

新しいキノロン系抗菌薬grepafloxacinの細菌学的評価

分部浩和・三橋 進

エビゾーム研究所*

新しいキノロン系抗菌薬grepafloxacin (GPFX) の *in vitro* 抗菌活性を sparfloxacin (SPFX), ciprofloxacin (CPFX), ofloxacin (OFLX) と比較検討し以下の結果を得た。

1. GPFXは、グラム陽性菌からグラム陰性菌まで強い抗菌力と、幅広い抗菌スペクトラムを有していた。グラム陽性菌に対しては、SPFXと同等でありCPFX, OFLXより優れていた。また、グラム陰性菌に対しては、CPFXより弱くSPFX, OFLXと同程度の活性を有していた。
2. GPFXは、MIC濃度で殺菌的に作用した。
3. GPFXは、マグネシウムイオンの存在、および培地のpHが酸性側で活性の低下が観察された。
4. GPFXは、接種菌量が高くなると抗菌力が低下した。
5. GPFXの自然耐性菌の出現頻度は低かった。
6. GPFXは、*Escherichia coli*由来のDNA gyraseのスーパーコイリング活性を強く阻害した。

Key words : Grepafloxacin, キノロン, DNA gyrase

Grepafloxacin (GPFX)¹⁾は、大塚製薬株式会社で開発された新しいキノロン系合成抗菌薬で、キノロンカルボン酸骨格の5位にメチル基、7位に3-メチルピペラジニル基を有することが化学構造上の特徴である。今回、GPFXの *in vitro* 抗菌力を sparfloxacin (SPFX)²⁾, ciprofloxacin (CPFX)³⁾, ofloxacin (OFLX)⁴⁾と比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 試験薬剤

GPFXは大塚製薬、SPFXは大日本製薬、CPFXはバイエル薬品、OFLXは第一製薬、methicillin (DMPPC)は萬有製薬から分与された。

2. 使用菌株

標準菌株および臨床分離株はエビゾーム研究所および群馬大学薬剤耐性菌実験施設の保存株を使用した。

3. 薬剤感受性測定法

日本化学療法学会標準法^{5,6)}に準じて、寒天平板希釈法でMICを測定した。使用培地は特に記さないかぎり Sensitivity disk agar-N (SDA; 日水製薬) および Sensitivity test broth (STB; 日水製薬)を使用した。レンサ球菌属の菌種には5%馬脱繊維血(日本生物材料センター)を添加したSDAを使用し、*Haemophilus influenzae*には5% Fildes enrichment (Difco)を添加したSDAを使用、*Neisseria gonorrhoeae*ではGC agarに1% Hemoglobin (Difco) および1% Isovitale X (BBL)を添加したSDAを使用した。また嫌気性菌の培地にはGAM agar(日水製薬)およびGAM broth(日水製薬)を用いた。接種菌量は、約 10^6 CFU/ml

に調整し、この菌液をマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて約5 μ lづつ薬剤含有平板上に接種した。37℃、18~24時間培養後、肉眼的に発育の見られない最小薬剤濃度をMICとした。

4. 殺菌作用

a) 殺菌曲線

試験菌をSTBで37℃、一晚静置培養後新鮮STBに約 5×10^4 CFU/mlになるように接種し37℃2時間振盪培養後薬剤を添加し経時的に生菌数を測定した。なお薬剤の最終濃度は、本条件下におけるMICの1/4, 1/2, 1および2倍濃度とした。

b) 最小殺菌濃度(MBC)の測定

試験菌のMICをSTBを用いた液体希釈法を用いて測定した後、肉眼的に菌の増殖の認められない培養液中の生残菌数を測定し生残菌数が接種菌量の0.1%未満となる最小薬剤濃度をMBCとした。

5. 抗菌力、殺菌力に及ぼす培地pHの影響およびマグネシウムイオンの影響

a) 培地pHの影響

1N HClおよび1N NaOHでpHを調整したSTBを用いMICおよびMBCを測定した。

b) マグネシウムイオンの影響

STBにMgCl₂を、3, 6, 9mM添加し、MICとMBCを測定した。

6. 接種菌量の影響

接種菌量を 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/mlに調整し、液体希釈法でMICを測定した。

7. 自然耐性菌出現頻度の測定

試験菌をSTBで37℃、一晚振盪培養後、この培養液0.1mlを2～8MIC濃度の薬剤を含むSDAに塗抹し、37℃、40時間培養し、生じたコロニー数を測定した。

8. *Escherichia coli*由来DNA gyraseに対する阻害作用

E. coli KL-16株より既報⁷⁾によりDNA gyraseを分画し、得られた酵素のDNAスーパーコイルリング反応を50%阻害する薬剤の濃度(IC₅₀)を求めた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

GPFXの抗菌スペクトルをTable 1に示した。GPFXの抗菌スペクトルはグラム陽性菌・陰性菌ともにSPFXとほぼ同等であり、CPFXと比べるとグラム陽性菌に強く、陰性菌では劣っていた。OFLXと比べるとグラム陽性から陰性菌まで優れていた。以上の様にGPFXは、強い抗菌力と幅広いスペクトルを有していた。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

