofloxacin	0.78 ~ >100	100	>100
<i>Haemophilus influenzae</i> (16)	fleroxacin	0.05	0.05	0.05
	norfloxacin	0.05 ~ 0.10	0.05	0.10
	ofloxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.05
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 0.025	0.025	0.025
<i>Branhamella catarrhalis</i> (20)	fleroxacin	0.10 ~ 0.20	0.20	0.20
	norfloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.20
	ofloxacin	0.05 ~ 0.10	0.10	0.10
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.05	0.025	0.05
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (10)	fleroxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.05
	norfloxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.05
	ofloxacin	0.0125 ~ 0.025	0.0125	0.025
	ciprofloxacin	0.0063 ~ 0.0125	0.0063	0.0063
<i>N. meningitidis</i> (3)	fleroxacin	0.05	0.05	0.05
	norfloxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.05
	ofloxacin	0.0125 ~ 0.025	0.0125	0.025
	ciprofloxacin	0.0063	0.0063	0.0063
<i>Campylobacter jejuni</i> (21)	fleroxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.39
	norfloxacin	0.20 ~ 1.56	0.39	0.78
	ofloxacin	0.10 ~ 0.78	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.20	0.39
<i>Bacteroides fragilis</i> (23)	fleroxacin	6.25 ~ 50	6.25	50
	norfloxacin	25 ~ >100	100	>100
	ofloxacin	1.56 ~ 25	3.13	12.5
	ciprofloxacin	3.13 ~ >100	12.5	25

3.13 $\mu\text{g/ml}$ でありOFLXと同程度の抗菌力を示した。*Proteus mirabilis* 10株, *P. vulgaris* 11株, *Morganella morganii* 13株に対しfloxacinは, 0.10~0.78 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で全ての菌株の生育を阻したが, *Providencia rettgeri* 11株に対するfloxacin及びOFLXのMIC₉₀は25 $\mu\text{g/ml}$ であり, この菌種の新キノロンに対する感受性は低いものだった。

Pseudomonas aeruginosa 50株に対しfloxacinは1.56 $\mu\text{g/ml}$ のMIC₅₀を示し, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ で全ての菌株の生育を阻した。Floxacinの抗菌力はOFLXと同等であったが, NFLX, CPFXに比べるとやや劣っていた。Floxacinは, 他の新キノロン同様GM耐性*P. aeruginosa* 19株に対し良好な抗菌力を示したが, NFLXに12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上のMICを示すキノロン耐性*P. aeruginosa* 34株にはfloxacin, OFLX, CPFX共に無効であった。*Xanthomonas maltophilia* 13株, *Acinetobacter calcoaceticus* 17株, *Alcaligenes faecalis* 15株に対するfloxacinのMIC₉₀は, それぞれ3.13, 0.39, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。これらの菌種に対するfloxacinの抗菌力はOFLX, CPFXと同等かまたは多少優れていた。*Flavobacterium* spp.に対する新

キノロンの抗菌力は, 弱いものであった。Floxacinは他の新キノロン同様*Haemophilus influenzae* 16株, *Branhamella catarrhalis* 20株, *Neisseria gonorrhoeae* 10株, *N. meningitidis* 3株に対し, 0.05~0.20 $\mu\text{g/ml}$ で全菌種の全ての菌の発育を阻した。

Campylobacter jejuni 21株に対するfloxacinのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり, OFLXと同等の抗菌力を示した。*Bacteroides fragilis* 23株に対するfloxacinの抗菌力は, OFLXに比べ劣っていたがNFLXよりも優れており, ほぼCPFXと同程度のレベルであった。

2. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

Floxacinの抗菌力が培地の種類, 培地のpH, 接種菌量, 金属イオン及びヒト血清の添加により影響を受けるかについて各種菌株を用い検討した。Floxacinの抗菌力はTable 2~6に示すように, いずれの場合もMIC値の大きな変動はみられなかった。

3. 最小殺菌濃度(MBC)の測定

4菌種の臨床分離株10株を用い, 液体希釈法により測定したfloxacinのMICとMBCの関係をTable 7に示した。FloxacinのMIC₉₀とMBC₉₀は, *E. coli*で一致し, 他の菌

