

新キノロンカルボン酸系合成抗菌剤Fleroxacinの細菌学的評価

青山 博・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

Fleroxacinの*in vitro*及び*in vivo*における抗菌力を他の新キノロン剤と比較検討した。

1. Fleroxacinはグラム陰性菌からグラム陽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、ほぼnorfloxacin(NFLX), ofloxacin(OFLX), enoxacin並びにlomefloxacin(LFLX)と同程度であった。
2. Fleroxacinはnalidixic acidやgentamicin耐性のグラム陰性菌並びにmethicillin耐性*Staphylococcus aureus*に対しても強い抗菌力を示した。
3. FleroxacinはMIC濃度で殺菌的に作用した。
4. Fleroxacinに対する自然耐性菌の出現頻度は低かった。
5. Fleroxacinは*Escherichia coli*由来のDNA gyraseの活性を強く阻害した。
6. Fleroxacinのマウス全身感染防禦効果はNFLXよりはるかに優れており、ciprofloxacin, OFLX及びLFLXと同等もしくはそれ以上の治療効果を示した。

Key words : Fleroxacin, 抗菌力, DNA gyrase

Fleroxacinは杏林製薬株式会社中央研究所において合成された新キノロンカルボン酸系の抗菌剤である。今回、fleroxacinの*in vitro*及び*in vivo*における抗菌作用をMIC, 殺菌作用, 自然耐性菌出現頻度, DNA gyrase阻害作用, 並びにマウス全身感染防禦効果により他の新キノロン剤と比較検討したので報告する。

I. 実験材料及び方法

1. 使用薬剤

Fleroxacin, norfloxacin(NFLX)は杏林製薬, ciprofloxacin(CPFX)はバイエル薬品, ofloxacin(OFLX), nalidixic acid(NA)は第一製薬, lomefloxacin(LFLX)は北陸製薬, enoxacin(ENX), pipemidic acid(PPA)は大日本製薬, gentamicin(GM)は塩野義製薬, methicillin(DMPPC)は萬有製薬よりそれぞれ分与を受けた。

2. 使用菌株

標準菌株並びに各臨床分離株は群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設の保存株を使用した。

3. 使用培地

感受性測定にはSensitive Disk Agar(SDA, 日水製薬)及びSensitive Test Broth(STB, 日水製薬)を使用した。なお, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* 及び*Enterococcus faecalis*の感受性測定の際には10%ウマ脱繊維血液(日本生物材料センター)を添加したSDA及び

Todd Hewitt Broth(Difco)を使用した。*Haemophilus influenzae*には5% Fildes Enrichment(Difco)を含むSDAを使用した。*Neisseria gonorrhoeae*ではチョコレート寒天培地を使用した。また嫌気性菌はGAM agar(日水製薬)及びGAM broth(日水製薬)を使用した。

4. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定

日本化学療法学会のMIC測定法¹²⁾に準じて行った。

5. 殺菌作用

i) 最小殺菌濃度(MBC)の測定

STBで37℃, 1晩培養した試験菌を2倍希釈系列の薬剤含有STBに接種した。37℃, 18時間培養後, 肉眼で濁度の有無を観察し, 濁りの認められない濃度をMICとした。さらに, MIC以上の薬剤濃度の培養液5 µlをマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて薬剤を含有していないSDAに接種し, 37℃, 18時間培養後, 生育してくる菌の有無を判定し, 菌の生育の認められない薬剤濃度をMBCとした。

ii) 増殖曲線に及ぼす薬剤の影響

STBで37℃, 1晩培養した試験菌を最終菌量が約10⁴ ~ 10⁵ CFU/mlになるように新鮮なSTBに接種し, 振とう培養を行った。培養2時間後に薬剤を添加したのち経時的にサンプリングし, 生菌数の測定を行って薬剤の影響を調べた。

* 〒370-01 群馬県勢多郡富士見村小暮2220

6. 自然耐性菌出現頻度

STBで37℃, 18時間培養した試験菌を2~4MIC濃度の薬剤を含むSDAに塗抹し, 37℃, 48時間後に生じたコロニー数を計数した。

7. 大腸菌KL-16株のDNA gyraseに対する阻害作用

DNA gyraseは*Escherichia coli* KL-16株から分離した。菌を振とう培養し, 対数増殖後期に集菌した。菌体を10mM Tris·HCl (pH7.5) -1mM EDTA-0.5mM dithiothreitol (TED buffer) で洗浄後, 同bufferに浮遊させ, -70℃に保存した。この菌浮遊液にリゾチーム, EDTA, Brij 58を加えて溶菌させ, 遠心した。その上清を硫酸ストレプトマイシンで除核酸後, 硫酸分画を行い, 粗酵素液を調製した。この粗酵素液をnovobiocin並びにheparinをリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによりDNA gyraseのA, Bサブユニットを分別分離した。DNA gyraseはATP存在下で弛緩型DNAを超らせん型DNAに変換させる酵素活性(スーパーコイリング活性)を有している³⁾。そこで, Topoisomerase I (BRL)により弛緩させたpBR322 plasmid DNAを基質とし, 37℃で2時間反応を行った。反応後0.8%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を定量し, 各薬剤のDNA gyraseのスーパーコイリング活性を50%阻害する濃度(IC₅₀)を求めた。

8. マウス全身感染防禦効果

ICR系雄性マウス(体重18~22 g, 4週齢)を1群10匹として使用した。Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco)で37℃, 1晩培養した菌液を適宜, BHIBで希釈し, 5% Mucin加生理食塩水に懸濁して接種菌液とした。ただし, *E. coli*の場合はMucinを添加しなかった。薬剤は0.2% carboxymethyl celluloseに懸濁し, マウス腹腔内に菌液を接種した直後に単回経口投与した。感染7日後の生存率からProbit法⁴⁾によりED₅₀値及び95%信頼限界を算出した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

Fleroxacinの標準菌株に対する抗菌力をOFLX, CPFX, NFLX, ENX, LFLX及びPPAを対照として比較検討し, Table 1に示した。

Fleroxacinは10⁶CFU/ml接種時において, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*や*Enterobacteriaceae*に対して0.05~0.39 µg/mlのMICを示した。また, *S. pyogenes*に対しては3.13 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa*には1.56 µg/ml以下のMICであった。Fleroxacinの抗菌力は, CPFXより若干劣るものの, はばOFLX, NFLXと同等であり, ENX, LFLXよりわずかに優れ, PPAよりも強かった。

以上のようにfleroxacinはグラム陰性菌及びグラム陽性菌に対し, 幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を示した。

2. 臨床分離株に対する抗菌力 (Table 2)

S. aureus 106株に対してfleroxacinは1.56 µg/mlで全ての菌株の発育を阻止し, その抗菌力はCPF_X, OFL_Xとほぼ同等であり, NFL_X, EN_X, LFL_Xより1~2管優れていた。

Staphylococcus epidermidis 107株に対するfleroxacinの抗菌力はOFL_X, CPF_Xより1~2管程度弱いMIC₉₀は0.78 µg/mlを示し, NFL_X, EN_X, LFL_Xより1管優れていた。