臨床より分離された菌株を用いて、GPFXの抗菌力を検討した(Table 2)。

メチシリン感受性の *Staphylococcus aureus*に対する抗菌力をMIC₉₀で比較するとGPFX, SPFX>OFLX>CPFXの順に活性を示した。メチシリン耐性の *S. aureus* に対しては、いずれの薬剤も抗菌力は低かった。*Staphylococcus epidermidis*に対するGPFXのMIC₉₀は0.1μg/mlであり、

SPFXと同等、CPFX, OFLXより優れていた。*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*に対するGPFXのMIC₉₀は0.39μg/mlであり、SPFXと同等、CPFX, OFLXより優れていた。しかしながら *S. pneumoniae* 1株に12.5μg/mlのMICを示す耐性菌がみられた。*Enterococcus faecium*に対しては、いずれの薬剤も耐性化が進んでいた。*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. に対するGPFX, SPFX, CPFXおよびOFLXの抗菌力は、GPFXの抗菌力がCPFXより2～4倍劣ってはいるものの、SPFX, OFLXとほぼ同等の抗菌力を示した。*Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*に対する感受性は幅広く分布しており、抗菌力はCPFXが最も強くGPFX, SPFX, OFLXは、ほぼ同等の抗菌力であった。*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*に対するGPFX, SPFX, CPFXおよびOFLXのMIC₉₀はそれぞれ0.39～3.13, 0.39～6.25, 0.025～0.78および0.2～3.13μg/mlであり、GPFXの抗菌力は、*P. stuartii*を除いてCPFXの4～16倍抗菌力は劣り、OFLXとほぼ同等であった。*P. stuartii*に対するGPFXの抗菌力は、CPFXと同等でありOFLXより優れていた。*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*に対して試験薬剤は、幅広いMIC分布を示し、特に *B. cepacia*では、MIC₅₀の値が12.5μg/mlおよ

Table 1. Antibacterial activity of grepafloxacin and reference compounds against standard strains

	MIC (μg/ml)			
	grepafloxacin	sparfloxacin	ciprofloxacin	ofloxacin
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.05	0.05	0.2	0.39
<i>S. aureus</i> Terajima	0.05	0.05	0.39	0.39
<i>S. aureus</i> MS353	0.2	0.1	6.25	1.56
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.39	0.2	0.78	3.13
<i>M. luteus</i> ATCC9341	1.56	0.78	1.56	3.13
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	0.006	0.0125	0.05	0.1
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.025	0.0125	0.0125	0.1
<i>E. coli</i> K-12 C-600	0.025	0.05	0.025	0.1
<i>K. pneumoniae</i> PCI602	≤0.003	≤0.003	0.006	0.025
<i>S. typhimurium</i> IID971	0.05	0.025	0.025	0.1
<i>S. typhi</i> 901	0.0125	0.006	0.0125	0.05
<i>S. paratyphi</i> 1015	≤0.003	0.006	≤0.003	0.025
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.025	0.025	0.0125	0.1
<i>S. enteritidis</i> G-14	0.0125	0.0125	0.006	0.025
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0.78	0.78	0.2	0.39
<i>P. aeruginosa</i> IF03445	0.78	1.56	0.39	1.56
<i>P. aeruginosa</i> NCTC10490	0.78	0.39	0.39	1.56
<i>P. aeruginosa</i> PA01	0.39	0.39	0.2	0.78
<i>M. morganii</i> IF03848	0.2	0.39	0.0125	0.1
<i>P. mirabilis</i> IF03849	0.39	0.39	0.2	0.39
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.1	0.1	0.0125	0.05
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.006	0.0125	0.006	0.025
<i>P. rettgeri</i> IF03850	0.1	0.1	0.05	0.2
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	0.1	0.1	0.05	0.2
<i>E. cloacae</i> 963	0.1	0.05	0.025	0.2

Table 2-1. Antibacterial activity of grepafloxacin and reference compounds against aerobic and anaerobic bacteria

