

合成化学療法剤Levofloxacinの*in vitro*および*in vivo* 抗菌力

西野武志・田中真由美・青野優子・岩井隆也・大槻雅子

京都薬科大学微生物学教室*

合成化学療法剤levofloxacin(LVFX[S-(-)-ofloxacin], DR-3355)の*in vitro*および*in vivo* 抗菌力について、ofloxacin(OFLX), ciprofloxacin(CPFX)およびDR-3354[R-(+)-OFLX]を比較薬として検討し、以下の成績を得た。

1. LVFXは、グラム陽性菌群、グラム陰性菌群に対し広範囲な抗菌スペクトルを有しており、その抗菌力はOFLXのほぼ2倍良好であった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布では、グラム陽性菌および*Acinetobacter*属に対して、LVFXは最も優れた抗菌力を示した。グラム陰性菌においては、*Citrobacter freundii*に対してCPFXとほぼ同等の抗菌力を示したが、他の菌種に対してはCPFXよりやや劣り、OFLXおよびDR-3354より優れていた。

3. LVFXの抗菌力に及ぼす諸因子の影響では、*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*とともに、培地、ヒト血清添加および接種菌量の影響はみられず、培地pHがアルカリ性側の時に抗菌力が良好となった。

4. *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*を用いて増殖曲線に及ぼす影響を検討したところ、濃度に対応した作用がみられ、すべて殺菌的に作用した。

5. *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*にLVFXを作用させた時の形態変化を観察した。*B. subtilis*および*E. coli*では菌体の伸長化が認められたが、その度合いは*B. subtilis*で著しかった。また、*B. subtilis*では溶菌像が、*P. aeruginosa*ではスフェロプラスト、菌体内密度の偏った細胞および溶菌像が観察された。

6. マウス実験の感染症に対する治療効果を*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*および*Acinetobacter calcoaceticus*を用いて検討したところ、LVFXが最も優れた治療効果を示した。

Key words : 合成化学療法剤, Levofloxacin(LVFX), *in vitro* 抗菌力, *in vivo* 抗菌力

Levofloxacin(LVFX, DR-3355)は第一製薬株式会社で合成された化学療法剤である。本物質はラセミ体であるofloxacin(OFLX)の光学活性 *l* 体であり、その活性の本体とされている¹⁾。すなわち、OFLXは化学的にはオキサジン環のC-3位にメチル基を有する三環性構造に特徴づけられ、そのためにこの位置に非対称中心を有している。LVFX[S-(-)-OFLX]とDR-3354[R-(+)-OFLX]は、光学的に分けられた合成中間体から合成され²⁾、LVFXは化学名をS-(-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido-[1,2,3-*de*][1,4]-benzoxazine-6-carboxylic acid hemihydrate といひ、分子式 $C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot 1/2H_2O$ 、分子量370.40の帯黄白色ないし淡黄色の結晶、または結晶性の粉末である。LVFXはグラム陽性菌群、グラム陰性菌群に対し、

DR-3354より8~128倍優れた、OFLXのほぼ2倍の抗菌力を示すと報告されている²⁾。その上、LVFXおよびDR-3354はOFLXより水に対する溶解度が約10倍高く、非経口的投与が可能である。

今回、われわれは、LVFXの*in vitro*および*in vivo* 抗菌力についてOFLX³⁾、ciprofloxacin(CPFX)⁴⁾およびDR-3354²⁾を比較薬として種々の細菌学的評価を行ったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

LVFX, DR-3354, およびOFLXは第一製薬株式会社より、CPFXはバイエル薬品株式会社より入手した。

2. 抗菌スペクトル

教室保存のグラム陽性およびグラム陰性菌群に対する試験管内抗菌力を、前培養にTryptosoya broth(TSB

*〒607 京都市山科区御陵中内町5

：ニッスイ), 感受性測定にHeart infusion agar(HIA :ニッスイ)を用いて, 日本化学療法学会最小発育阻止濃度(MIC)測定法⁵⁾に準じて求めた。なお, *Streptococcus*属, *Corynebacterium diphtheriae*については10%馬血液加HIAを, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*には10%馬血液加HIAをchocolate寒天培地として用いた。また, *Haemophilus influenzae*には3%Fildes enrichment加HIAを, 嫌気性菌群には前培養にGAM broth(ニッスイ)を, 感受性測定にGAM agar(ニッスイ)を用いた⁶⁾。

3. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離された*Staphylococcus aureus* 43株, methicillin-resistant *S. aureus*(MRSA) 31株, *Staphylococcus epidermidis* 33株, *Streptococcus pyogenes* 35株, *Streptococcus pneumoniae* 50株, *Enterococcus faecalis* 30株, *Enterococcus faecium* 30株, *Enterococcus avium* 14株, *Escherichia coli* 42株, *Citrobacter freundii* 34株, *Klebsiella pneumoniae* 43株, *Enterobacter cloacae* 29株, *Enterobacter aerogenes* 34株, *Serratia marcescens* 43株, *Proteus vulgaris* 41株, *Proteus mirabilis* 29株, *Providencia rettgeri* 17株, *Morganella morganii* 28株, *Pseudomonas aeruginosa* 43株, *Acinetobacter calcoaceticus* 42株, *H. influenzae* 22株, *Branhamella catarrhalis* 19株および種々のキノロン耐性菌43株について, 前培養にTSB, 感受性測定にHIAを用いて日本化学療法学会最小発育阻止濃度(MIC)測定法⁵⁾に準じて感受性測定を行った。但し, *Streptococcus*属および*B. catarrhalis*については10%馬血液加HIAの血液寒天培地およびchocolate寒天培地を, *H. influenzae*については3%Fildes enrichment加HIAを用いた。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地, 培地pH, ヒト血清添加および接種菌量の影響について, *S. aureus* 209-P JC, *E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1, *P. aeruginosa* E-2を試験菌として, HIAを用いた平板希釈法(37°C, 18~20時間培養)により検討を行った。培地の影響には, HIA, Nutrient agar(NA:ニッスイ), Tryptosoya agar(TSA:ニッスイ), Mueller-Hinton agar(MHA: Difco), Brain heart infusion agar(BHIA: Difco)を用いた。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

TSBで前培養した*S. aureus* 209-P JC, *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* KC-1, *P. aeruginosa* E-2をHeart infusion broth(HIB:ニッスイ)に移し, 対数期中期まで振盪培養し, 所定の濃度の薬剤を添加し, 以後経時的に生菌数を測定した。

6. 形態変化の観察

Bacillus subtilis ATCC 6633, *E. coli* K-12および*P. aeruginosa* E-2に薬剤を作用させた時の形態変化について検討を行った。すなわち, スライドガラス上で薬剤を含ませたフィルム寒天を作成し, 約3時間振盪培養を行った対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し, これを寒天に被せ, パラフィンで封入した。そして37°C恒温装置つきの位相差顕微鏡(日本光学)により観察した。