S. pneumoniae 21株に対し, fleroxacinはEN_X, LFL_X及びNFL_Xと同等の抗菌力を示し, MIC₉₀は12.5 µg/mlであった。この時のCPF_X, OFL_XのMIC₉₀は, 3.13 µg/mlであった。

S. pyogenes 96株では, fleroxacinのMIC₉₀はNFL_X, LFL_Xと同じ12.5 µg/mlを示した。この時のCPF_X, OFL_X及びEN_XのMIC₉₀は各々, 1.56, 3.13及び25 µg/mlであった。

E. faecalis 82株にfleroxacinは6.25 µg/mlのMIC₉₀を示し, NFL_Xと同じであった。

Enterococcus faecium 32株に対してfleroxacin, CPF_X, OFL_X, NFL_X, EN_X及びLFL_XのMIC₉₀は, それぞれ12.5, 3.13, 6.25, 12.5, 25及び12.5 µg/mlであった。

E. coli 95株, *Klebsiella pneumoniae* 50株及び*Klebsiella oxytoca* 48株に対するfleroxacinのMIC₉₀は0.20~0.39 µg/mlとほぼOFL_Xと同程度の抗菌力であった。

Enterobacter cloacae 95株と*Citrobacter freundii* 71株は今回使用した各キノロン剤に対し, 比較的幅広い感受性分布を示した。これらの株に対し, fleroxacinは0.78~1.56 µg/mlのMIC₉₀を示し, OFL_X, NFL_X, EN_X及びLFL_Xとほぼ同程度の抗菌力であった。

Serratia marcescens 113株は, さらに幅広い感受性分布を示し, fleroxacinのMIC値は0.05~>100 µg/mlと幅広かった。この傾向は他のキノロン剤も同様であり, 本菌種に対するfleroxacinの抗菌力はOFL_X, NFL_X, EN_X及びLFL_Xと同程度であった。

Proteus mirabilis 84株, *Proteus vulgaris* 78株, *Providencia rettgeri* 59株並びに*Morganella morganii* 85株に対するfleroxacinのMIC₉₀は各々0.39, 0.10, 6.25及び0.39 µg/mlであった。

Shigella spp. 108株及び*Salmonella* spp. 108株に対して, fleroxacinのMIC₉₀は0.20 µg/mlと比較的低濃度であった。

P. aeruginosa 95株に対してfleroxacinは3.13 µg/mlの

Table 1. Antibacterial activity of fleroxacin and other quinolones against standard strains

Organism	MIC (μg/ml)											
	floxacin		ofloxacin		ciprofloxacin		norfloxacin		enoxacin		lomefloxacin	
	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸
<i>S. aureus</i> FDA209 JC-1	0.39	0.39	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.20	0.39	0.39	0.78	0.78
<i>S. aureus</i> TERAJMA	0.39	0.39	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78
<i>S. pyogenes</i> COOK	3.13	6.25	0.39	0.78	0.39	0.39	0.78	1.56	12.5	12.5	6.25	12.5
<i>M. luteus</i> ATCC9341	6.25	12.5	3.13	6.25	1.56	3.13	12.5	25	12.5	25	6.25	100
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	0.10	0.20	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.20	0.20	0.39	0.39	100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.05	0.05	0.0125	0.0125	0.10	0.10	0.20	0.20	0.39	3.13
<i>E. coli</i> K-12 C600	0.10	0.20	0.10	0.10	0.025	0.05	0.10	0.10	0.20	0.20	0.39	1.56
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.05	0.05	0.025	0.025	0.0125	0.0125	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	3.13
<i>S. typhimurium</i> IID971	0.10	0.20	0.05	0.10	0.025	0.05	0.10	0.20	0.20	0.20	0.39	1.56
<i>S. typhi</i> 901	0.05	0.05	0.0125	0.0125	0.006	0.0125	0.05	0.05	0.10	0.10	0.20	1.56
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.05	0.05	<0.006	0.0125	<0.003	0.006	0.025	0.05	0.05	0.05	0.05	0.78
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.20	0.20	0.10	0.10	0.025	0.05	0.10	0.20	0.20	0.39	0.39	1.56
<i>S. enteritidis</i> G14	0.05	0.05	<0.006	0.0125	<0.003	<0.003	0.025	0.05	0.05	0.05	0.05	0.78
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0.39	0.39	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.20	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	1.56	1.56	1.56	1.56	0.39	0.39	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	25
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	0.78	0.78	0.78	1.56	0.20	0.20	0.78	0.78	0.78	0.78	3.13	12.5
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.78	0.78	0.78	0.78	0.10	0.10	0.39	0.78	0.78	0.78	1.56	12.5
<i>M. morgani</i> IFO3848	0.05	0.05	0.025	0.05	0.0125	0.0125	0.05	0.10	0.10	0.10	0.20	1.56
<i>P. mirabilis</i> IFO3849	0.39	0.39	0.20	0.39	0.10	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	0.78	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.05	0.05	0.0125	0.025	0.0125	0.025	0.05	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.05	0.05	0.0125	0.0125	<0.003	0.006	0.025	0.05	0.05	0.05	0.05	3.13
<i>P. rettgeri</i> IFO3850	0.39	0.78	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	0.20	0.20	0.20	0.20	0.05	0.05	0.20	0.39	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>E. cloacae</i> 963	0.20	0.20	0.10	0.10	0.05	0.05	0.10	0.10	0.39	0.39	0.39	1.56

Agar dilution method, inoculum size: one loopful (5 μl) of 10⁶ or 10⁸ CFU/ml

Table 2-1. Antibacterial activity of fleroxacin and reference drugs against clinical isolates

Isolate (no. of strains)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		range		50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> (106)	floxacin	0.39	~ 1.56	0.39	0.78
	norfloxacin	0.39	~ 12.5	1.56	3.13
	ofloxacin	0.20	~ 1.56	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.20	~ 3.13	0.39	0.78
	enoxacin	0.78	~ 6.25	1.56	3.13
	pipemidic acid	12.5	~ >100	50	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (107)	floxacin	0.10	~ 6.25	0.78	0.78
	norfloxacin	0.10	~ 6.25	0.78	1.56
	ofloxacin	0.10	~ 1.56	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.05	~ 0.78	0.20	0.39
	enoxacin	0.20	~ 6.25	0.78	1.56
	pipemidic acid	3.13	~ >100	25	50
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (21)	floxacin	6.25	~ 25	12.5	12.5
	norfloxacin	6.25	~ 25	12.5	25
	ofloxacin	1.56	~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.78	~ 3.13	1.56	3.13
	enoxacin	6.25	~ 50	12.5	12.5
	pipemidic acid	100	~ >100	>100	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> (96)	floxacin	3.13	~ 50	3.13	12.5
	norfloxacin	0.78	~ 25	1.56	12.5
	ofloxacin	0.78	~ 25	0.78	3.13
	ciprofloxacin	0.20	~ 12.5	0.39	1.56
	enoxacin	1.56	~ 50	12.5	25
	pipemidic acid	50	~ >100	>100	>100
<i>Enterococcus faecalis</i> (82)	floxacin	0.78	~ 12.5	3.13	6.25
	norfloxacin	0.78	~ 50	6.25	6.25
	ofloxacin	0.78	~ 12.5	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.20	~ 12.5	0.78	1.56
	enoxacin	1.56	~ 50	6.25	12.5
	pipemidic acid	100	~ >100	>100	>100
<i>Enterococcus faecium</i> (32)	floxacin	1.56	~ 12.5	6.25	12.5
	norfloxacin	1.56	~ 12.5	3.13	12.5
	ofloxacin	0.78	~ 12.5	3.13	6.25
	ciprofloxacin	0.39	~ 6.25	1.56	3.13
	enoxacin	3.13	~ 25	6.25	25
	pipemidic acid	100	~ >100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> (95)	floxacin	0.05	~ 1.56	0.10	0.20
	norfloxacin	0.0125	~ 0.78	0.05	0.10
	ofloxacin	0.05	~ 1.56	0.10	0.39
	ciprofloxacin	≤ 0.006	~ 0.39	0.0125	0.05
	enoxacin	0.05	~ 3.13	0.20	0.39
	pipemidic acid	0.78	~ 25	1.56	3.13
<i>Escherichia coli</i> (95)	floxacin	0.05	~ 3.13	0.20	0.39
	lomefloxacin	0.05	~ 3.13	0.20	0.39