Organism (no. of isolates)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	50%	90%
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (106)	grepafloxacin	0.0125 ~ 0.2	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.025 ~ 0.1	0.05	0.1
	ciprofloxacin	0.1 ~ 6.25	0.39	0.78
	ofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.39	0.39
	methicillin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (148)	grepafloxacin	0.0125 ~ 25	0.2	12.5
	sparfloxacin	0.0125 ~ 25	0.1	6.25
	ciprofloxacin	0.2 ~ > 100	6.25	50
	ofloxacin	0.2 ~ 100	1.56	25
	methicillin	12.5 ~ > 100	> 100	> 100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (110)	grepafloxacin	0.025 ~ 0.2	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.2	0.05	0.1
	ciprofloxacin	0.1 ~ 1.56	0.2	0.39
	ofloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> (100)	grepafloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.39
	sparfloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.2 ~ 3.13	0.39	0.78
	ofloxacin	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (44)	grepafloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	0.39
	sparfloxacin	0.1 ~ 12.5	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.39 ~ 50	1.56	6.25
	ofloxacin	0.78 ~ 50	3.13	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (103)	grepafloxacin	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	1.56
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
<i>Enterococcus faecium</i> (95)	grepafloxacin	0.1 ~ 50	3.13	12.5
	sparfloxacin	0.1 ~ 100	0.78	6.25
	ciprofloxacin	0.2 ~ > 100	3.13	50
	ofloxacin	0.78 ~ > 100	6.25	100
<i>Escherichia coli</i> (89)	grepafloxacin	0.025 ~ 3.13	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.025 ~ 3.13	0.05	0.05
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 1.56	0.025	0.025
	ofloxacin	0.025 ~ 12.5	0.1	0.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (108)	grepafloxacin	0.025 ~ 0.78	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.0125 ~ 0.78	0.05	0.1
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.39	0.05	0.05
	ofloxacin	0.05 ~ 1.56	0.1	0.2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (104)	grepafloxacin	0.0125 ~ 0.2	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.0125 ~ 0.2	0.05	0.1
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 0.1	0.05	0.05
	ofloxacin	0.025 ~ 0.39	0.1	0.2
<i>Enterobacter cloacae</i> (102)	grepafloxacin	≤ 0.006 ~ 6.25	0.05	0.2
	sparfloxacin	0.0125 ~ 6.25	0.05	0.2
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 6.25	0.025	0.2
	ofloxacin	0.025 ~ 12.5	0.1	0.78
<i>Serratia marcescens</i> (108)	grepafloxacin	0.1 ~ > 100	0.78	25
	sparfloxacin	0.1 ~ 100	0.78	25
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 50	0.39	12.5
	ofloxacin	0.1 ~ > 100	1.56	25

Table 2-2. Antibacterial activity of grepafloxacin and reference compounds against aerobic and anaerobic bacteria

Organism (no. of isolates)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		range	50%	90%
<i>Citrobacter freundii</i> (97)	grepafloxacin	0.025 ~ 50	0.1	1.56
	sparfloxacin	0.025 ~ 50	0.1	1.56
	ciprofloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 25	0.025	0.39
	ofloxacin	0.05 ~ 50	0.2	1.56
<i>Shigella</i> spp. (108)	grepafloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 0.39	0.025	0.05
	sparfloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 0.39	0.025	0.025
	ciprofloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 0.39	0.0125	0.025
	ofloxacin	0.025 ~ 0.78	0.05	0.1
<i>Salmonella</i> spp. (108)	grepafloxacin	0.0125 ~ 0.2	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.0125 ~ 0.1	0.05	0.1
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 0.05	0.025	0.025
	ofloxacin	0.05 ~ 0.2	0.1	0.2
<i>Proteus mirabilis</i> (103)	grepafloxacin	0.05 ~ 50	0.39	0.39
	sparfloxacin	0.05 ~ 25	0.2	0.39
	ciprofloxacin	0.0125 ~ 6.25	0.05	0.05
	ofloxacin	0.05 ~ 12.5	0.2	0.2
<i>Proteus vulgaris</i> (95)	grepafloxacin	0.05 ~ 3.13	0.2	0.78
	sparfloxacin	0.05 ~ 3.13	0.2	1.56
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.39	0.05	0.1
	ofloxacin	0.05 ~ 1.56	0.1	0.39
<i>Providencia rettgeri</i> (54)	grepafloxacin	0.025 ~ 12.5	0.2	3.13
	sparfloxacin	0.025 ~ 12.5	0.2	6.25
	ciprofloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 6.25	0.1	0.78
	ofloxacin	0.05 ~ 25	0.39	3.13
<i>Providencia stuartii</i> (75)	grepafloxacin	0.025 ~ 3.13	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.0125 ~ 1.56	0.2	0.39
	ciprofloxacin	0.025 ~ 1.56	0.2	0.39
	ofloxacin	0.05 ~ 3.13	0.39	1.56
<i>Morganella morganii</i> (71)	grepafloxacin	0.05 ~ 12.5	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.025 ~ 25	0.2	0.39
	ciprofloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 25	0.0125	0.025
	ofloxacin	0.05 ~ 25	0.1	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (108)	grepafloxacin	0.2 ~ > 100	0.78	3.13
	sparfloxacin	0.2 ~ > 100	0.78	6.25
	ciprofloxacin	0.05 ~ 100	0.2	0.78
	ofloxacin	0.39 ~ > 100	1.56	6.25
<i>Burkholderia cepacia</i> (48)	grepafloxacin	0.78 ~ 100	12.5	25
	sparfloxacin	0.78 ~ 100	12.5	25
	ciprofloxacin	3.13 ~ > 100	12.5	25
	ofloxacin	6.25 ~ > 100	25	25
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (49)	grepafloxacin	0.2 ~ 6.25	0.39	0.78
	sparfloxacin	0.1 ~ 3.13	0.39	1.56
	ciprofloxacin	1.56 ~ 25	3.13	6.25
	ofloxacin	0.78 ~ 12.5	3.13	3.13
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (43)	grepafloxacin	0.025 ~ 0.39	0.05	0.39
	sparfloxacin	$\leq$ 0.006 ~ 0.39	0.025	0.1
	ciprofloxacin	0.05 ~ 3.13	0.2	0.78
	ofloxacin	0.05 ~ 3.13	0.2	0.78