7. マウス実験の感染症に対する治療効果

S. aureus Smith, *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1, *Serratia marcescens* T-55, *P. aeruginosa* E-2, *A. calcoaceticus* Ac-54の各菌株をNutrient broth(NB:ニッスイ)で37°C, 18時間培養後, 同培地で希釈し, 6% mucin(Nutritional Biochemicals Corporation)と等量混合した。この菌液を1群10匹のddY系雄マウスの腹腔内に接種し, 感染2時間後1回, 0.5% carboxymethyl cellulose(和光純薬)に懸濁させた薬剤を経口投与した。ただし, LVFXについては生理的食塩水に溶解し, 静脈内投与も行った。その後7日間生死の観察を行い生存率を求め, Litchfield-Wilcoxon法⁷⁾によってED₅₀値を算出した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

教室保存のグラム陽性菌群, グラム陰性菌群および嫌気性菌群に対する試験管内抗菌力について検討した結果を, Table 1~3に示した。LVFXはグラム陽性菌群に対してOFLXのほぼ2倍優れ, CPFXとほぼ同等の抗菌力を示した。グラム陰性菌群に対してもOFLXのほぼ2倍優れ, CPFXとほぼ同等の抗菌力を示した。一方, 嫌気性菌群に対しては, OFLXおよびCPFXよりやや優れていた。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

各臨床分離株に対する感受性について接種菌量10⁶cells/mlで測定し, その感受性分布をTable 4に, またキノロン耐性菌に対する感受性をTable 5に示した。結果はMICの分布範囲および50%(MIC₅₀)または90%(MIC₉₀)の菌株を阻害した濃度として示した。LVFXは, OFLXのほぼ2倍の抗菌活性を示した。LVFX(MIC₉₀ 0.78, 0.39, 0.78 μg/ml)はmethicillin-susceptibleおよび-resistant *S. aureus*, *S. epidermidis*に対し, CPFX(MIC₉₀ 3.13, 3.13, 1.56 μg/ml)より優れた活性を有していた。LVFX(MIC₉₀ 0.78~3.13 μg/ml)は*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.に対して, CPFXと同等であった。また, LVFXは*E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *P.*

vulgaris, *P. mirabilis*, *M. morgani*, *A. calcoaceticus*, *H. influenzae* および *B. catarrhalis* に対し, MIC₉₀ が 0.05 ~ 0.39 µg/ml の優れた抗菌力を示した。しかしながら, LVFX は *S. marcescens*, *P. rettgeri* および *P. aeruginosa* に対しては, MIC₉₀ がそれぞれ 3.13, 1.56 および 1.56 µg/ml とやや活性が弱かった。一般的に, グラム陰性菌に対する LVFX の抗菌活性は CPF₉₀ とほぼ同等であった。

DR-3354 は, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. および *Enterococcus* spp. に対し, MIC₉₀ が 50 ~ >100 µg/ml と活性が弱かった。グラム陰性菌に対しては活性を有していたが, LVFX や CPF₉₀ より少なくとも 30 倍弱い活性であった。また, 種々のキノロン耐性菌に対する感受性測定の成績を Table 5 に示した。いずれの薬剤も耐性化しており, 交差耐性を示すことが明らかとなった。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

S. aureus 209-P JC, *E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1, *P. aeruginosa* E-2 に対する LVFX の抗菌力に, 培地, 培地 pH, ヒト血清添加, 接種菌量の及ぼす影響について検討した結果を Fig. 1 に示した。培地の影響として, HIA, NA, TSA, MHA および BHIA を用いた場合にほとんど影響を受けなかった。pH を変化させた際には, pH 8.0 での LVFX の MIC は pH 7.0 の場合とほぼ同等であったが, pH 6.0 では 2~4 倍高い値であった。HIA にヒト血清を添加した場合には, ヒ

ト血清を 50 v/v% の割合に添加しても 2 倍以内の差であった。接種菌量は LVFX の MIC にやや影響し, 10⁶ cells/plate に菌量が上昇するにつれて, MIC 値が 2~4 倍上昇した。

4. 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus 209-P JC, *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* KC-1 および *P. aeruginosa* E-2 の増殖曲線に及ぼす LVFX の影響について検討した結果を Fig. 2~5 に示した。LVFX は対照として用いた OFLX および CPF₉₀ と同様に, 1/4 MIC から 1/2 MIC 以上の濃度で濃度依存的な殺菌作用を示した。DR-3354 では強い殺菌作用は認められなかった。

5. 位相差顕微鏡による形態観察

B. subtilis ATCC 6633, *E. coli* K-12 および *P. aeruginosa* E-2 に LVFX の 1/16 MIC から 16 MIC を作用させた時の 3 時間後の像を Fig. 6~8 に示した。*B. subtilis* ATCC 6633 は伸長化し, 1/2 MIC から溶菌像が認められた。さらに高濃度では菌体はあまり伸長化せず, 細胞内密度に偏りのある像がみられた。*E. coli* K-12 の場合にも菌体の伸長化が認められ, また膨化もみられた。特に 1/4~2 MIC で伸長化が著しく, 16 MIC ではあまり伸長化はみられなかった。*P. aeruginosa* E-2 に LVFX を作用させると, 菌体はやや伸長化し, 菌体内密度の偏りやスフェロプラスト, 溶菌像がみられた。

6. マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果 マウス実験的感染症に対する LVFX の治療効果を

Table 1. Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria (10⁶ cells/ml)

Organism	MIC (µg/ml)			
	levofloxacin	DR-3354	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.20	12.5	0.39	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.10	6.25	0.20	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.20	12.5	0.39	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	0.10	6.25	0.20	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.10	6.25	0.20	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80	0.20	12.5	0.39	0.39
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.78	100	1.56	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	0.39	100	0.78	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook*	0.39	100	0.39	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i> *	0.78	>100	1.56	0.39
Viridans group <i>Streptococcus</i> *	0.78	>100	1.56	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I*	0.39	100	0.39	0.20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II*	0.39	50	0.39	0.10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III*	0.39	50	0.78	0.20
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	0.20	6.25	0.20	0.10
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.78	25	1.56	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.025	1.56	0.05	0.025
<i>Bacillus anthracis</i>	0.05	3.13	0.10	0.05

Medium : heart infusion agar (Nissui)

* Supplemented with 10% horse blood

Method : agar dilution (streak)

Table 2. Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria (10⁶ cells/ml)