Table 2-2. Antibacterial activity of fleroxacin and reference drugs against clinical isolates

Isolate (no. of strains)	Drug	MIC (μg/ml)			
		range		50%	90%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (50)	fleroxacin	0.05	~ 3.13	0.20	0.39
	norfloxacin	0.05	~ 6.25	0.20	0.39
	ofloxacin	0.05	~ 6.25	0.20	0.39
	ciprofloxacin	≦0.006	~ 1.56	0.05	0.10
	enoxacin	0.10	~ 6.25	0.39	0.78
	pipemidic acid	0.78	~ 50	3.13	6.25
	lomefloxacin	0.05	~ 6.25	0.20	0.39
<i>Klebsiella oxytoca</i> (48)	fleroxacin	0.05	~ 0.39	0.10	0.20
	norfloxacin	0.05	~ 0.78	0.10	0.20
	ofloxacin	0.05	~ 0.39	0.20	0.20
	ciprofloxacin	0.0125	~ 0.20	0.05	0.05
	enoxacin	0.10	~ 1.56	0.20	0.39
	pipemidic acid	0.78	~ 12.5	0.78	3.13
	lomefloxacin	0.10	~ 0.78	0.20	0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> (95)	fleroxacin	0.05	~ 3.13	0.10	0.78
	norfloxacin	0.025	~ 6.25	0.10	0.39
	ofloxacin	0.05	~ 3.13	0.10	0.78
	ciprofloxacin	≦0.006	~ 1.56	0.025	0.10
	enoxacin	0.10	~ 12.5	0.39	1.56
	pipemidic acid	0.78	~ >100	1.56	12.5
	lomefloxacin	0.10	~ 6.25	0.20	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> (71)	fleroxacin	0.025	~ 25	0.20	1.56
	norfloxacin	0.025	~ 6.25	0.20	0.78
	ofloxacin	0.05	~ 12.5	0.20	1.56
	ciprofloxacin	≦0.006	~ 3.13	0.025	0.20
	enoxacin	0.05	~ 12.5	0.20	1.56
	pipemidic acid	0.78	~ 100	3.13	25
	lomefloxacin	0.10	~ 12.5	0.39	1.56
<i>Serratia marcescens</i> (113)	fleroxacin	0.05	~ >100	1.56	12.5
	norfloxacin	0.05	~ >100	1.56	25
	ofloxacin	0.05	~ 100	1.56	12.5
	ciprofloxacin	0.0125	~ 100	0.39	6.25
	enoxacin	0.20	~ >100	3.13	25
	pipemidic acid	1.56	~ >100	12.5	>100
	lomefloxacin	0.20	~ >100	1.56	25
<i>Proteus mirabilis</i> (84)	fleroxacin	0.10	~ 1.56	0.20	0.39
	norfloxacin	0.05	~ 0.78	0.05	0.39
	ofloxacin	0.05	~ 1.56	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.0125	~ 0.39	0.025	0.10
	enoxacin	0.20	~ 3.13	0.39	0.78
	pipemidic acid	1.56	~ 25	3.13	6.25
	lomefloxacin	0.20	~ 3.13	0.39	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> (78)	fleroxacin	0.05	~ 0.39	0.10	0.10
	norfloxacin	0.025	~ 0.10	0.05	0.05
	ofloxacin	0.025	~ 0.20	0.05	0.10
	ciprofloxacin	≦0.006	~ 0.05	0.025	0.025
	enoxacin	0.05	~ 0.78	0.20	0.39
	pipemidic acid	1.56	~ 6.25	1.56	3.13
	lomefloxacin	0.05	~ 0.78	0.20	0.39

Table 2-3. Antibacterial activity of fleroxacin and reference drugs against clinical isolates

Isolate (no. of strains)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	50%	90%
<i>Providencia rettgeri</i> (59)	floxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	6.25
	norfloxacin	0.025 ~ 12.5	0.39	6.25
	ofloxacin	0.05 ~ 25	0.78	12.5
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 6.25	0.10	1.56
	enoxacin	0.10 ~ 25	1.56	12.5
	pipemidic acid	0.78 ~ >100	6.25	100
	lomefloxacin	0.39 ~ 50	1.56	12.5
<i>Morganella morganii</i> (85)	floxacin	0.0125 ~ 6.25	0.10	0.39
	norfloxacin	0.0125 ~ 6.25	0.05	0.20
	ofloxacin	0.0125 ~ 6.25	0.10	0.39
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 3.13	0.025	0.10
	enoxacin	0.0125 ~ 6.25	0.20	0.78
	pipemidic acid	0.20 ~ 25	1.56	3.13
	lomefloxacin	0.0125 ~ 6.25	0.39	1.56
<i>Shigella</i> spp. (108)	floxacin	0.0125 ~ 0.39	0.05	0.20
	norfloxacin	≤ 0.006 ~ 0.20	0.0125	0.025
	ofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.39	0.0125	0.025
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.05	≤ 0.006	≤ 0.006
	enoxacin	0.0125 ~ 0.78	0.05	0.05
	pipemidic acid	0.39 ~ 25	1.56	1.56
	lomefloxacin	≤ 0.006 ~ 0.78	0.05	0.05
<i>Salmonella</i> spp. (108)	floxacin	0.05 ~ 0.39	0.10	0.20
	norfloxacin	0.0125 ~ 0.05	0.025	0.025
	ofloxacin	0.0125 ~ 0.10	0.025	0.05
	ciprofloxacin	≤ 0.006	≤ 0.006	≤ 0.006
	enoxacin	0.05 ~ 0.20	0.05	0.10
	pipemidic acid	1.56 ~ 6.25	1.56	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (95)	floxacin	0.10 ~ 6.25	0.78	3.13
	norfloxacin	0.10 ~ 6.25	0.78	3.13
	ofloxacin	0.10 ~ 12.5	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.025 ~ 1.56	0.20	0.39
	enoxacin	0.10 ~ 6.25	0.78	3.13
	pipemidic acid	1.56 ~ 100	12.5	50
	lomefloxacin	0.10 ~ 12.5	1.56	6.25
<i>Pseudomonas cepacia</i> (51)	floxacin	0.39 ~ 50	12.5	25
	norfloxacin	1.56 ~ 100	25	50
	ofloxacin	0.78 ~ 50	12.5	25
	ciprofloxacin	0.39 ~ 25	6.25	12.5
	enoxacin	0.78 ~ 50	12.5	25
	pipemidic acid	25 ~ >100	>100	>100
	lomefloxacin	0.78 ~ 50	25	25
<i>Xanthomonas malthophilia</i> (51)	floxacin	0.78 ~ 25	6.25	12.5
	norfloxacin	3.13 ~ 100	12.5	50
	ofloxacin	0.39 ~ 25	6.25	12.5
	ciprofloxacin	0.20 ~ 25	6.25	12.5
	enoxacin	1.56 ~ 50	12.5	50
	pipemidic acid	25 ~ >100	100	>100
	lomefloxacin	0.78 ~ 25	6.25	12.5

