

Fleroxacinの *in vitro* 並びに *in vivo* 抗マイコバクテリア活性

斎藤 肇・佐藤勝昌・富岡治明

島根医科大学微生物・免疫学教室*

Fleroxacin並びにofloxacin(OFLX)の代表的病原性抗酸菌に対する*in vitro*抗菌活性を7H11寒天平板を用いた寒天希釈法によって測定し、比較検討した。*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* および *Mycobacterium fortuitum* は *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* 及び *Mycobacterium chelonae* よりも fleroxacin に対して感受性であり、その程度は一般的にいて OFLX のそれと同程度か若干劣るものようであった。また、マウス腹腔マクロファージに貪食された *M. intracellulare* に対する fleroxacin の抗菌活性も OFLX におけるよりもやや劣るものであったが、*M. intracellulare* 感染マウスに対しては fleroxacin 並びに OFLX のいずれの投与によっても治療効果は認められなかった。他方、*M. fortuitum* 感染マウスに対する fleroxacin の治療効果は OFLX におけるよりも優れており、また fleroxacin は *Mycobacterium leprae* の footpad 内感染局所における感染菌の増殖を多少とも抑制した。

Key words : Fleroxacin, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium leprae*

Fleroxacin は杏林製薬株式会社中央研究所で開発されたニューキノロン系薬剤である。

本剤はグラム陽性、陰性両菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、また黄色ブドウ球菌、大腸菌及び緑膿菌マウス感染に対する治療実験においても優れた効果が認められている¹⁾。

今回、我々は fleroxacin の *in vitro* 並びに *in vivo* 抗マイコバクテリア活性について検討し、若干の知見を得たので以下報告する。

I. 実験材料と方法

1. 供試薬剤

Fleroxacin の他に対照として ofloxacin (OFLX) (第一製薬) を用いた。

2. 供試菌株

教室保存の *Mycobacterium tuberculosis* 25 株, *Mycobacterium kansasii* 19 株, *Mycobacterium marinum* 10 株, *Mycobacterium scrofulaceum* 19 株, *Mycobacterium avium* 18 株, *Mycobacterium intracellulare* 31 株, *Mycobacterium fortuitum* 20 株, *Mycobacterium chelonae* subsp. *chelonae* 20 株及び *M. chelonae* subsp. *abscessus* 15 株を用いた。マウス感染治療実験には、*M. intracellulare* N-260 株, *M. fortuitum* 18367 株の他に *Mycobacterium leprae* Thai 53 株を用いた。*M. avium* と *M. intracellulare* は我々の教室において、これら菌種の Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System (Gen-Probe Corp., San Diego, Calif., USA) を用いて同定されたものであり、いずれの菌株も扁平、平滑、透

明な集落形態を示した。

3. MIC測定

日本化学療法学会標準法²⁾に従った。すなわち、7H9 培地 (Difco) 中 37°C, ただし *M. marinum* と *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C, 3~7 日培養菌を同種培地で 10⁶CFU/ml になるように希釈し、その希釈菌液を、100~0.025 µg/ml に至る 2 倍階段希釈濃度の薬剤を含有する 7H11 寒天平板 (Difco) 上にマイクロプランター (佐久間製作所, 東京) を用いて 5 µl スポットし、37°C (*M. marinum* と *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C), 迅速発育菌では 7 日, また遅発育菌では 14 日培養後における菌発育の有無から MIC を求めた。

4. 供試動物

日本 SLC より購入した ddY 系, BALB/c 系及び BALB/c (nu/nu) 系各雌マウスを用いた。

5. マウス腹腔マクロファージ (Mφ) 内被貪食 *M. intracellulare* に対する抗菌作用

Mφ は既報の我々の方法³⁾に従って採取した。即ち、Zymosan A (Sigma) 1mg を BALB/c 系雌マウス (10 週齢) の腹腔内へ投与し、その 4 日後に 1% 牛胎児血清加 Hanks' balanced salt solution (FBS-HBSS) で腹腔浸出細胞を採取した。得られた細胞は洗浄後、10% FBS-RPMI 1640 培地 (FBS-RPMI) (日本製薬) に浮遊させ、その 1ml (1 × 10⁶) を径 16mm の培養 well (Corning Glass Works, USA) に入れ、5% CO₂ 下で、37°C, 2 時間培養後、FBS-HBSS で洗浄して非付着性細胞を除去し、得ら