び25 μ g/mlと高い値を示した。*P. aeruginosa*に対する抗菌力はCPFXが最も強く、次いでGPFX, SPFX, OFLXの順番であった。*Xanthomonas maltophilia*に対するGPFX, SPFX, CPFXおよびOFLXのMIC₉₀は、それぞれ0.78, 1.56, 6.25および3.13 μ g/mlでありGPFXが最も強い抗菌力を示した。*Acinetobacter calcoaceticus*に対しては、SPFXが最も強い抗菌力を示し、次いでGPFX, CPFX, OFLXの順であった。*H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*に対するGPFXの抗菌力はSPFX, CPFXと同程度の強い抗菌力を示した。嫌気性菌の*Bacteroides fragilis*に対するGPFXの抗菌力は、SPFXに次いで強かったがMIC₉₀の値は、12.5 μ g/mlと高かった。*Clostridium difficile*に対してはいずれの薬剤も抗菌力が弱かった。*Clostridium perfringens*に対するGPFXの抗菌力は対照薬剤と同程度であった。

3. 殺菌作用

a) 増殖曲線に及ぼす影響

GPFXの*S. aureus* Smith, *E. coli* ML4707および*P. aeruginosa* GN11189 3菌種に対する殺菌作用をSPFXおよびCPFXと比較検討した。*S. aureus* Smithに対してGPFXは1/2 MIC以上の濃度で殺菌的に作用し、4時間後

には菌は検出されなくなったが、その後再増殖が見られた。対照薬剤も同様の作用であった(Fig. 1)。

E. coli ML4707 (Fig. 2) および *P. aeruginosa* GN11189 (Fig. 3) に対しても1/2 MIC以上の濃度ですみやかに菌数の減少が認められた。GPFXは*P. aeruginosa* GN11189 に対し2 MICの濃度で再増殖を認めなかった。いずれの菌株においてもMIC濃度のGPFXに接触後、すみやかな生菌数の減少が認められ、本薬剤が殺菌的に作用すると考えられた。

b) MICとMBC

GPFXの標準菌株6菌種に対するMICとMBCをSPFX, CPFXおよびOFLXと比較検討した(Table 3)。GPFXは、*S. epidermidis* IID866でMICとMBCの差が4倍と開いていたが、その他の菌では同等か2倍の開きであった。対照に用いた他のキノロンも同様の結果が得られたことにより、GPFXはこれらの菌に対し殺菌的に作用するものと考えられた。

4. 抗菌力・殺菌力に及ぼすマグネシウムイオンの影響および培地pHの影響

GPFXのMICは、マグネシウムイオン添加により2~8倍上昇し、抗菌力の低下が認められた(Table 3)。

Table 2-3. Antibacterial activity of grepafloxacin and reference compounds against aerobic and anaerobic bacteria

Organism (no. of isolates)	Drug	MIC (μ g/ml)		
		range	50%	90%
<i>Haemophilus influenzae</i> (74)	grepafloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.05$	≤ 0.006	≤ 0.006
	sparfloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.1$	≤ 0.006	0.0125
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.05$	≤ 0.006	0.0125
	ofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.1$	0.025	0.05
<i>Moraxella catarrhalis</i> (42)	grepafloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.05$	0.025	0.025
	sparfloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.05$	0.025	0.025
	ciprofloxacin	0.025 $\sim$ 0.2	0.05	0.1
	ofloxacin	0.05 $\sim$ 0.2	0.1	0.1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (47)	grepafloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.2$	0.0125	0.05
	sparfloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.1$	≤ 0.006	0.025
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.2$	≤ 0.006	0.05
	ofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.39$	0.025	0.1
<i>Bacteroides fragilis</i> (35)	grepafloxacin	1.56 $\sim$ 50	3.13	12.5
	sparfloxacin	0.78 $\sim$ 12.5	1.56	3.13
	ciprofloxacin	6.25 $\sim$ >100	12.5	50
	ofloxacin	1.56 $\sim$ 100	3.13	25
<i>Clostridium difficile</i> (26)	grepafloxacin	25 $\sim$ 50	25	50
	sparfloxacin	6.25	6.25	6.25
	ciprofloxacin	12.5	12.5	12.5
	ofloxacin	12.5	12.5	12.5
<i>Clostridium perfringens</i> (16)	grepafloxacin	0.1 $\sim$ 3.13	0.39	0.78
	sparfloxacin	0.05 $\sim$ 0.78	0.2	0.39
	ciprofloxacin	0.2 $\sim$ 3.13	0.39	0.78
	ofloxacin	0.39 $\sim$ 3.13	0.78	0.78