Organism	MIC (μg/ml)			
	levofloxacin	DR-3354	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	≤ 0.006	0.39	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.012	0.39	0.012	≤ 0.006
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.05	1.56	0.10	0.012
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.012	0.39	0.025	≤ 0.006
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.012	0.78	0.025	≤ 0.006
<i>Escherichia coli</i> KC-14	0.025	0.78	0.05	0.012
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.10	3.13	0.20	0.025
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.012	0.78	0.025	≤ 0.006
<i>Salmonella typhi</i> O-901	≤ 0.006	0.78	0.012	≤ 0.006
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.012	0.78	0.025	≤ 0.006
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.025	1.56	0.05	≤ 0.006
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.025	0.78	0.025	≤ 0.006
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.025	1.56	0.05	0.012
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.025	0.78	0.025	≤ 0.006
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.025	0.78	0.025	≤ 0.006
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.025	0.78	0.05	≤ 0.006
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.025	1.56	0.05	0.012
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.025	1.56	0.05	0.012
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.05	1.56	0.10	0.025
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.05	3.13	0.10	0.012
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.05	1.56	0.10	0.025
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.025	1.56	0.05	≤ 0.006
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.20	6.25	0.39	0.10
<i>Serratia marcescens</i> T-55	0.10	6.25	0.39	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.012	0.78	0.05	0.012
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.025	3.13	0.05	0.012
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.10	3.13	0.20	0.012
<i>Morganella morganii</i> Kono	0.05	3.13	0.20	0.025
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	0.012	1.56	0.025	≤ 0.006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	0.39	25	1.56	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	0.10	6.25	0.20	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	0.78	25	1.56	0.20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	0.20	12.5	0.39	0.39
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211**	0.025	0.78	0.05	0.012

Medium : heart infusion agar (Nissui)

* Supplemented with 10% horse blood (Chocolate agar)

** Supplemented with 5% Fildes enrichment

Method : agar dilution (streak)

Table 3. Antibacterial spectrum of anaerobic bacteria (10⁶ cells/ml)

Organism	MIC (μg/ml)			
	levofloxacin	DR-3354	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 14952	1.56	50	3.13	1.56
<i>Clostridium tetani</i>	0.10	12.5	0.20	0.05
<i>Clostridium perfringens</i>	0.20	25	0.39	0.20
<i>Clostridium sporogenes</i> GAI 0005	0.05	6.25	0.20	0.05
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	0.78	50	1.56	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0.39	50	0.78	3.13
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	3.13	100	6.25	25
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	3.13	100	6.25	12.5
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	3.13	100	6.25	25
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	50	100	50	100

Medium : GAM agar (Nissui)

Method : agar dilution (streak)

Table 4-1. Comparative *in vitro* activity of levofloxacin, DR-3354, ofloxacin and ciprofloxacin against clinical bacterial isolates

Bacterial species (no. of isolates)	Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	50%	90%
<i>S. aureus</i> (43) methicillin-susceptible	levofloxacin	0.10 ~ 1.56	0.20	0.78
	DR-3354	6.25 ~ >100	25	50
	ofloxacin	0.20 ~ 1.56	0.39	1.56
	ciprofloxacin	0.05 ~ 3.13	0.39	3.13
<i>S. aureus</i> (31) methicillin-resistant	levofloxacin	0.05 ~ 0.78	0.20	0.39
	DR-3354	3.13 ~ >100	12.5	50
	ofloxacin	0.10 ~ 1.56	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.78	3.13
<i>S. epidermidis</i> (33)	levofloxacin	0.20 ~ 1.56	0.20	0.78
	DR-3354	12.5 ~ >100	12.5	100
	ofloxacin	0.39 ~ 6.25	0.39	1.56
	ciprofloxacin	0.20 ~ 12.5	0.39	1.56
<i>S. pyogenes</i> (35)	levofloxacin	0.39 ~ 0.78	0.39	0.78
	DR-3354	100 ~ >100	>100	>100
	ofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	ciprofloxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.78
<i>S. pneumoniae</i> (50)	levofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	DR-3354	>100	>100	>100
	ofloxacin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	0.78
<i>E. faecalis</i> (30)	levofloxacin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
	DR-3354	100 ~ >100	>100	>100
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
<i>E. faecium</i> (30)	levofloxacin	0.39 ~ 6.25	1.56	3.13
	DR-3354	>100	>100	>100
	ofloxacin	0.78 ~ 12.5	3.13	6.25
	ciprofloxacin	0.39 ~ 12.5	1.56	3.13
<i>E. avium</i> (14)	levofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	DR-3354	>100	>100	>100
	ofloxacin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
<i>E. coli</i> (42)	levofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.78	0.05	0.10
	DR-3354	0.39 ~ 25	1.56	3.13
	ofloxacin	0.05 ~ 1.56	0.10	0.20
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.39	0.025	0.05
<i>C. freundii</i> (34)	levofloxacin	0.025 ~ 1.56	0.10	0.39
	DR-3354	1.56 ~ 25	3.13	12.5
	ofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.78	0.10	0.20
<i>K. pneumoniae</i> (43)	levofloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.10
	DR-3354	1.56 ~ 6.25	1.56	3.13
	ofloxacin	0.10 ~ 0.20	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.20	0.05	0.05

Table 4-2. Comparative *in vitro* activity of levofloxacin, DR-3354, ofloxacin and ciprofloxacin against clinical bacterial isolates

Bacterial species (no. of isolates)	Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	50%	90%
<i>E. cloacae</i> (29)	levofloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.20
	DR-3354	0.78 ~ 6.25	3.13	6.25
	ofloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.39
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.20	0.05	0.20
<i>E. aerogenes</i> (34)	levofloxacin	0.025 ~ 0.39	0.10	0.10
	DR-3354	0.78 ~ 12.5	3.13	3.13
	ofloxacin	0.05 ~ 0.78	0.20	0.20
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.20	0.05	0.05
<i>S. marcescens</i> (43)	levofloxacin	0.10 ~ 6.25	0.39	3.13
	DR-3354	3.13 ~ >100	25	100
	ofloxacin	0.20 ~ 12.5	0.78	6.25
	ciprofloxacin	0.05 ~ 6.25	0.39	3.13
<i>P. vulgaris</i> (41)	levofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.10	0.20
	DR-3354	1.56 ~ 25	6.25	12.5
	ofloxacin	0.05 ~ 0.78	0.20	0.39
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.20	0.05	0.10
<i>P. mirabilis</i> (29)	levofloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.20
	DR-3354	3.13 ~ 25	12.5	12.5
	ofloxacin	0.20 ~ 0.39	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.20	0.10	0.10
<i>P. rettgeri</i> (17)	levofloxacin	0.025 ~ 3.13	0.39	1.56
	DR-3354	1.56 ~ 100	25	100
	ofloxacin	0.05 ~ 6.25	0.78	3.13
	ciprofloxacin	0.012 ~ 1.56	0.10	1.56
<i>M. morgani</i> (28)	levofloxacin	0.05 ~ 3.13	0.20	0.39
	DR-3354	1.56 ~ 50	3.13	12.5
	ofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.20	0.78
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 1.56	0.05	0.20
<i>P. aeruginosa</i> (43)	levofloxacin	0.39 ~ 6.25	0.78	1.56
	DR-3354	12.5 ~ 100	25	50
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.10 ~ 1.56	0.39	0.39
<i>A. calcoaceticus</i> (42)	levofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.20	0.39
	DR-3354	1.56 ~ 12.5	6.25	12.5
	ofloxacin	0.05 ~ 0.78	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.78	0.39	0.78
<i>H. influenzae</i> (22)	levofloxacin	0.012 ~ 0.78	0.025	0.05
	DR-3354	0.39 ~ >100	0.78	1.56
	ofloxacin	0.025 ~ 1.56	0.05	0.10
	ciprofloxacin	0.012 ~ 1.56	0.012	0.05
<i>B. catarrhalis</i> (19)	levofloxacin	0.05 ~ 0.10	0.05	0.10
	DR-3354	3.13 ~ 6.25	3.13	3.13
	ofloxacin	0.10	0.10	0.10
	ciprofloxacin	0.05	0.05	0.05