* 〒693 出雲市塩冶町 89-1

れた付着性細胞をMφとして用いた。

このMφ細胞に*M. intracellulare* N-260株のFBS-RPMIによる菌浮遊液(9×10^6 CFU/ml)の1mlを加え、5%CO₂下37℃、1時間培養後、FBS-HBSSで非貪食菌を洗浄、除去した。これにfleroxacinあるいはOFLX(10 μg/ml)各含有FBS-RPMIの1mlを加え、さらに5日間培養—その間1日2回、新鮮同種培地と交換—後、我々が報告した方法³⁾にしたがって、Mφ内の菌の生菌数を7H11寒天平板を用いて、5%CO₂下で37℃、14日培養後に算定した。一方、上記したと同一条件下で培養したMφをGiemsa染色し、その数を算定し、成績をMφあたりの生菌数で示した。

6. 実験的マウス抗酸菌感染に対する治療効果

(1) *M. fortuitum*感染に対して

M. fortuitum 18367株の0.2ml(9.2×10^6 CFU)をddY系雌マウス(5週齢)の尾静脈内へ接種し、その翌日よりfleroxacinあるいはOFLXの蒸留水による10mg/ml懸濁液の0.1ml(1mg)を1日1回、週6回、2あるいは4週間胃ゾンデを用いて経口投与した。そして、感染1日後、2及び4週後に屠殺、剖検して、内臓の肉眼病変の有無ないし程度を観察し、さらに既報の方法³⁾に従って、腎内生菌数を7H11寒天平板を用いて測定した。

(2) *M. intracellulare*感染に対して

M. intracellulare N-260株の0.2ml(1.2×10^7 CFU)をBALB/c系雌マウス(5週齢)の尾静脈内へ接種し、その翌日よりfleroxacinあるいはOFLXの生食水による10mg/ml懸濁液の0.1ml(1mg)を1日1回、週6回、4あるいは8週間背部皮下へ投与した。そして、感染1日後、4及び8週後に、屠殺、剖検して、内臓の肉眼病変の有無ないし程度を観察し、更に肺並びに脾内生菌数を7H11

寒天平板を用いて算定した³⁾。

(3) *M. leprae*感染に対して

M. leprae Thai 53株接種のBALB/c(nu/nu)系雌マウスのfootpadより菌浮遊液を調製し、そのZiehl-Neelsen染色標本について菌数を顕微鏡下で算定した⁴⁾。この菌液を5%FBS-HBSSで希釈し、その0.025ml(1×10^6)をBALB/c(nu/nu)系雌マウス(5週齢)のfootpad内へ接種し、感染後、31~80日目までの50日間、1日1回、週6回、fleroxacinの蒸留水による30mg/ml懸濁液の0.1ml(3mg)を経口投与した。そして、感染後250日目にマウスを屠殺し、footpad内の菌数を顕微鏡下で算定した。

II. 実験成績

1. 抗酸菌に対する*in vitro*抗菌力

Fleroxacinの代表的病原性抗酸菌に対するMICはTable 1に示すようである。即ち、これから分かるように*M. tuberculosis*、*M. kansasii*および*M. fortuitum*に対するfleroxacinのMIC₉₀はそれぞれ6.25 μg/ml、3.13 μg/mlおよび6.25 μg/mlで、他の供試菌種に対するよりも高い抗菌活性を示した。そして、このfleroxacinの抗菌活性は一般的にOFLXのそれと同程度か若干劣るものであるといつてよいようであった。

2. Mφ内被貪食*M. intracellulare*に対する抗菌活性

*M. intracellulare*を貪食したMφの培養液中へfleroxacin(10 μg/ml)を添加することによって、細胞内菌の増殖は薬剤非添加対照におけるよりも培養3日後では約60%、5日後では約50%の抑制がみられた。しかしながら、Mφ内*M. intracellulare*に及ぼすfleroxacinの抗菌活性はOFLXに比べると培養3日後では約1/2、5日後では約2/5であった(Table 2)。

3. 実験的マウス抗酸菌感染に対する薬剤治療効果

Table 1. Susceptibility of various mycobacteria to fleroxacin or ofloxacin

Species	Number of strains	MICs (μg/ml)			
		fleroxacin		ofloxacin	
		50% ^{a)}	90% ^{b)}	50%	90%
<i>M. tuberculosis</i>	25	3.13	6.25	1.56	3.13
<i>M. kansasii</i>	19	3.13	3.13	1.56	6.25
<i>M. marinum</i>	10	12.5	50	12.5	25
<i>M. scrofulaceum</i>	19	12.5	25	12.5	50
<i>M. avium</i>	18	50	>100	25	100
<i>M. intracellulare</i>	31	50	100	50	100
<i>M. fortuitum</i>	20	3.13	6.25	1.56	3.13
<i>M. chelonae (chelonae)</i>	20	25	100	12.5	50
<i>M. chelonae (abscessus)</i>	15	>100	>100	>100	>100