Table 2. Influence of various media on antibacterial activity of floxacin

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	MHA	MMHA	TSA	NA	HIA	BHIA
<i>S. aureus</i> 209P	0.20	0.20	0.20	0.10	0.20	0.20
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.05	0.10	0.05	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>P. vulgaris</i> IFO3167	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>S. marcescens</i> IID618	0.10	0.39	0.20	0.10	0.10	0.10
<i>P. aeruginosa</i> V-1	0.39	0.20	0.39	0.39	0.39	0.39

MHA: Mueller-Hinton agar (Difco)

MMHA: modified Mueller-Hinton agar (Nissui)

TSA: trypto-soya agar (Nissui)

NA: nutrient agar (Nissui)

HIA: heart infusion agar (Nissui)

BHIA: brain heart infusion agar (Nissui)

Table 3. Influence of medium pH on antibacterial activity of floxacin

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	pH	6	7	8	9
<i>S. aureus</i> 209P		0.20	0.20	0.20	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		0.10	0.05	0.05	0.10
<i>K. pneumoniae</i> IFO3512		0.05	0.05	0.05	0.10
<i>P. vulgaris</i> IFO3167		0.05	0.05	0.05	0.10
<i>S. marcescens</i> IID618		0.39	0.10	0.20	0.39
<i>P. aeruginosa</i> V-1		0.78	0.39	0.78	0.78

種でも2倍の差がみられるのみであった。

4. キノロン耐性変異株に対する抗菌力

大腸菌におけるキノロン耐性機構としては、DNA gyraseのAサブユニットの変異もしくはOmpFポアリンと呼ばれる菌体外膜タンパク質の欠失を伴う薬剤の菌体内透過性減少によることが知られている。そこで、DNA gyraseのAサブユニットの変異したgyrA変異株及びOmpF⁻、OmpC⁻変異株に対するfleroxacinの抗菌力を測定した(Table 8)。GyrA変異株である*E. coli* MH-5に対してNAは200 µg/mlと親株のKL-16に比べてMICが64倍上昇したが、fleroxacinは0.39 µg/mlと4倍の上昇にとどまった。この傾向は他の新キノロン剤と同様であった。

一方、OmpC⁻変異株である*E. coli* KE11に対しては、今回試験したいずれのキノロン剤においても親株であるCS109株と同一のMICを示した。しかしながら、OmpF⁻変異株であるKE7に対しては、全てのキノロン剤で親株に比べMIC値が2~4倍上昇した。

5. DNA gyraseに対する阻害作用

E. coli NIHJ JC-2及び*P. aeruginosa* PA01840から分離したDNA gyraseに対するキノロン剤の阻害作用について検討し、DNA gyraseのスーパーコイル活性を50%阻害する濃度(IC₅₀)をTable 9に示した。*E. coli*及び*P. aeruginosa*のDNA gyraseに対しfleroxacinはそれぞれ0.45及び20.1 µg/mlのIC₅₀を示した。これらの値は

Table 4. Influence of inoculum size on antibacterial activity of fleroxacin

Organism	MIC (µg/ml)				
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵ (CFU/spot)	10 ⁶	10 ⁷
<i>S. aureus</i> 209P	0.20	0.20	0.20	0.39	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.025	0.05	0.05	0.05	0.10
<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	0.025	0.025	0.05	0.05	0.05
<i>P. vulgaris</i> IFO3167	0.025	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>S. marcescens</i> IID618	0.10	0.10	0.10	0.10	0.39
<i>P. aeruginosa</i> V-1	0.39	0.39	0.39	0.78	1.56

Table 5. Influence of metal ions on antibacterial activity of fleroxacin

Organism	MIC (µg/ml)						
	none	NaCl(%)		MgCl ₂ (mM)		CaCl ₂ (mM)	
		0.5	2.0	0.5	5.0	0.5	5.0
<i>S. aureus</i> 209P	0.20	0.20	0.39	0.39	0.39	0.20	0.20
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>P. vulgaris</i> IFO3167	0.05	0.05	0.10	0.10	0.10	0.05	0.05
<i>S. marcescens</i> IID618	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>P. aeruginosa</i> IFO12689	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56

Table 6. Influence of human serum on antibacterial activity of fleroxacin

Organism	Human serum (%)	MIC (µg/ml)		
		fleroxacin	norfloxacin	ofloxacin
<i>S. aureus</i> 209P	0	0.39	0.78	0.39
	50	0.78	0.78	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0	0.05	0.05	0.05
	50	0.10	0.05	0.05
<i>P. aeruginosa</i> IFO12689	0	1.56	1.56	1.56
	50	3.13	1.56	1.56