Table 2-4. Antibacterial activity of fleroxacin and reference drugs against clinical isolates

Isolate (no. of strains)	Drug	MIC (μg/ml)			
		range		50%	90%
<i>Haemophilus influenzae</i> (80)	fleroxacin	0.0125 ~	0.05	0.05	0.05
	norfloxacin	0.0125 ~	0.05	0.05	0.05
	ofloxacin	≤0.006 ~	0.025	0.025	0.025
	ciprofloxacin	≤0.006 ~	0.0125	≤0.006	0.0125
	enoxacin	0.025 ~	0.20	0.10	0.10
	pipemidic acid	0.78 ~	3.13	1.56	3.13
	lomefloxacin	0.0125 ~	0.05	0.05	0.05
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (19)	fleroxacin	0.0125 ~	0.20	0.05	0.20
	norfloxacin	0.025 ~	0.10	0.05	0.05
	ofloxacin	0.0125 ~	0.10	0.025	0.05
	ciprofloxacin	≤0.006 ~	0.025	≤0.006	0.0125
	enoxacin	≤0.006 ~	0.20	0.05	0.20
	pipemidic acid	0.10 ~	3.13	0.78	3.13
	lomefloxacin	0.0125 ~	0.39	0.05	0.39
<i>Bacteroides fragilis</i> (34)	fleroxacin	6.25 ~	100	6.25	50
	norfloxacin	25 ~	>100	100	>100
	ofloxacin	0.39 ~	25	0.78	12.5
	ciprofloxacin	3.13 ~	>100	6.25	50
	enoxacin	12.5 ~	100	25	50
	pipemidic acid	100 ~	>100	>100	>100
	lomefloxacin	6.25 ~	100	12.5	25
<i>Clostridium difficile</i> (26)	fleroxacin	3.13 ~	100	25	50
	norfloxacin	25 ~	100	100	100
	ofloxacin	3.13 ~	12.5	6.25	12.5
	ciprofloxacin	3.13 ~	25	12.5	25
	enoxacin	12.5 ~	>100	50	>100
	pipemidic acid	>100		>100	>100
	lomefloxacin	25 ~	100	50	100
<i>Clostridium perfringens</i> (16)	fleroxacin	0.39 ~	6.25	0.78	1.56
	norfloxacin	0.78 ~	6.25	1.56	3.13
	ofloxacin	0.39 ~	3.13	0.78	0.78
	ciprofloxacin	0.20 ~	1.56	0.39	0.78
	enoxacin	0.78 ~	12.5	1.56	3.13
	pipemidic acid	25 ~	100	25	50
	lomefloxacin	0.78 ~	6.25	0.78	1.56
NA-resistant Gram- negative bacteria (136)	fleroxacin	0.20 ~	100	3.13	12.5
	norfloxacin	0.025 ~	100	1.56	25
	ofloxacin	0.10 ~	100	3.13	12.5
	ciprofloxacin	0.0125 ~	50	0.78	6.25
	enoxacin	0.20 ~	>100	3.13	25
	pipemidic acid	1.56 ~	>100	25	>100
	lomefloxacin	0.20 ~	100	3.13	25
	nalidixic acid	25 ~	>100	>100	>100

MIC₉₀を示し、CPFXより劣るもののOFLXと同程度の抗菌力であった。

Pseudomonas cepacia 51株及び*Xanthomonas maltophilia* 51株は検討した全てのキノロン剤に対して比較的低い感受性を示し、fleroxacinのMIC₉₀は各々25, 12.5 µg/mlであった。これらの株に対するfleroxacinの抗菌力は、CPFX, OFLXと同等か若干劣っていた。

H. influenzae 80株に対してfleroxacinは0.05 µg/mlで全ての菌株の発育を阻止し、NFLX, LFLXと同様な抗菌力が認められた。CPFX, OFLX, ENX及びLFLXはそれぞれ0.0125, 0.025, 0.20及び0.05 µg/mlの濃度で全株の増殖を阻止した。

N. gonorrhoeae 19株の場合、fleroxacinは0.20 µg/mlにMIC₉₀を示し、ENX及びLFLXと同等の抗菌力であった。

嫌気性菌である*Bacteroides fragilis* 34株, *Clostridium difficile* 26株並びに*Clostridium perfringens* 16株に対してfleroxacinは、それぞれ50, 50, 1.56 µg/mlのMIC₉₀を示した。

NAのMIC値が25 µg/ml以上を示すグラム陰性菌 : *E. coli* 9株, *K. pneumoniae* 4株, *E. cloacae* 15株, *C. freundii* 18株, *S. marcescens* 49株, *P. mirabilis* 5株, *P. vulgaris* 1株, *P. rettgeri* 29株及び*M. morgani* 6株の合計136株に対するfleroxacinのMIC値は0.20~100 µg/mlと幅広く分布するが、MIC₅₀は3.13 µg/mlを示し、NFLX, OFLXなどの新キノロンと同様にNAとのあいだの交叉耐性は不完全であった。

GMのMIC値が25 µg/ml以上を示す*P. aeruginosa* 24株,

S. marcescens 31株, *E. cloacae* 15株, *P. vulgaris* 3株, *P. mirabilis* 2株, *P. rettgeri* 6株, *M. morgani* 4株, *C. freundii* 1株, *K. oxytoca* 1株の合計87株のGM耐性グラム陰性菌に対し、fleroxacinはOFLX, NFLX, ENX, LFLXと同等の抗菌力を示した。

Methicillinに12.5 µg/ml以上を示すmethicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 79株に対しfleroxacinはMIC₅₀が0.39 µg/mlとCPFX, OFLXと同等の抗菌力を示し、NFLX, ENX, LFLXより優れていた。

3. 殺菌作用

i) MICとMBC

Fleroxacinの*S. aureus* Smith, *E. coli* ML4707, *P. aeruginosa* GN11189及び*S. marcescens* GN7577株に対するMICとMBCをOFLX, CPFX, NFLXと比較し、Table 3に示した。Fleroxacinを始め対照薬剤はすべてMIC値とMBC値との差はほとんどなく、あっても1管であった。接種菌量の影響は*S. marcescens* GN7577の高濃度接種時にすべての薬剤で12.5 µg/ml以上のMICを示したが、他の菌種での影響は少なかった。

ii) 増殖曲線に及ぼす影響

前述の4菌種の増殖曲線に及ぼすfleroxacinの影響をOFLX, CPFX, NFLXと比較し、Fig. 1~4に示した。FleroxacinはMIC以上の濃度で使用した4株に対し、迅速に殺菌的な作用を示した。しかし、24時間後に*S. aureus* Smith, *S. marcescens* GN7577株では2MIC濃度でもわずかに再増殖が認められた。この傾向は対照薬剤においても観察された。一方、*E. coli* ML4707, *P. aeruginosa*