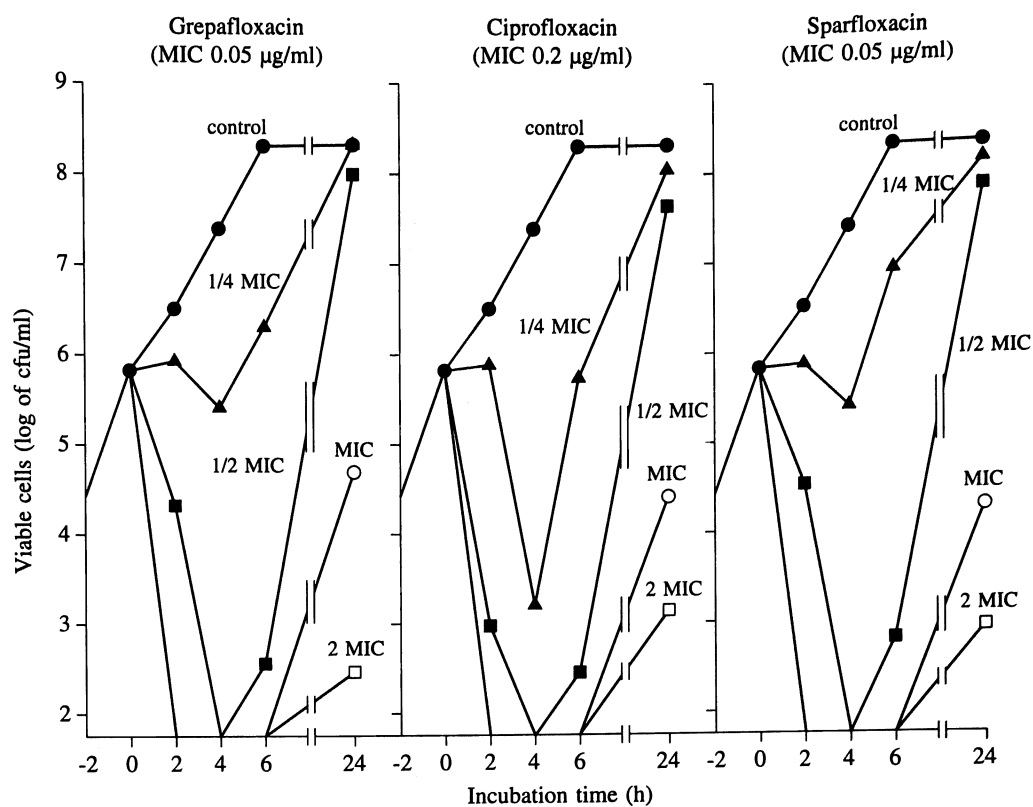


Fig. 1. Bactericidal activity of grepafloxacin against *Staphylococcus aureus* Smith.

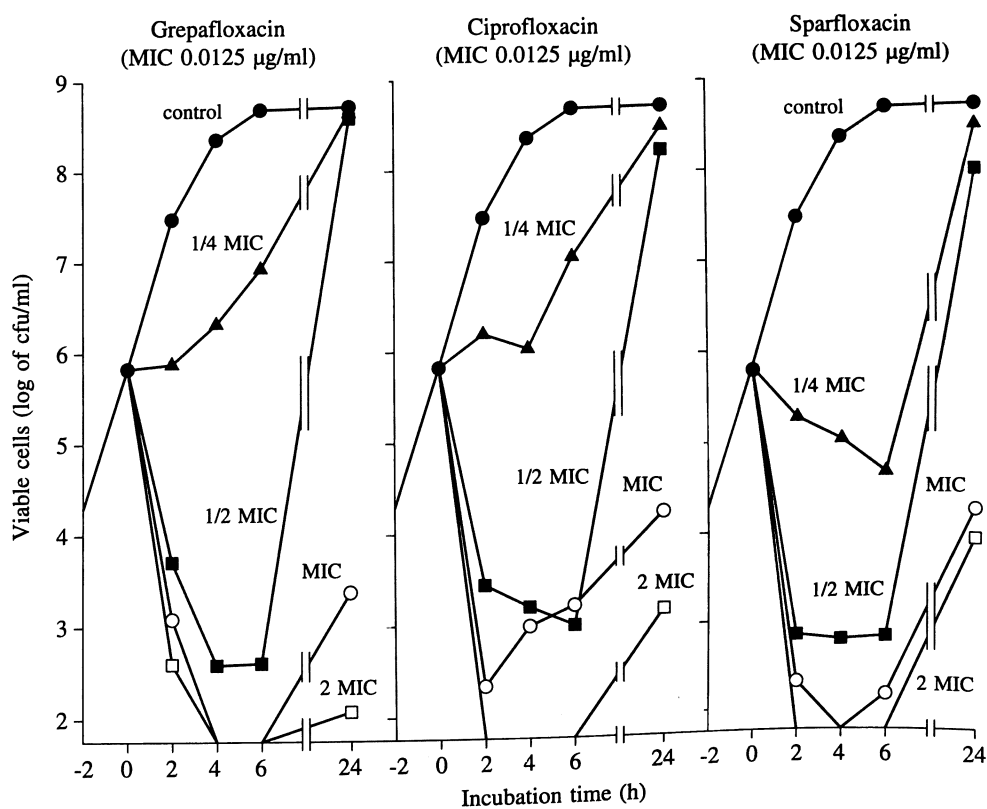


Fig. 2. Bactericidal activity of grepafloxacin against *Escherichia coli* ML4707.