Table 5. Antibacterial spectrum of quinolone-resistant bacteria (10^6 cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	levofloxacin	DR-3354	ofloxacin	ciprofloxacin
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> 1	25	>100	25	100
3	25	>100	25	50
5	25	>100	25	100
Alpha-hemolytic <i>Streptococcus</i> 1	3.13	>100	6.25	3.13
<i>Enterococcus</i> sp. 1	6.25	>100	12.5	6.25
<i>Escherichia coli</i> 1	12.5	>100	25	12.5
2	25	>100	50	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	25	>100	50	25
<i>Citrobacter freundii</i> 1	25	>100	50	25
<i>Enterobacter</i> sp. 1	25	>100	50	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	>100	>100	>100	25
2	12.5	>100	25	3.13
3	25	>100	25	6.25
4	12.5	>100	25	6.25
5	12.5	>100	25	3.13
6	6.25	>100	12.5	3.13
7	25	>100	50	6.25
8	25	>100	50	50
9	25	>100	50	6.25
10	6.25	>100	25	3.13
11	25	>100	100	12.5
12	25	>100	25	6.25
13	100	>100	100	6.25
14	>100	>100	>100	25
<i>Pseudomonas putida</i> 1	50	>100	50	12.5
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 1	25	>100	100	50
<i>Alcaligenes faecalis</i> 1	25	>100	50	>100
<i>Alcaligenes</i> sp. 1	50	>100	>100	100
2	50	>100	100	100
3	50	>100	100	100
4	50	>100	100	100
5	25	>100	50	100
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1	100	>100	>100	>100
2	100	>100	>100	>100
<i>Flavobacterium odoratum</i> 1	25	>100	50	25
2	12.5	>100	25	50
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 1	50	>100	50	100
2	12.5	>100	25	12.5
3	6.25	>100	25	12.5
4	50	>100	100	100

Medium : heart infusion agar (Nissui)

Method : agar dilution (streak)

Table 6および7に示した。経口投与した際のLVFXの50%有効量(ED₅₀値)は、*S. aureus*(ED₅₀ 3.15mg/kg), *E. coli* (ED₅₀ 0.37mg/kg), *K. pneumoniae* (ED₅₀ 0.43mg/kg), *S. marcescens* (ED₅₀ 7.05mg/kg), *P. aeruginosa* (ED₅₀ 10.5mg/kg) および *A. calcoaceticus* (ED₅₀ 1.55mg/kg)においてOFLXおよびCPFXよりも優れていた。また、経口投与した際のLVFXのED₅₀値は静脈内投与した際のED₅₀値より2~6倍大きかった。

Ⅲ. 総括および考察

新しい合成化学療法剤LVFXの*in vitro*および*in vivo*抗菌力を、既知化学療法剤OFLX, CPFXおよびDR-3354を比較薬として用い、検討した。その結果、本剤は広い抗菌スペクトルを有しており、グラム陽性菌群に対しては最も優れた抗菌力を、グラム陰性菌群に対してはCPFXに次いで優れた抗菌力を示した。また、その抗菌力はいずれの菌種においてもOFLXのほぼ2倍であった。抗菌力に及ぼす培地、馬血清添加および接種菌量の影響はみられず、培地pHがアルカリ側の時に抗菌力が良好となった。また、LVFXの抗菌力はpH6.0で減弱したが、采ら⁸⁾はpH5.0で著明に減弱したがpH6.0では大きく変化しなかったと報告している。これは、用いた菌株の相違によることが一つの原因と考えられる。

抗菌作用形式では*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* および *P. aeruginosa*において著明な殺菌性が認められた。また、LVFX作用後の形態変化を位相差顕微鏡により観察したところ、*B. subtilis*で著しい菌体の伸長化および溶菌像が、*E. coli*においても伸長化細胞および膨化が、*P. aeruginosa*では菌体はあまり伸長化せず、スフェロプラスト、溶菌像また菌体内密度の偏った細胞が観察された。

LVFXはDNA gyraseを阻害することにより、その抗菌力を示すといわれている¹⁾。*S. aureus*, *E. coli*をはじめ多くの菌種で本酵素の精製が行われ、直接その阻害作用が証明されており¹⁹⁾、LVFXとOFLXの抗菌力の相違は、抗DNA gyrase活性の差に由来すると考えられる¹⁾。しかし、薬剤の作用機作と菌体形態変化との関連、分割された光学活性体の抗菌力の相違が単にDNA gyrase阻害作用の反映であるのか等、未だ不明の点は多く、今後検討しなければならないであろう。

CPFXと比較した場合、LVFXは*Staphylococcus* spp. に2~8倍優れた抗菌力を示し、*Enterococcus* spp.には同等であった。そして*S. pneumoniae*および*P. aeruginosa*以外のグラム陰性菌に対しては、約2倍劣っており、*P. aeruginosa*では約4倍劣っていた。しかし、マウス実験的感染症に対する治療効果では、LVFXが最も優