Table 2-5. Antibacterial activity of fleroxacin and reference drugs against clinical isolates

Isolate (no. of strains)	Drug	MIC (µg/ml)		
		range	50%	90%
GM-resistant Gram-negative bacteria (87)	fleroxacin	0.05 ~ 100	1.56	12.5
	norfloxacin	0.05 ~ 100	0.78	12.5
	ofloxacin	0.05 ~ 100	1.56	12.5
	ciprofloxacin	≤0.006 ~ 50	0.39	6.25
	enoxacin	0.10 ~ >100	1.56	12.5
	pipemidic acid	0.78 ~ >100	12.5	>100
	lomefloxacin	0.10 ~ 100	3.13	12.5
	gentamicin	25 ~ >100	50	>100
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (79)	fleroxacin	0.20 ~ 6.25	0.39	3.13
	norfloxacin	0.39 ~ 100	1.56	12.5
	ofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.20 ~ 6.25	0.39	1.56
	enoxacin	0.78 ~ 50	1.56	12.5
	pipemidic acid	12.5 ~ >100	50	>100
	lomefloxacin	0.39 ~ 50	1.56	3.13
	methicillin	12.5 ~ >100	50	>100

sa GN11189株では24時間後でも fleroxacin においては再増殖はなく、検出限界以下の菌数であった。

4. 自然耐性菌出現頻度

Fleroxacin に対する自然耐性菌出現頻度を対照薬剤と比較し、Table 4に示した。*S. aureus* Smith及び*P. aeruginosa* GN11189の両株に対して、使用した4薬剤はともに2MIC濃度で自然耐性菌の出現が低頻度ながら認められるものの、4MIC濃度では fleroxacin, OFLX, CPFX においては認められなかった。*E. coli* ML4707では2MIC濃度のCPFXで耐性菌の出現が低頻度に認められたが、他の薬剤では認められなかった。一方、*S. marcescens* GN7577株においては、4薬剤ともに4MIC濃度でも 10^{-7} ~ 10^{-8} の頻度で自然耐性菌の出現が認められた。

5. *E. coli* KL-16株のDNA gyraseに対する阻害作用

各種キノロン剤の*E. coli* KL-16株のDNA gyraseのスーパーコイリング活性阻害作用をTable 5に示した。FleroxacinのIC₅₀値は0.48 µg/mlであり、この値はほぼNFLX, OFLX, LFLXの新キノロンと同程度であり、CPFXよりいくぶん劣っていた。しかしながら、PPAやNAに較べると30~45倍強いDNA gyrase阻害作用であった。

6. マウス全身感染防禦効果

Fleroxacinのマウス全身感染モデルに対する治療効果をOFLX, CPFX, NFLX及びLFLXを対照として比較した(Fig. 5~8)。*S. aureus* Smithを感染菌とした場合、fleroxacinのED₅₀値は8.06 mg/kgで、OFLX, CPFX,

LFLXと同等もしくは、わずかに優れ、NFLXより4倍程優れた治療効果であった。*E. coli* ML4707、*P. aeruginosa* GN11189並びに*S. marcescens* GN7577を感染菌とした場合のfleroxacinのED₅₀値は、それぞれ0.27、10.53及び8.40 mg/kgでOFLXやLFLXより2倍、NFLXより7倍程優れた治療効果が認められ、またCPFXとは同等もしくは若干優れた効果であった。

Ⅲ. 考 察

Fleroxacinは緑膿菌を含むグラム陰性菌からグラム陽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。Fleroxacinの臨床分離株に対する抗菌力は、ほぼOFLX, NFLX, ENX及びLFLXと同程度であったが、*B. fragilis*等いくつかの菌種ではOFLXより若干劣っていた。また、MRSAを含む*S. aureus*、*B. fragilis*と*X. maltophilia*を除き大部分の菌種に対してはCPFXより劣った抗菌力であった。なお、fleroxacinはすべての菌種に対しPPAよりはるかに優れた抗菌活性を示していた。さらに、fleroxacinを始めとした新キノロン剤はNA耐性菌に対しても有効であったが、NA感受性菌に対する抗菌力よりは幾分、弱い傾向が認められた。しかし、そのMIC値は大部分の菌株で感受性と判断できる値であり、NAとの交叉耐性は不完全なものであった。Fleroxacinは、また*P. aeruginosa*を含むGM耐性菌やMRSAに対しても有効であった。

FleroxacinのMIC値とMBC値には差がほとんど認められず、また増殖曲線に及ぼす影響においても、flero-

Table 3. Effect of inoculum size on the bactericidal activity of fleroxacin and other quinolones

Organism	Inoculum size (CFU/ml)	Fleroxacin		Ofloxacin		Ciprofloxacin		Norfloxacin	
		MIC ^a	MBC ^a	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> Smith	6.2 × 10 ⁷	1.56	1.56	0.39	0.78	0.20	0.39	1.56	1.56
	6.2 × 10 ⁶	0.78	0.78	0.39	0.78	0.10	0.20	1.56	1.56
	6.2 × 10 ⁵	0.78	0.78	0.20	0.39	0.10	0.20	0.39	0.78
	6.2 × 10 ⁴	0.20	0.39	0.10	0.20	0.10	0.10	0.39	0.78
<i>E. coli</i> ML4707	1.1 × 10 ⁷	0.10	0.10	0.10	0.20	0.0125	0.025	0.10	0.20
	1.1 × 10 ⁶	0.05	0.05	0.05	0.05	0.0125	0.0125	0.05	0.05
	1.1 × 10 ⁵	0.05	0.05	0.05	0.05	0.0125	0.0125	0.05	0.05
	1.1 × 10 ⁴	0.05	0.05	0.05	0.05	0.0125	0.0125	0.05	0.05
<i>P. aeruginosa</i> GN11189	1.0 × 10 ⁷	6.25	12.5	6.25	12.5	0.78	1.56	3.13	6.25
	1.0 × 10 ⁶	3.13	6.25	6.25	6.25	0.78	1.56	3.13	6.25
	1.0 × 10 ⁵	1.56	3.13	1.56	3.13	0.20	0.39	1.56	3.13
	1.0 × 10 ⁴	0.78	1.56	0.78	1.56	0.20	0.39	0.78	1.56
<i>S. marcescens</i> GN7577	2.3 × 10 ⁷	≥12.5	≥12.5	≥12.5	≥12.5	≥12.5	≥12.5	≥12.5	≥12.5
	2.3 × 10 ⁶	3.13	3.13	6.25	6.25	1.56	1.56	6.25	12.5
	2.3 × 10 ⁵	0.78	1.56	3.13	3.13	0.78	0.78	3.13	6.25
	2.3 × 10 ⁴	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39	0.39	1.56	3.13