しかしながらMBCは、上昇したMICの4倍以内であった。抗菌力の低下は、対照薬剤を含めて観察され、マグネシウムイオンの濃度が高くなるにつれ抗菌力の低下が大きくなる傾向があった。

培地pHがGPFXの抗菌力および殺菌力に及ぼす影響について検討した(Table 4)。GPFXのMICは、酸性培地(pH6)中で2~8倍上昇した。上昇したMICの2倍以内にMBC値は含まれていた。同様の結果が対照薬剤においても観察された。

5. 接種菌量の影響

接種菌量の抗菌活性に及ぼす影響について検討した結果をTable 5に示した。GPFXは試験した全ての菌種において接種菌量の増加がMIC値を上昇させ、対照薬剤と同様の結果であった。

6. 自然耐性菌出現頻度

GPFXに対する自然耐性菌出現頻度をSPFX, CPFXおよびOFLXと比較検討した(Table 6)。S. aureus Smithに対し全ての薬剤で2 MICの濃度では耐性菌の出現が認められたが、4 MICの濃度では2MICの1/100と低かった。E. coli ML4707株では、試験した全ての薬剤において2 MICの濃度で耐性菌の出現は低かった。P. aeruginosa GN11189では、SPFXの4 MICに耐性菌が認められた。一方、GPFXで選択された自然耐性菌のMICを測定したところS. aureus Smithで2 MICの濃度(0.1 μ g/ml)で選択

された8株のMICは、0.39 μ g/mlに上昇していた。P. aeruginosa GN11189株の2MICの濃度(1.56 μ g/ml)より選択された耐性菌8株のうち1株のMICは、3.13 μ g/mlであり残りは6.25 μ g/mlであった。

7. E. coli DNA gyraseに対する阻害

GPFX, SPFX, CPFX および OFLX の E. coli DNA gyraseのスーパーコイリング活性に対する50%阻害濃度はそれぞれ0.19, 0.085, 0.11および0.48 μ g/mlであった。

Ⅲ. 考 察

Norfloxacin, OFLX, CPFX等のいわゆるニューキノロン薬は、キノロン骨格の6位にフッ素, 7位にピペラジニル基を導入することにより、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を示すことが知られ、多くの薬剤が開発された²⁻⁴⁾。このニューキノロン薬の臨床での使用頻度は高く、重要な抗菌薬の一つとして位置付けられている。この度キノロン骨格の5位および7位のピペラジニル基にメチル基を導入した新キノロン薬GPFXが大塚製薬で新規に合成されたので、その*in vitro*抗菌力をSPFX, CPFXおよびOFLXを対照薬剤として比較検討した。

GPFXはグラム陽性菌からグラム陰性菌まで幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有していた。特にグラム陽性菌に対しては、強い抗菌力を示し、本剤の特徴の一つ

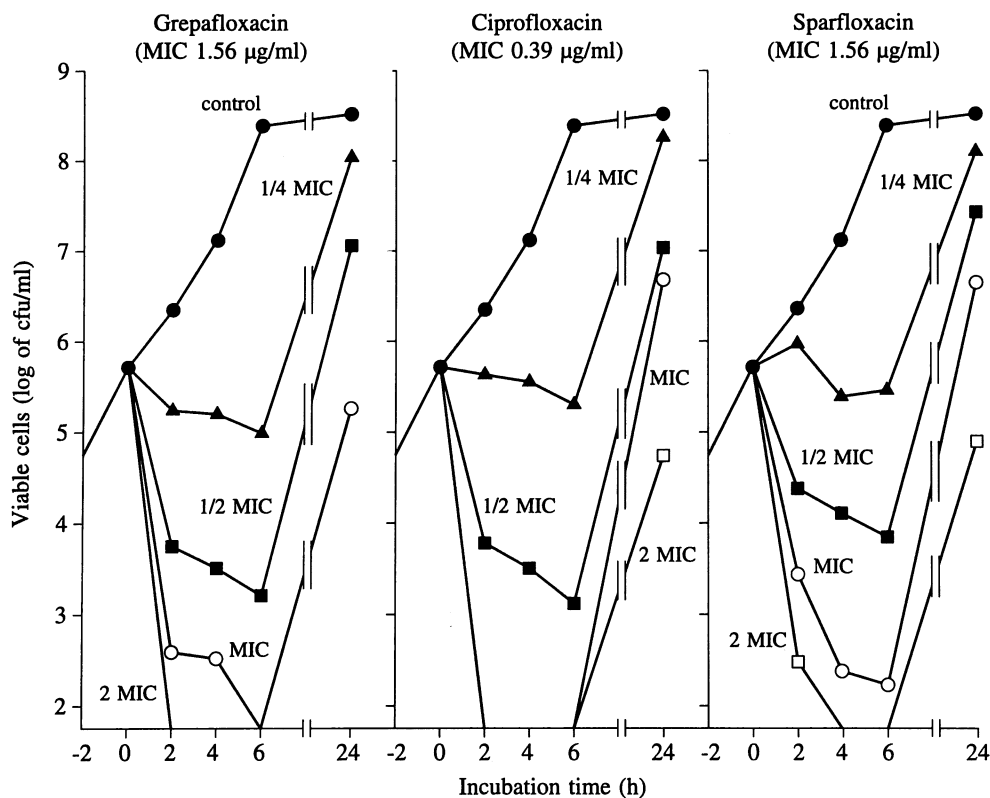


Fig. 3. Bactericidal activity of grepafloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* GN11189.