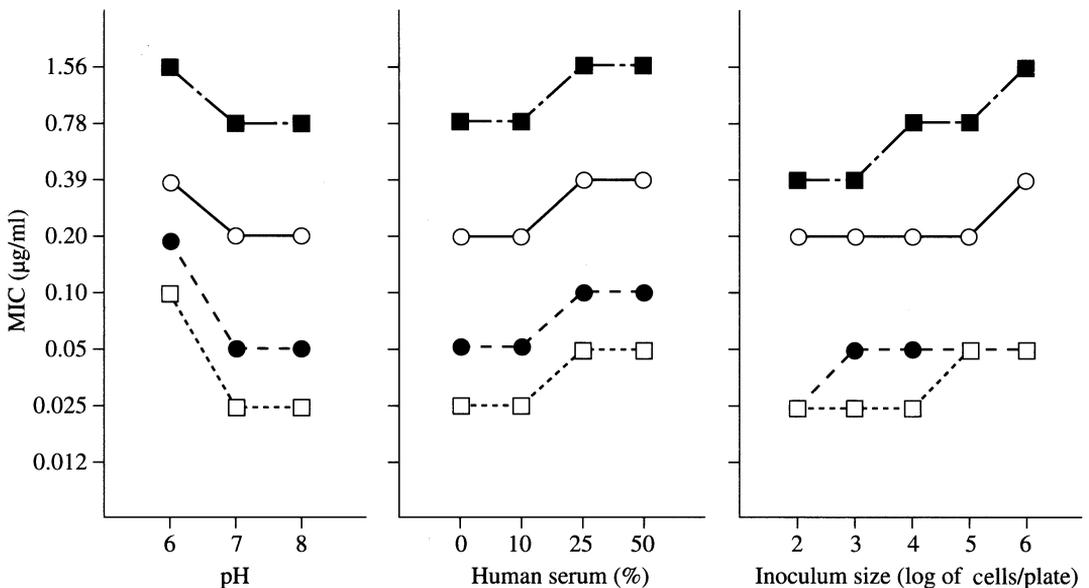


Fig. 1. Effect of growth medium, pH, addition of human serum and inoculum size on the activity of levofloxacin. MICs of *S. aureus* (○), *E. coli* (●), *K. pneumoniae* (□) and *P. aeruginosa* (■) are shown.

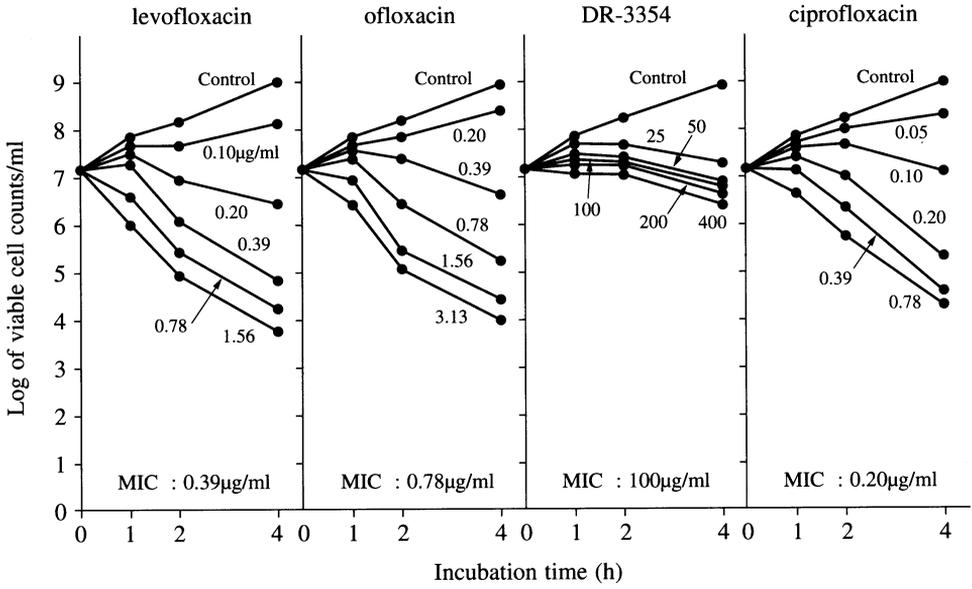


Fig. 2. Effects of levofloxacin, ofloxacin, DR-3354 and ciprofloxacin on the viability of *S. aureus* 209-P JC.

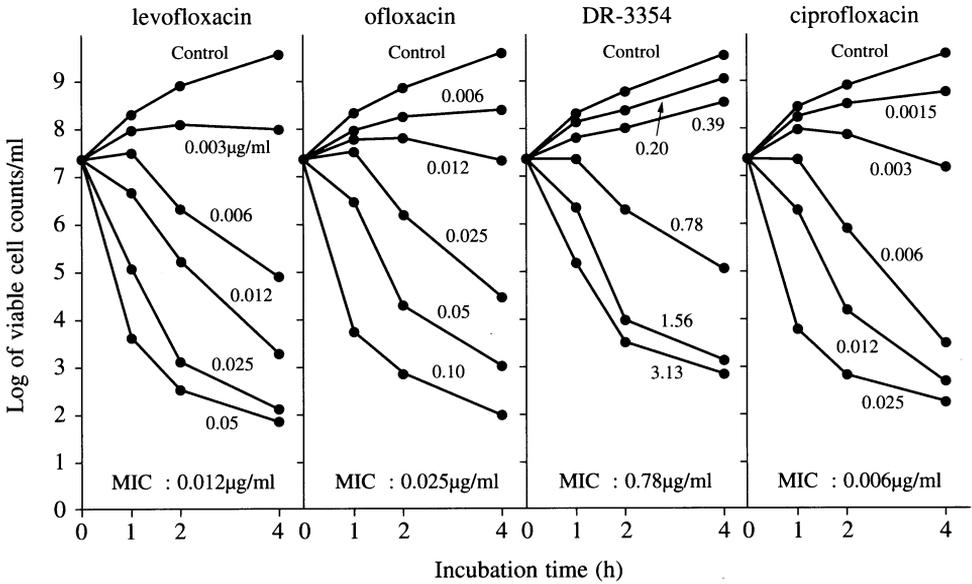


Fig. 3. Effects of levofloxacin, ofloxacin, DR-3354 and ciprofloxacin on the viability of *E. coli* K-12.

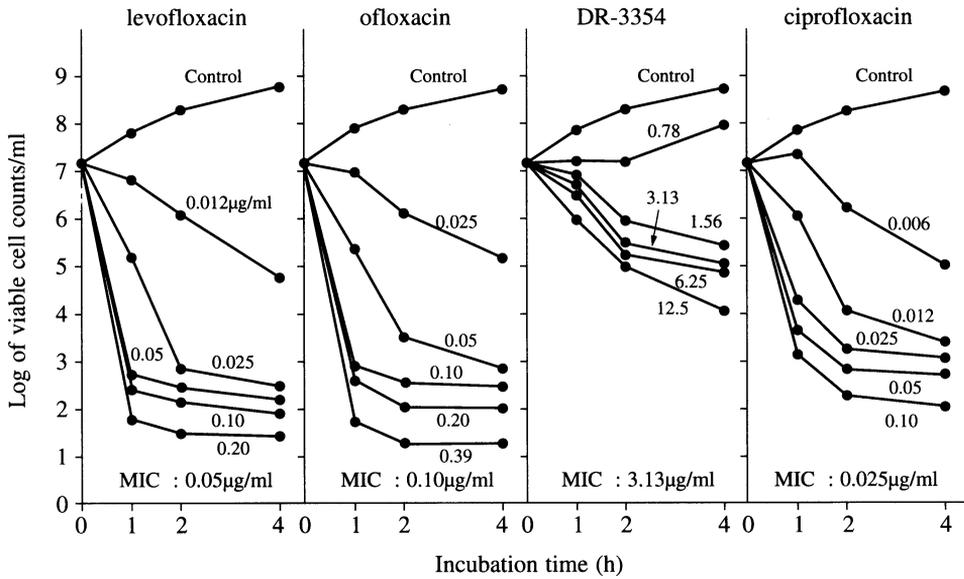


Fig. 4. Effects of levofloxacin, ofloxacin, DR-3354 and ciprofloxacin on the viability of *K. pneumoniae* KC-1.