Table 7. Comparison between MIC and MBC of fleroxacin and other quinolones against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		MBC ($\mu\text{g/ml}$)	
		range	MIC ₉₀	range	MBC ₉₀
<i>S. aureus</i> (10)	floxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.39 ~ 0.78	0.78
	ciprofloxacin	0.10 ~ 0.20	0.20	0.10 ~ 0.39	0.39
	ofloxacin	0.20 ~ 0.39	0.39	0.20 ~ 0.78	0.39
	norfloxacin	0.39 ~ 1.56	1.56	0.78 ~ 3.13	3.13
<i>E. coli</i> (10)	floxacin	0.05 ~ 0.10	0.10	0.05 ~ 0.20	0.10
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 0.025	0.025	0.025 ~ 0.05	0.025
	ofloxacin	0.05 ~ 0.10	0.10	0.05 ~ 0.20	0.10
	norfloxacin	0.05 ~ 0.10	0.05	0.05 ~ 0.10	0.10
<i>K. pneumoniae</i> (10)	floxacin	0.10 ~ 0.20	0.10	0.10 ~ 0.20	0.20
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.025 ~ 0.10	0.05
	ofloxacin	0.10 ~ 0.20	0.20	0.10 ~ 0.20	0.20
	norfloxacin	0.10 ~ 0.20	0.20	0.10 ~ 0.20	0.20
<i>P. aeruginosa</i> (10)	floxacin	0.78 ~ 1.56	1.56	1.56 ~ 3.13	3.13
	ciprofloxacin	0.10 ~ 0.20	0.20	0.20 ~ 0.39	0.39
	ofloxacin	0.78 ~ 1.56	1.56	0.78 ~ 3.13	3.13
	norfloxacin	0.39 ~ 0.78	0.78	0.78 ~ 1.56	1.56

Table 8. Antibacterial activity of fleroxacin and other quinolones against quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli*

Strains of <i>E. coli</i> :	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	floxacin	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin	pipemidic acid	nalidixic acid
KL-16 (wild type)	0.10	0.05	0.05	0.0125	1.56	3.13
MH-5 (<i>gyrA</i>)	0.39	0.39	0.39	0.10	25	200
CS109 (wild type)	0.05	0.05	0.05	0.0125	1.56	6.25
KE11 (Omp C ⁻)	0.05	0.05	0.05	0.0125	1.56	6.25
KE7 (Omp F ⁻)	0.10	0.20	0.20	0.05	6.25	12.5

Table 9. Antibacterial activity (MIC) versus inhibitory concentration (IC₅₀) of fleroxacin and other quinolones for the DNA gyrase supercoiling activity

Quinolone	DNA gyrase from:			
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>P. aeruginosa</i> PA01840	
	MIC ^{a)}	IC ₅₀ ^{a)}	MIC	IC ₅₀
Floxacin	0.05	0.45	0.78	20.1
Norfloxacin	0.05	0.64	0.78	19.0
Ofloxacin	0.025	0.33	0.78	19.5
Ciprofloxacin	0.0063	0.14	0.20	5.7
Pipemidic acid	0.78	40.1	12.5	317
Nalidixic acid	0.78	40.6	100	460

a) $\mu\text{g/ml}$

Table 10. PAEs induced by 2 h exposure to fleroxacin

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	PAE(h)				
		concn. of fleroxacin ($\mu\text{g/ml}$):				
		0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
<i>E. coli</i> ML4707	0.05	1.1	1.3	1.3	2.1	2.2
<i>P. aeruginosa</i> 183	1.56	0.4	0.4	0.5	1.6	1.6
<i>S. aureus</i> KYB623	0.39	0.4	0.4	0.5	0.8	1.1

NFLX及びOFLXと同程度であり、PPA、NAよりはるかに強い阻害活性であった。また、今回試験した薬剤の中ではCPFAXがIC₅₀及びMICともに最も低濃度であった。

6. Post antibiotic effect (PAE)の測定

E. coli ML4707, *P. aeruginosa* 183 及び *S. aureus* KYB623 に対する fleroxacin の各濃度における PAE を Table 10 に示した。PAE は、いずれの菌種においても観察された。Fleroxacin の濃度が 3.0 $\mu\text{g/ml}$ の場合は、*E. coli*, *P. aeruginosa* に対する PAE は、1.6~2.1h であったが、*S. aureus* では 0.8h と多少 *S. aureus* に対する PAE は弱いものであった。