Table 3. Effect of Mg^{2+} on the *in vitro* activity

Organism	Drug	STB MIC (MBC)		3 mM Mg^{2+} MIC (MBC)		6 mM Mg^{2+} MIC (MBC)		9 mM Mg^{2+} MIC (MBC)	
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	grepafloxacin	0.05	(0.1)	0.2	(0.2)	0.2	(0.39)	0.39	(0.78)
	sparfloxacin	0.1	(0.1)	0.2	(0.39)	0.39	(0.39)	0.39	(0.78)
	ciprofloxacin	0.2	(0.39)	0.78	(1.56)	0.78	(1.56)	1.56	(1.56)
	ofloxacin	0.39	(0.78)	0.78	(0.78)	0.78	(1.56)	1.56	(1.56)
<i>S. epidermidis</i> IID866	grepafloxacin	0.05	(0.2)	0.2	(0.39)	0.2	(0.78)	0.39	(1.56)
	sparfloxacin	0.1	(0.2)	0.2	(0.39)	0.39	(0.78)	0.39	(0.78)
	ciprofloxacin	0.2	(0.78)	0.78	(1.56)	0.78	(1.56)	1.56	(1.56)
	ofloxacin	0.39	(0.78)	0.78	(1.56)	1.56	(1.56)	1.56	(3.13)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	grepafloxacin	0.0125	(0.025)	0.05	(0.05)	0.05	(0.1)	0.1	(0.2)
	sparfloxacin	0.0125	(0.025)	0.05	(0.1)	0.1	(0.2)	0.1	(0.2)
	ciprofloxacin	0.003	(0.003)	0.006	(0.006)	0.0125	(0.025)	0.025	(0.025)
	ofloxacin	0.05	(0.05)	0.1	(0.1)	0.2	(0.2)	0.39	(0.39)
<i>S. marcescens</i> IAM1184	grepafloxacin	0.78	(0.78)	1.56	(1.56)	1.56	(1.56)	1.56	(1.56)
	sparfloxacin	0.78	(0.78)	0.78	(0.78)	1.56	(1.56)	3.13	(3.13)
	ciprofloxacin	0.2	(0.2)	0.2	(0.2)	0.2	(0.2)	0.39	(0.39)
	ofloxacin	0.39	(0.39)	0.78	(0.78)	0.78	(0.78)	1.56	(1.56)
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	grepafloxacin	1.56	(3.13)	3.13	(6.25)	3.13	(6.25)	6.25	(12.5)
	sparfloxacin	1.56	(6.25)	3.13	(6.25)	3.13	(12.5)	6.25	(12.5)
	ciprofloxacin	0.78	(1.56)	1.56	(1.56)	1.56	(3.13)	3.13	(6.25)
	ofloxacin	3.13	(12.5)	6.25	(12.5)	12.5	(25)	12.5	(25)
<i>P. vulgaris</i> OX-19	grepafloxacin	0.1	(0.1)	0.78	(0.78)	0.78	(0.78)	0.78	(1.56)
	sparfloxacin	0.2	(0.2)	0.39	(0.39)	0.39	(0.78)	0.78	(0.78)
	ciprofloxacin	0.0125	(0.025)	0.05	(0.1)	0.1	(0.1)	0.1	(0.1)
	ofloxacin	0.05	(0.05)	0.2	(0.2)	0.2	(0.39)	0.39	(0.39)