a: µg/ml

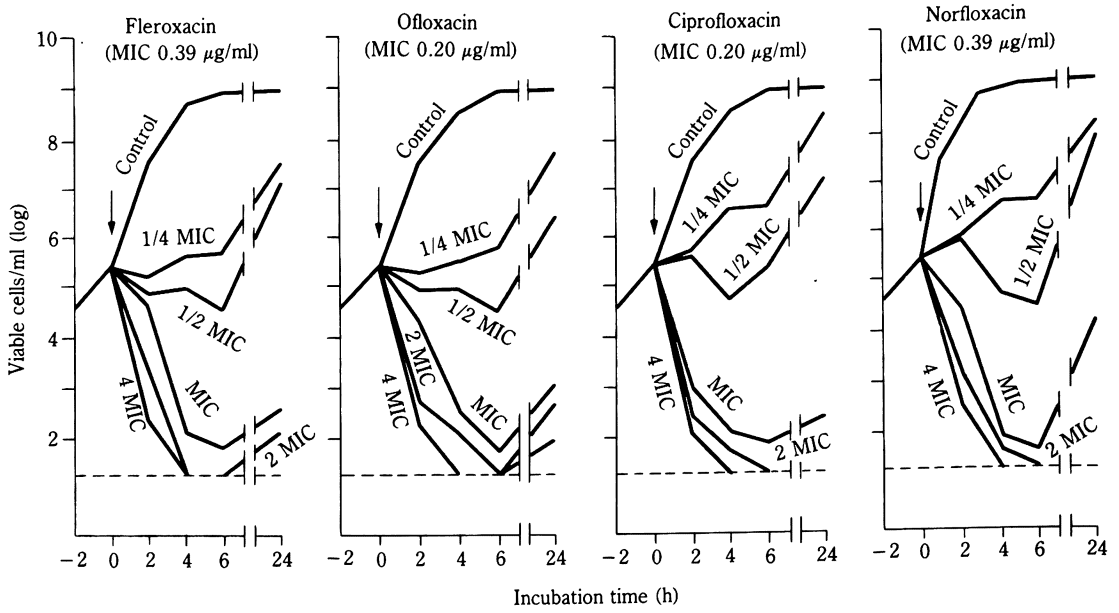


Fig. 1. Bactericidal activity of fleroxacin and other quinolones against *Staphylococcus aureus* Smith.

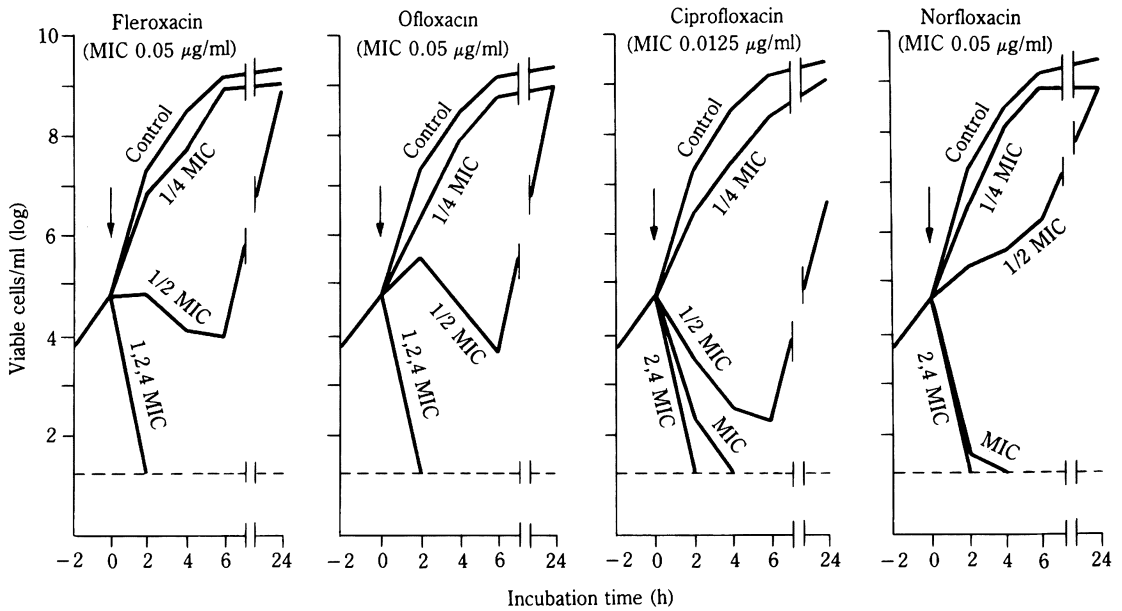


Fig. 2. Bactericidal activity of fleroxacin and other quinolones against *Escherichia coli* ML4707.

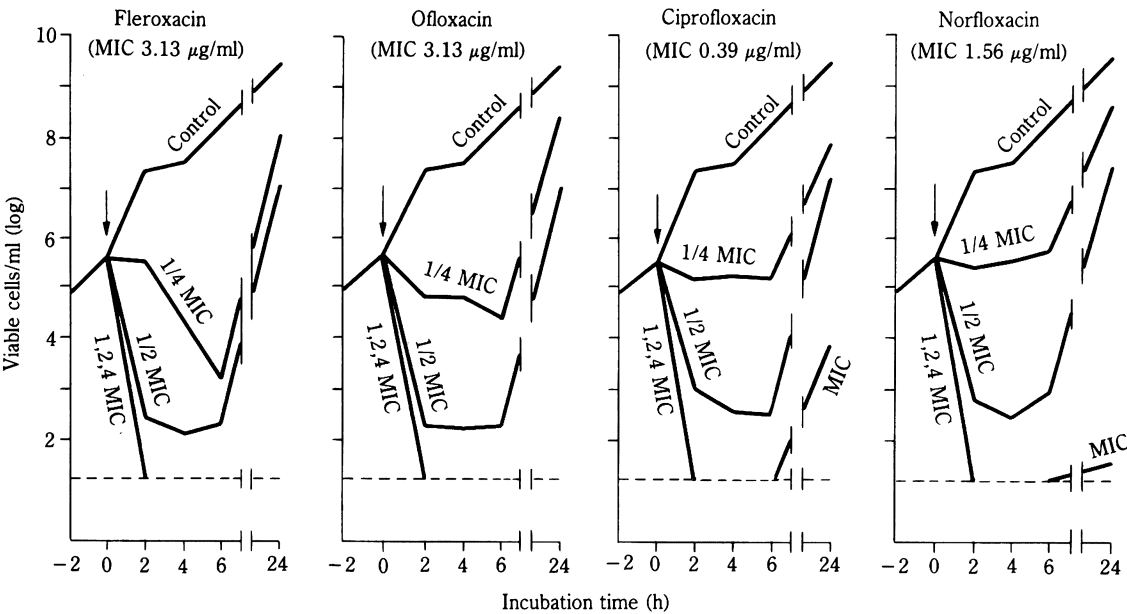


Fig. 3. Bactericidal activity of fleroxacin and other quinolones against *Pseudomonas aeruginosa* GN11189.