Ⅲ. 考 察

Fleroxacin はグラム陽性菌から *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌にわたる幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有していた。その抗菌力は NFLX, OFLX と同程度であったが CPFAX よりは若干劣っていた。また GM 耐性 *P. aeruginosa*, メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) に対して他のキノロン剤同様 fleroxacin も良好な抗菌活性を示した。これらのことから、fleroxacin はこれらの耐性菌を起炎菌とした感染症にも効果が期待できると思われる。しかし、ニューキノロン耐性菌に対しては抗菌力を示さず、これらの菌に対する効果は期待できないと考えられた。

Fleroxacin は今回検討した諸因子の影響をほとんど受けず、安定した抗菌活性を示した。Fleroxacin の MIC と MBC は検討したいずれの菌でも差はほとんど認められず、その作用は殺菌的であることが示された。

NFLX を始めとする新キノロン剤の強い抗菌力は DNA の高次構造変換に関与する酵素である DNA gyrase 活性の阻害⁴⁾ 及び良好な菌体内透過性⁵⁾ により説明されている。Fleroxacin は他の新キノロン剤と同様に *E. coli* 及び *P. aeruginosa* 由来の DNA gyrase のスーパーコイル活性を強く阻害することにより、強い抗菌活性を示すものと思われる。また、DNA gyrase の A サブユニットをコードする *gyrA* 遺伝子の変異した MH-5 株並びに OmpF ポーリンの欠失した変異株 KE7 の fleroxacin に対する感受性

は、それぞれの親株に比べ、他の新キノロンの場合と同様に低下していた。この耐性変異株の感受性及び DNA gyrase 阻害作用の結果から、fleroxacin の作用機構は既存の新キノロン剤と同様と考えられた。

Fleroxacin は、種々の感染実験において良好な感染防禦効果や感染予防効果を示すことが知られている¹⁾。この優れた感染防禦効果は、fleroxacin の強い *in vitro* 抗菌力、PAE 並びに種々の実験動物での高い bioavailability⁷⁾ を反映した結果と考えられた。

このように fleroxacin は優れた *in vitro* 抗菌力を有する合成抗菌剤であり、各科領域の感染症治療への応用に期待がもたれる。

文 献

- HIRAI K, AOYAMA H, HOSAKA M, OMORI Y, NIWATA Y, SUZUE S, IRIKURA T : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 29 : 1059~1066, 1986
- MIC測定法改定委員会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改定について。*Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 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, 1981
- SATO K, INOUE Y, FUJII T, AOYAMA H, INOUE M, MITSUHASHI S : Purification and properties of DNA gyrase from a fluoro-quinolone resistant strain of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 30 : 777~780, 1986
- HIRAI K, AOYAMA H, IRIKURA T, IOYBE S, MITSUHASHI S : Difference in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 29 : 535~538, 1986
- CHIN N X, NEU H C : Post-antibiotic suppressive

effect of ciprofloxacin against gram-positive and gram-negative bacteria. *The American Journal of Medicine* 82(suppl 4A) : 58~62, 1987

7) KUSAJIMA H, ISHIKAWA N, MACHIDA M, UCHIDA H,

IRIKURA T : Pharmacokinetics of new quinolone, AM-833, in mice, rats, rabbits, dogs and monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 30 : 304~309, 1986

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FLEROXACIN

KEIJI HIRAI, HIROSHI AOYAMA, YASUSHI NIWATA, TOKUTAROU YASUE, HIDEYUKI FUKUDA,
SEIGO SUZUE and TSUTOMU IRIKURA

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.
2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-01, Japan

In vitro activity of fleroxacin against Gram-positive and -negative bacteria was determined. Fleroxacin showed potent activity against most enterobacteriaceae, *Neisseria* spp., and *Haemophilus influenzae* and good activity against staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Branhamella catarrhalis*. Against these bacteria, its activity was roughly comparable to that of norfloxacin and ofloxacin, but slightly less than that of ciprofloxacin. It also showed good activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and gentamicin-resistant *P. aeruginosa*. Neither the medium, variation in medium pH, inoculum size, nor the addition of cations or human serum, had any major effect on its activity. It was bactericidal at concentrations around the MIC. It also strongly inhibited the supercoiling activity of DNA gyrase purified from *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*. Fleroxacin produced an excellent postantibiotic effect (PAE) against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.