^{a)}MIC for 50% of the strains

^{b)}MIC for 90% of the strains

*M. fortuitum*感染マウスに対してはTable 3に示すように、腎病変発現の程度は感染後2週目と4週目を問わずfloxacinの投与によって対照マウスにおけるよりも軽減され、その程度はOFLXにおける場合と同様であった。

Table 4は腎よりの生菌数の推移を示したものであるが、floxacinの投与によって感染後2週目と4週目ともに対照群におけるよりもその減少がみられ、その程度はOFLX投与群におけるよりも顕著であった。

次に、*M. intracellulare*感染に対するfloxacinとOFLXの治療効果についてみると表は省略したが、感染後4週目では薬剤投与と非投与のいずれの動物群にも肉眼的肺病変はみられなかった。しかしながら、8週目になると

すべてのマウス群において結核結節様病変がみられるようになり、その程度に差は見出せなかった。Table 5はfloxacinあるいはOFLX投与マウスの肺並びに脾内生菌数を示したものであるが、感染後4週目と8週目とを問わず両薬剤投与群とも対照群との間に生菌数に差はみられなかった。

Table 6は*M. leprae*のfootpad内感染に対するfloxacinの抗菌活性を示したものであるが、薬剤の投与によって感染部位における*M. leprae*の増殖は薬剤非投与対照群におけるよりも約1オーダー低かった。

Ⅲ. 考 察

Floxacinの一般細菌に対する*in vitro*抗菌活性は

Table 2. Antimicrobial activity of floxacin and ofloxacin against phagocytosed *Mycobacterium intracellulare* in murine peritoneal macrophages

Time after infection (day)	CFU/macrophage ^{a)}		
	control	floxacin	ofloxacin
0	0.7 ± 0.1	—	—
3	6.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1 ^{b)}	1.3 ± 0.1 ^{b)}
5	20.4 ± 3.7	10.6 ± 1.4	3.9 ± 0.8 ^{c)}

^{a)}Mean ± SE (n=3)

^{b)}Significantly different from control ($P < 0.01$)

^{c)}Significantly different from control ($P < 0.05$)

Table 3. Renal lesions in *Mycobacterium fortuitum*-infected mice with or without floxacin or ofloxacin

Regimen	Dose (mg)	No. of mice with renal lesions							
		week 2				week 4			
		—	1+	2+	3+ ^{a)}	—	1+	2+	3+
None	—	0	0	1	4	0	1	3	1
Floxacin	1	0	5	0	0	1	4	0	0
Ofloxacin	1	0	5	0	0	1	4	0	0

^{a)}— : no lesion

1+ : discrete small lesions covering less than 25% of surface

2+ : confluent lesions covering 25~50% of surface

3+ : confluent lesions covering over than 50% of surface

Table 4. Effect of floxacin or ofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* in the kidneys during the course of infection

Regimen	Dose (mg)	Log CFU/kidneys ^{a)}		
		day 1	week 2	week 4
None	—	5.23 ± 0.06	5.67 ± 0.19	5.34 ± 0.25
Floxacin	1	—	3.47 ± 0.52 ^{b)}	2.22 ± 0.18 ^{c)}
Ofloxacin	1	—	4.61 ± 0.36 ^{b)}	3.41 ± 0.59 ^{b)}

^{a)}Mean ± SE (n=5)

^{b)}Significantly different from control ($P < 0.05$)

^{c)}Significantly different from control ($P < 0.01$)

Table 5. Effect of fleroxacin or ofloxacin on *Mycobacterium intracellulare* in lungs and spleen during the course of infection

Organ	Regimen	Dose (mg)	Log CFU/organ ^{a)}		
			day 1	week 4	week 8
Lungs	none	—	4.81 ± 0.08	5.21 ± 0.04	6.92 ± 0.06
	floxacin	1	—	5.22 ± 0.04	6.95 ± 0.05
	ofloxacin	1	—	5.23 ± 0.06	6.81 ± 0.17
Spleen	none	—	6.16 ± 0.06	6.39 ± 0.06	7.14 ± 0.05
	floxacin	1	—	6.39 ± 0.06	7.31 ± 0.02
	ofloxacin	1	—	6.30 ± 0.08	7.19 ± 0.09

^{a)}Mean ± SE (n=5)

Table 6. *In vivo* anti-*Mycobacterium leprae* activity of fleroxacin

Regimen	Dose (mg)	Log acid-fast bacilli/footpad ^{a)}
None	—	5.25 ± 0.38
Fleroxacin	3	4.13 ± 0.20 ^{b)}