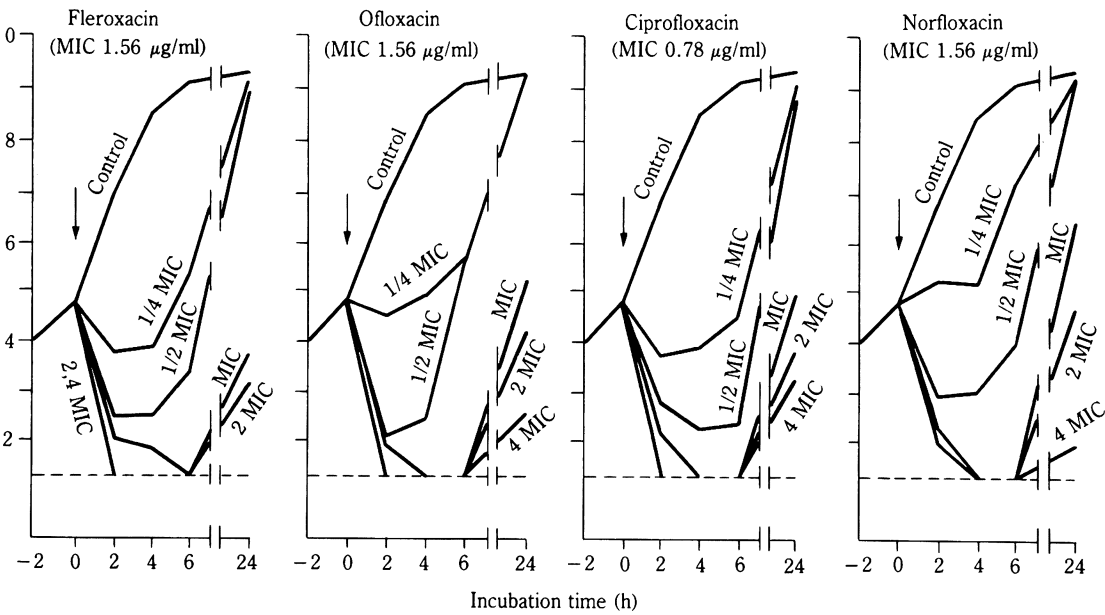


Fig. 4. Bactericidal activity of fleroxacin and other quinolones against *Serratia marcescens* GN7577.

Table 4. Appearance rate of spontaneous resistant mutants

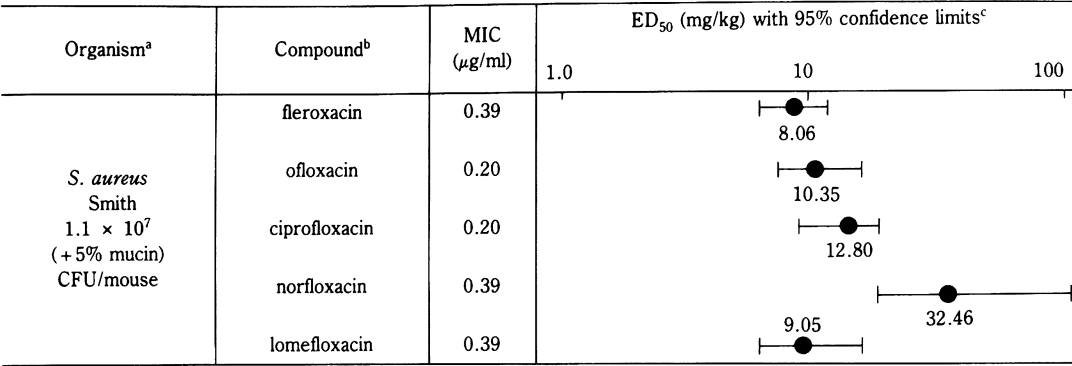
Organism	Compound	Selected concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Frequency
<i>S. aureus</i> Smith	fleroxacin	2 MIC(0.78)	9.1×10^{-7}
		4 MIC(1.56)	$< 7.7 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	2 MIC(0.39)	8.3×10^{-7}
		4 MIC(0.78)	$< 7.7 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	2 MIC(0.39)	6.2×10^{-7}
		4 MIC(0.78)	$< 7.7 \times 10^{-9}$
	norfloxacin	2 MIC(0.78)	1.0×10^{-6}
		4 MIC(1.56)	3.7×10^{-7}
<i>E. coli</i> ML4707	fleroxacin	2 MIC(0.10)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	2 MIC(0.10)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	2 MIC(0.025)	4.6×10^{-8}
		4 MIC(0.05)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
	norfloxacin	2 MIC(0.10)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
<i>P. aeruginosa</i> GN 11189	fleroxacin	2 MIC(6.25)	9.0×10^{-9}
		4 MIC(12.5)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	2 MIC(6.25)	1.9×10^{-8}
		4 MIC(12.5)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	2 MIC(0.78)	2.7×10^{-8}
		4 MIC(1.56)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
	norfloxacin	2 MIC(3.13)	3.6×10^{-8}
		4 MIC(6.25)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
<i>S. marcescens</i> GN 7577	fleroxacin	4 MIC(6.25)	5.4×10^{-8}
	ofloxacin	4 MIC(6.25)	4.1×10^{-7}
	ciprofloxacin	4 MIC(3.13)	3.1×10^{-8}
	norfloxacin	4 MIC(6.25)	5.4×10^{-7}

Table 5. Inhibitory effects of fleroxacin and other quinolones against the supercoiling activity of DNA gyrase from *Escherichia coli* KL-16

Compound	MIC ^a ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ^b ($\mu\text{g/ml}$)
Fleroxacin	0.10	0.48
Ofloxacin	0.10	0.36
Ciprofloxacin	0.025	0.29
Norfloxacin	0.10	0.43
Enoxacin	0.20	2.50
Lomefloxacin	0.39	0.51
Pipemidic acid	3.13	14.7
Nalidixic acid	6.25	21.6

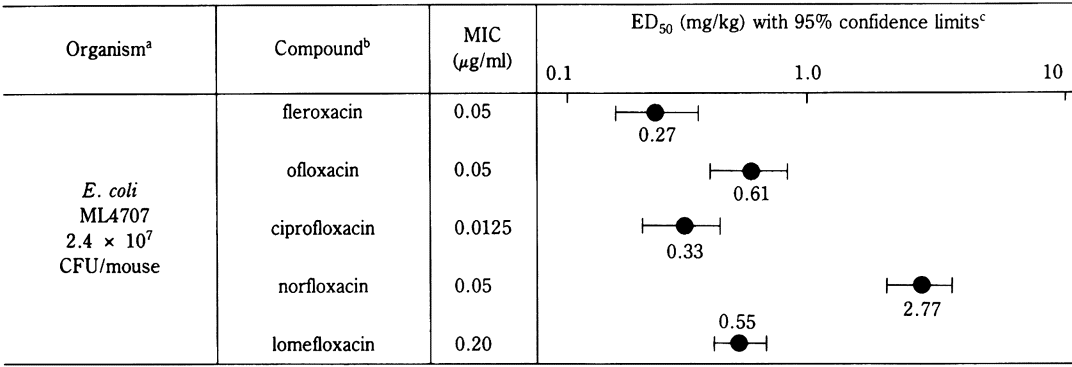
a: MICs were determined by the agar dilution method

b: The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by the quantitative measurement of supercoiled pBR322 DNA peak in agarose gel according to densitometric assay.