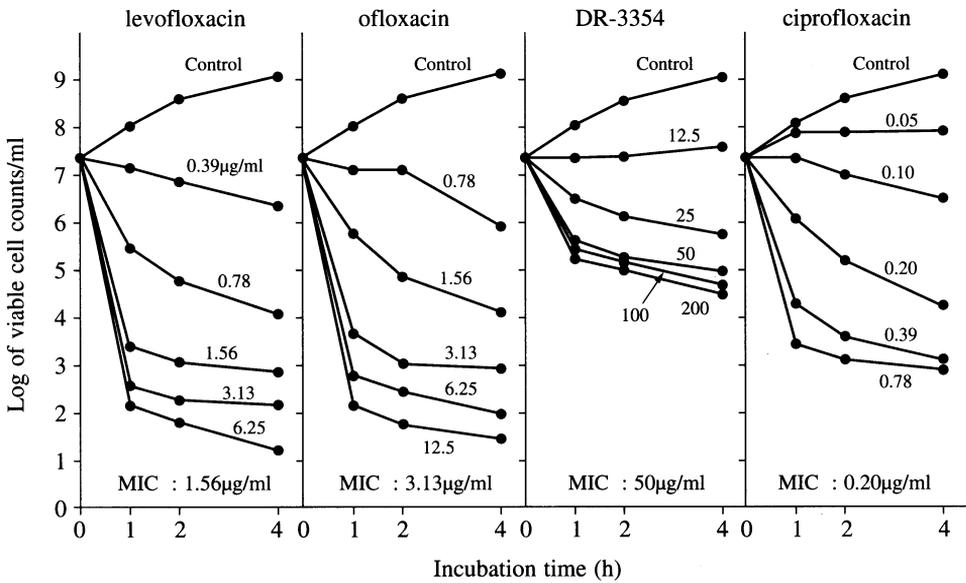


Fig. 5. Effects of levofloxacin, ofloxacin, DR-3354 and ciprofloxacin on the viability of *P. aeruginosa* E-2.

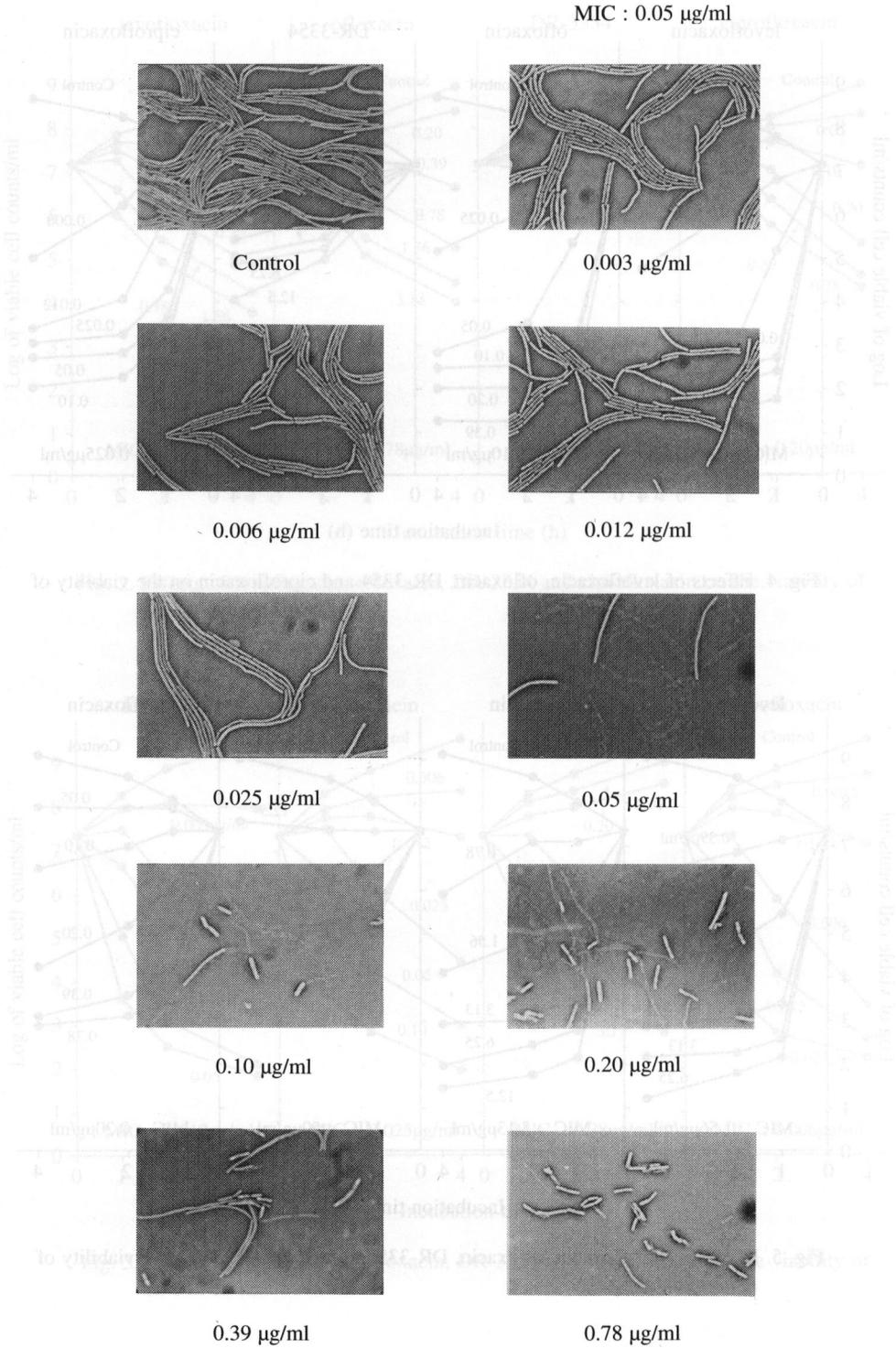


Fig. 6. Phase-contrast micrographs of *B. subtilis* ATCC 6633 exposed to levofloxacin for 3 hours.