^{a)}Mean ± SE (n=5)

^{b)}Significantly different from untreated mice ($P < 0.05$)

OFLXのそれにはほぼ匹敵すると報告されている¹⁾。今回の実験において、fleroxacinは代表的病原性抗酸菌8菌種中*M. tuberculosis*、*M. kansasii*及び*M. fortuitum*の3菌種に対してはOFLXと同程度か若干劣る*in vitro*抗菌活性を有することが分かった。しかしながら、諸種の一般抗菌剤と抗結核剤とを問わずそれらの多くに抵抗性を示す*M. avium*並びに*M. intracellulare*^{5,6)}に対してはfleroxacinの抗菌力も例外ではなく同様に低かった。このfleroxacinの*M. intracellulare*に対する低い*in vitro*抗菌活性はマウス感染治療実験においても、またMφ内被貪食*M. intracellulare*に対する効果においてもよく平行するものであった。近年、米国において*M. avium*あるいは*M. intracellulare*はAIDSにおける日和見感染菌として重視されており、これら両菌種に対する有効薬剤の探索あるいは開発はますますその重要性を増してくるであろう。

他方、実験的マウス*M. fortuitum*感染に対するfleroxacinの治療効果はOFLXにおけるよりも優れていたが、この成績は*in vitro*での本剤の抗菌活性(MIC=6.25 µg/ml)がOFLXのそれ(MIC=3.13 µg/ml)よりも劣っているということを勘案する時、OFLXに比較して本剤の*in vivo*抗菌活性は*in vitro*抗菌活性よりも強く発現されるであろうということが示唆されるものといえよう。同様のことは実験的マウス大腸菌、黄色ブドウ球菌および緑膿菌感染においても報告されているところであり¹⁾、これはfleroxacinのOFLXにおけるよりも優れた体内動態を反映した結果と考えられている⁷⁾。

先に我々はOFLXが抗らい活性を有することををはじめて見出した⁴⁾が、同じ新キノロン剤であるfleroxacinもまた*M. leprae*増殖抑制効果を有することが明かとなった。FleroxacinがOFLXよりも優れた体内動態を示すことを考えあわす時、本剤の治らい剤としての有効性があるいは期待できるかもしれないと考え、現在更に検討中である。

文 献

- HIRAI K, AOYAMA H, HOSAKA M, OOMORI Y, NIWATA Y, SUZUE S and IRIKURA T: *In vitro* and *in vivo* anti-bacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 1059~1066, 1986
- 日本化学療法学会・最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- SAITO H, SATO K and TOMIOKA H: Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle* 69: 187~192, 1988
- SAITO H, TOMIOKA H and NAGASHIMA K: *In vitro* and *in vivo* activities of ofloxacin against *Mycobacterium leprae* infection induced in mice. *Int J Leprosy* 54: 560~562, 1986
- KUZE F, KURASAWA T, BANDO K, LEE Y and MAEKAWA N: *In vitro* and *in vivo* susceptibility of atypical mycobacteria to various drugs. *Rev Infect Dis* 3: 885~897, 1981
- WOODLEY C L, KILBURN J O: *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* strains to a spiro-piperidyl rifamycin. *Am Rev Respir Dis* 126: 586~587, 1982
- 谷村 弘, 副島林造: 第37回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。AM-833, 和歌山, 1989

IN VITRO AND IN VIVO ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF FLEROXACIN

HAJIME SAITO, KATSUMASA SATO and HARUAKI TOMIOKA

Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University,

89-1 Enya-cho, Izumo 693, Japan

We evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of fleroxacin [6,8-difluoro-1-(2-fluoroethyl)-1,4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid] and ofloxacin against representative pathogenic mycobacteria by the agar dilution method, using 7H11 agar medium. Fleroxacin showed appreciable antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* (MIC₉₀=6.25 µg/ml), *Mycobacterium kansasii* (MIC₉₀=3.13 µg/ml), and *Mycobacterium fortuitum* (MIC₉₀=6.25 µg/ml), whereas *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium chelonae* substantially resisted the agent. The activity of fleroxacin was comparable or slightly inferior to that of ofloxacin. Fleroxacin showed antimicrobial activity against *M. intracellulare* phagocytosed in murine peritoneal macrophages at a concentration of 10 µg/ml in the culture medium, but its activity was considerably lower than that of ofloxacin. In contrast, the therapeutic activity of fleroxacin against *M. fortuitum* infection induced in mice was higher than that of ofloxacin. Neither fleroxacin nor ofloxacin was efficacious against *M. intracellulare* infection. Administration of fleroxacin significantly depressed the growth of *Mycobacterium leprae* in the footpad.