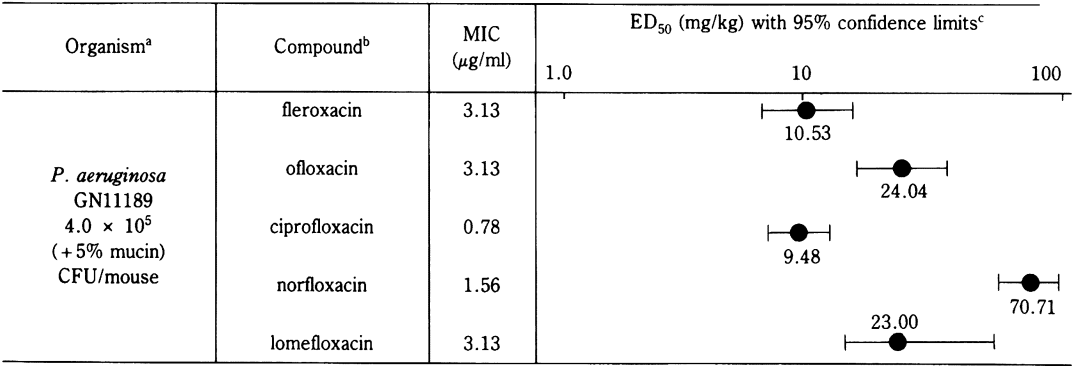
a: inoculated intraperitoneally
b: administered orally immediately after infection
c: probit method (n = 10)

Fig. 5. Protective effect of fleroxacin and other quinolones on systemic infection in mice.



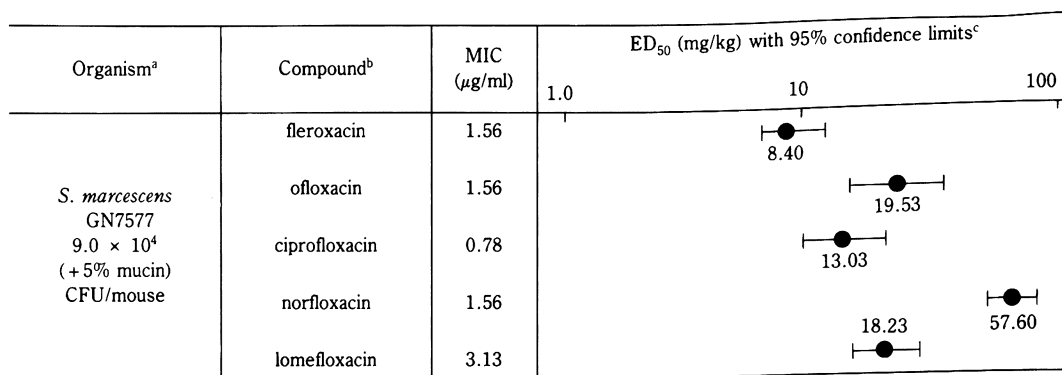
a: inoculated intraperitoneally
b: administered orally immediately after infection
c: probit method (n = 10)

Fig. 6. Protective effect of fleroxacin and other quinolones on systemic infection in mice.



a: inoculated intraperitoneally
b: administered orally immediately after infection
c: probit method (n = 10)

Fig. 7. Protective effect of fleroxacin and other quinolones on systemic infection in mice.



a: inoculated intraperitoneally

b: administered orally immediately after infection

c: probit method (n=10)

Fig. 8. Protective effect of fleroxacin and other quinolones on systemic infection in mice.

xacinを添加した直後から生菌数の急激な減少が観察されたことから、floxacinは殺菌的な作用を有するものと考えられた。また、自然耐性菌の出現はfloxacinの4MIC濃度では、*S. marcescens*を除き認められなかった。また、*S. marcescens*における、その頻度は 10^{-8} と非常に低いものであったが、臨床分離株の幅広い感受性分布を考えると今後、問題となる菌種と思われる。

Floxacinは*E. coli* KL-16株のDNA gyraseのスーパーコイル活性をNFLX、OFLXなどの新キノロン剤と同様に強く阻害した。したがって、floxacinはこのDNA gyraseの阻害作用により、その強い抗菌力を示すものと考えられた。ところで、ENXのDNA gyrase 50%阻害濃度は今回検討した他の新キノロン剤よりも高くMICと良好な相関はみられなかった。これと同様な結果がDOMAGALAらにより報告⁵⁾されている。この理由としては、DOMAGALAらも指摘しているように他の新キノロン剤に比べENXの菌体膜透過性が良好である可能性やDNA gyrase阻害開始濃度がMICを反映するのに重要であるという可能性などが考えられる。このようにENXは、いくぶん他の新キノロン剤とは作用態度に違いがみられた。

マウス全身感染モデルにおけるfloxacinの治療効果は、検討したすべての感染菌においてNFLXよりはるかに優れていた。また対照薬剤中*in vitro*でもっとも強い抗菌力を示したCPFXや、優れた感染防禦効果を示すことが報告されているOFLX⁶⁾並びにLFLX⁷⁾と同等もしくはそれ以上の治療効果を示した。この優れたfloxacinの感染防禦効果は、強い*in vitro*での抗菌力、良好な経口吸収性、組織移行性並びに代謝的安定性と密接に関連しているものと推測された。

このようにfloxacinは*in vitro*及び*in vivo*において優

れた抗菌力を有することから、臨床においても各種感染症に対し有用な薬剤になるものと思われる。

文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) DOMAGALA J M, L D HANNA, C L HEIFETZ, M P HUTT, T F MICH, J P SANCHEZ: New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. J Med Chem 29: 394~404, 1986
- 6) 佐藤謙一, 井上松久, 三橋 進: DL-8280の*in vitro*及び*in vivo*抗菌活性評価。Chemotherapy 32 (S-1): 1~12, 1984
- 7) 廣瀬 徹, 三橋 進, 井上松久: NY-198の細菌学的評価。Chemotherapy 36 (S-2) 1~24, 1988

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FLEROXACIN

HIROSHI AOYAMA and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute

2220 Kogure, Fujimi-mura, Seta-gun, Gunma 371-01, Japan

MATSUHISA INOUE

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

We compared the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of fleroxacin with those of other new quinolones. The results are summarized as follows:

1. Fleroxacin had a broad spectrum, with potent antibacterial activity against both Gram-positive and -negative bacteria. Against these bacteria, the activity of fleroxacin was roughly comparable to that of norfloxacin, ofloxacin, enoxacin, and lomefloxacin.
2. Most nalidixic acid-resistant Gram-negative bacteria, gentamicin-resistant Gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were susceptible to fleroxacin.
3. Fleroxacin displayed bactericidal action at concentrations around the MIC against various bacteria.
4. The appearance rate of mutants spontaneously by resistant to fleroxacin was very low.
5. Fleroxacin strongly inhibited the supercoiling activity of DNA gyrase purified from *Escherichia coli*.
6. The protective effects of a single oral dose of fleroxacin in mice was greater than that of norfloxacin and comparable to or greater than that of ciprofloxacin, ofloxacin or lomefloxacin against systemic infections.