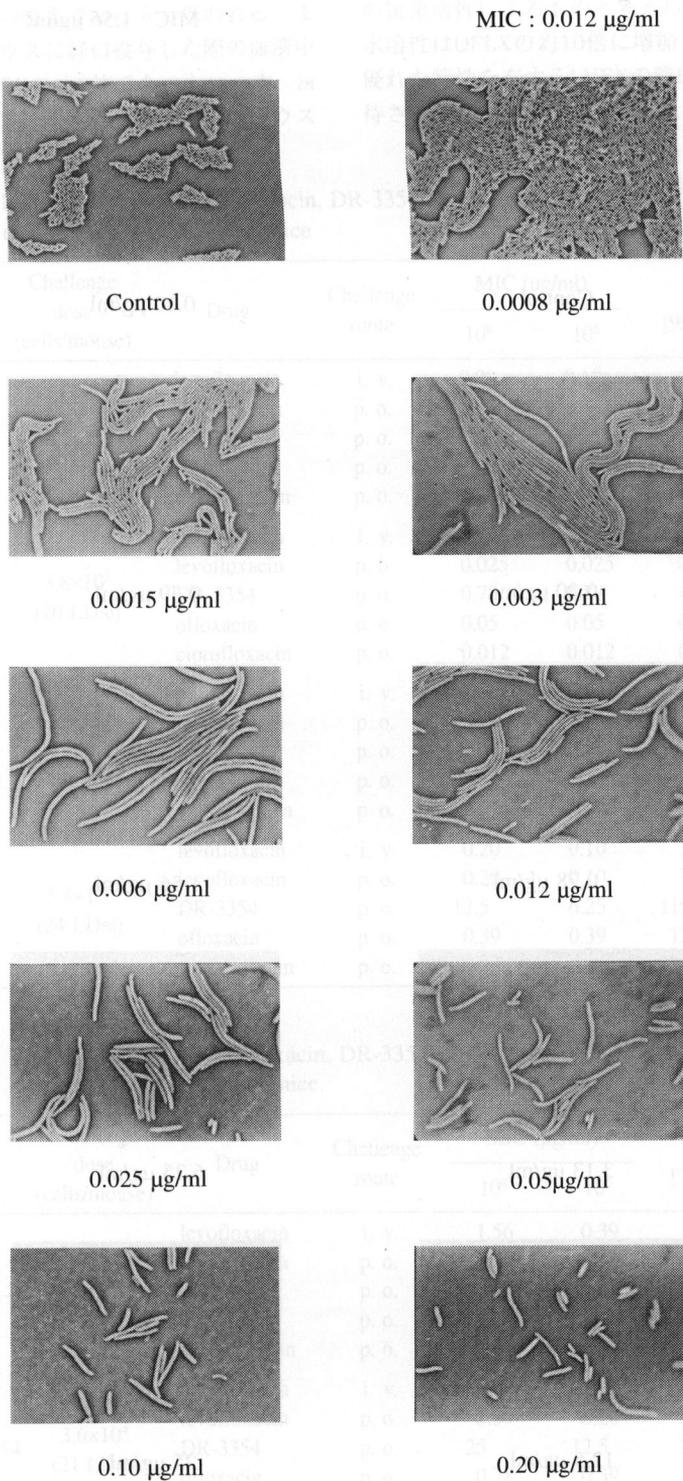


Fig. 7. Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to levofloxacin for 3 hours.

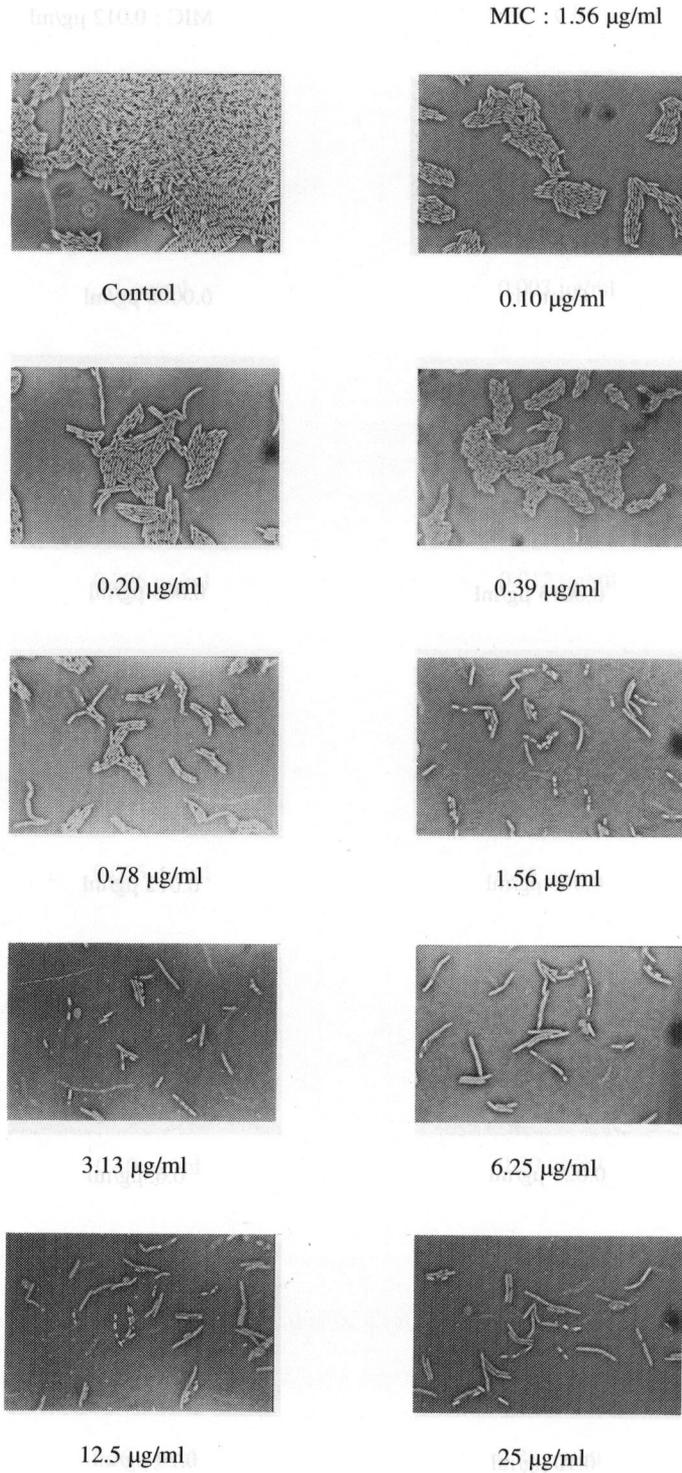


Fig. 8. Phase-contrast micrographs of *P. aeruginosa* E-2 exposed to levofloxacin for 3 hours.

れた抗菌力を示し、これは本剤の持つ優れた経口吸収性、良好な組織移行性の結果であろうと思われる。また、50mg/kgを正常マウスに経口投与した際の血清中濃度は、LVFXではCPFXの約2倍であった。一方、*in vivo*でのLVFXのOFLXに対する優位性は、正常マウス

での経口吸収性が同等であることから、その*in vitro*での抗菌活性によるものと考えられる。また、LVFXの水溶性はOFLXの約10倍に増加しており、このような優れた特性を有するLVFXの臨床における有用性が期待される。

Table 6. Protecting effect of levofloxacin, DR-3354, ofloxacin and ciprofloxacin against experimental infections in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Drug	Challenge route	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/kg) [95% confidence limits]
				10 ⁸	10 ⁶	
<i>S. aureus</i> Smith	1.3×10 ⁵ (108 LD ₅₀)	levofloxacin	i. v.	0.20	0.10	1.10 [0.74 ~ 1.65]
		levofloxacin	p. o.	0.20	0.10	3.15 [2.74 ~ 3.63]
		DR-3354	p. o.	12.5	6.25	90.5 [76.5 ~ 107]
		ofloxacin	p. o.	0.39	0.20	6.30 [5.50 ~ 7.25]
		ciprofloxacin	p. o.	0.20	0.10	11.6 [9.80 ~ 13.7]
<i>E. coli</i> KC-14	3.8×10 ² (20 LD ₅₀)	levofloxacin	i. v.	0.025	0.025	0.18 [0.15 ~ 0.21]
		levofloxacin	p. o.	0.025	0.025	0.37 [0.32 ~ 0.43]
		DR-3354	p. o.	0.78	0.78	4.05 [3.07 ~ 5.35]
		ofloxacin	p. o.	0.05	0.05	0.61 [0.49 ~ 0.77]
		ciprofloxacin	p. o.	0.012	0.012	0.57 [0.45 ~ 0.71]
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	1.6×10 ¹ (17 LD ₅₀)	levofloxacin	i. v.	0.05	0.025	0.16 [0.11 ~ 0.28]
		levofloxacin	p. o.	0.05	0.025	0.43 [0.30 ~ 0.63]
		DR-3354	p. o.	3.13	1.56	6.80 [5.85 ~ 7.90]
		ofloxacin	p. o.	0.10	0.05	0.97 [0.73 ~ 1.28]
		ciprofloxacin	p. o.	0.025	0.012	1.00 [0.76 ~ 1.32]
<i>S. marcescens</i> T-55	5.8×10 ⁵ (24 LD ₅₀)	levofloxacin	i. v.	0.20	0.10	3.50 [2.29 ~ 5.35]
		levofloxacin	p. o.	0.20	0.10	7.05 [4.35 ~ 11.4]
		DR-3354	p. o.	12.5	6.25	110 [75.5 ~ 160.5]
		ofloxacin	p. o.	0.39	0.39	12.8 [7.50 ~ 21.7]
		ciprofloxacin	p. o.	0.20	0.10	15.0 [10.3 ~ 21.9]

Table 7. Protecting effect of levofloxacin, DR-3354, ofloxacin and ciprofloxacin against experimental infections in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Drug	Challenge route	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/kg) [95% confidence limits]
				10 ⁸	10 ⁶	
<i>P. aeruginosa</i> E-2	1.3×10 ⁴ (10 LD ₅₀)	levofloxacin	i. v.	1.56	0.39	1.70 [1.00 ~ 2.89]
		levofloxacin	p. o.	1.56	0.39	10.5 [7.10 ~ 15.6]
		DR-3354	p. o.	50	25	160 [100 ~ 256]
		ofloxacin	p. o.	1.56	1.56	32.0 [23.7 ~ 43.2]
		ciprofloxacin	p. o.	0.20	0.20	17.5 [12.4 ~ 24.7]
<i>A. calcoaceticus</i> Ac-54	3.6×10 ⁴ (21 LD ₅₀)	levofloxacin	i. v.	0.39	0.20	0.32 [0.22 ~ 0.46]
		levofloxacin	p. o.	0.39	0.20	1.55 [1.04 ~ 2.33]
		DR-3354	p. o.	25	12.5	38.0 [22.0 ~ 65.5]
		ofloxacin	p. o.	0.78	0.39	3.20 [1.83 ~ 5.60]
		ciprofloxacin	p. o.	0.78	0.39	9.00 [6.75 ~ 12.0]

文 献

- 1) Imamura M, Shibamura S, Hayakawa I, and Osada Y: Inhibition of DNA gyrase by optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 325~327, 1987
- 2) Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, Imamura M, Sakano K, and Furukawa M: Synthesis and antibacterial activity of optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 163~164, 1986
- 3) 西野武志, 田中真由美, 河端繁勝, 藪 千晶, 山中邦俊, 谷野輝雄: 新しい合成化学療法剤 DL-8280に関する細菌学的評価。Chemotherapy 32(S-1): 62~83, 1984
- 4) 西野武志, 田中真由美, 監物英男, 谷野輝雄: 新しい合成化学療法剤 BAY-o 9867 (Ciprofloxacin)に関する細菌学的評価。Chemotherapy 33(S-7): 39~62, 1985
- 5) 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 22: 1126~1128, 1974
- 6) 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, 1979
- 7) Litchfield J T and Wilcoxon F: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99~113, 1949
- 8) Une T, Fujimoto T, Sato K, and Osada Y: *In vitro* activity of DR-3355, an optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1336~1340, 1988
- 9) Tanaka M, Sato K, Kimura Y, Hayakawa I, Osada Y, and Nishino T: Inhibition by quinolones of DNA gyrase from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1489~1491, 1991

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEVOFLOXACIN

Takeshi Nishino, Mayumi Tanaka, Yuko Aono, Takaya Iwai and Masako Otsuki

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University,
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of levofloxacin [LVFX, DR-3355; S-(-)-ofloxacin] were compared with those of ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPF) and DR-3354 [R-(+)-OFLX]. The following results were obtained.

LVFX showed a broad antimicrobial spectrum against gram-positive and gram-negative bacteria, and its antibacterial activity was generally twice as potent as that of OFLX. In the sensitivity distribution of clinically isolated strains, the activity of LVFX was superior to OFLX, CPF and DR-3354 against gram-positive bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus*, and slightly inferior to CPF and superior to OFLX and DR-3354 against gram-negative bacteria.

The activity of LVFX was largely unaffected by the type of culture medium, inoculum size or addition of human serum, but it was enhanced in an alkaline medium.

LVFX showed potent concentration-dependent bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

In a morphological examination by phase-contrast microscope, LVFX induced the formation of filamentous cells in *Bacillus subtilis* and *E. coli*, and cell lysis of *B. subtilis*. *P. aeruginosa* showed spheroplast formation and cell lysis after exposure to LVFX.

The protective effect of orally-administered LVFX in experimental infections in mice with various bacterial pathogens was superior to the effects of OFLX, CPF and DR-3354.