Table 4. Effect of pH on the *in vitro* activity

Organism	Drug	pH 6 MIC (MBC)		pH 7 MIC (MBC)		pH 8 MIC (MBC)	
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	grepafloxacin	0.2	(0.39)	0.05	(0.1)	0.05	(0.1)
	sparfloxacin	0.2	(0.2)	0.1	(0.1)	0.05	(0.1)
	ciprofloxacin	0.39	(0.78)	0.2	(0.39)	0.1	(0.39)
	ofloxacin	0.39	(0.78)	0.39	(0.78)	0.39	(0.78)
<i>S. epidermidis</i> IID866	grepafloxacin	0.2	(0.39)	0.05	(0.2)	0.05	(0.2)
	sparfloxacin	0.2	(0.2)	0.1	(0.2)	0.1	(0.2)
	ciprofloxacin	0.39	(0.78)	0.2	(0.78)	0.2	(0.39)
	ofloxacin	0.39	(0.78)	0.39	(0.78)	0.39	(0.78)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	grepafloxacin	0.05	(0.05)	0.0125	(0.025)	0.006	(0.0125)
	sparfloxacin	0.025	(0.05)	0.0125	(0.025)	0.006	(0.0125)
	ciprofloxacin	0.025	(0.025)	0.003	(0.003)	0.0015	(0.0015)
	ofloxacin	0.2	(0.2)	0.05	(0.05)	0.0125	(0.025)
<i>S. marcescens</i> IAM1184	grepafloxacin	6.25	(6.25)	0.78	(0.78)	0.39	(0.39)
	sparfloxacin	3.13	(3.13)	0.78	(0.78)	0.39	(0.39)
	ciprofloxacin	0.78	(0.78)	0.2	(0.2)	0.05	(0.05)
	ofloxacin	1.56	(1.56)	0.39	(0.39)	0.39	(0.39)
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	grepafloxacin	3.13	(6.25)	1.56	(3.13)	0.78	(1.56)
	sparfloxacin	6.25	(12.5)	1.56	(6.25)	0.78	(1.56)
	ciprofloxacin	1.56	(3.13)	0.78	(1.56)	0.39	(0.78)
	ofloxacin	6.25	(6.25)	3.13	(12.5)	3.13	(3.13)
<i>P. vulgaris</i> OX-19	grepafloxacin	0.78	(1.56)	0.1	(0.1)	0.05	(0.05)
	sparfloxacin	0.39	(0.78)	0.2	(0.2)	0.1	(0.2)
	ciprofloxacin	0.05	(0.1)	0.0125	(0.025)	0.006	(0.0125)
	ofloxacin	0.2	(0.39)	0.05	(0.05)	0.05	(0.05)

Table 5. Effect of inoculum size on the MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Organism	Drug	Inoculum size		
		10^3	10^5	10^7
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	grepafloxacin	0.05	0.1	0.1
	sparfloxacin	0.1	0.1	0.1
	ciprofloxacin	0.1	0.39	0.39
	ofloxacin	0.39	0.39	0.78
<i>S. epidermidis</i> IID866	grepafloxacin	0.025	0.05	0.2
	sparfloxacin	0.05	0.05	0.2
	ciprofloxacin	0.1	0.2	0.78
	ofloxacin	0.2	0.2	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	grepafloxacin	0.0125	0.025	0.05
	sparfloxacin	0.0125	0.025	0.025
	ciprofloxacin	0.006	0.006	0.006
	ofloxacin	0.05	0.05	0.1
<i>S. marcescens</i> IAM1184	grepafloxacin	0.2	0.39	1.56
	sparfloxacin	0.39	0.78	3.13
	ciprofloxacin	0.05	0.05	0.2
	ofloxacin	0.2	0.39	1.56
<i>P. aeruginosa</i> IFO3445	grepafloxacin	0.39	1.56	3.13
	sparfloxacin	0.78	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.2	0.78	1.56
	ofloxacin	1.56	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	grepafloxacin	0.05	0.05	0.1
	sparfloxacin	0.05	0.1	0.2
	ciprofloxacin	0.006	0.0125	0.025
	ofloxacin	0.05	0.05	0.1

Table 6. Frequency of spontaneous mutants resistant to grepafloxacin and other quinolones

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Selected conc.	Mutation frequency
<i>S. aureus</i> Smith	grepafloxacin	0.05	2 MIC	3.37×10^{-7}
			4 MIC	$< 9.71 \times 10^{-9}$
	sparfloxacin	0.05	2 MIC	4.13×10^{-8}
			4 MIC	$< 9.71 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	0.1	2 MIC	7.60×10^{-7}
			4 MIC	$< 9.71 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	0.2	2 MIC	5.34×10^{-8}
			4 MIC	$< 9.71 \times 10^{-9}$
<i>E. coli</i> ML4707	grepafloxacin	0.025	2 MIC	$< 7.75 \times 10^{-9}$
	sparfloxacin	0.025	2 MIC	$< 7.75 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	0.0125	2 MIC	$< 7.75 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	0.05	2 MIC	$< 7.75 \times 10^{-9}$
<i>P. aeruginosa</i> GN11189	grepafloxacin	0.78	2 MIC	7.54×10^{-8}
			4 MIC	$< 8.62 \times 10^{-9}$
	sparfloxacin	0.78	2 MIC	2.29×10^{-6}
			4 MIC	9.70×10^{-8}
			8 MIC	$< 8.62 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	0.39	2 MIC	9.70×10^{-8}
			4 MIC	$< 8.62 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	1.56	2 MIC	3.79×10^{-7}
			4 MIC	5.82×10^{-8}
			8 MIC	$< 8.62 \times 10^{-9}$

Table 7. Inhibitory effects of grepafloxacin and other quinolones on the supercoiling activity of DNA gyrase from *Escherichia coli* KL-16

Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Grepafloxacin	0.025	0.19
Sparfloxacin	0.025	0.085
Ciprofloxacin	0.0125	0.11
Ofloxacin	0.05	0.48

であった。臨床分離株に対する抗菌力では、*E. faecium*を除くグラム陽性菌に対するMIC₉₀は0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、SPFXと同様に最も強い抗菌力を示した。一方グラム陰性菌では多くの菌種でCPFXが最も強い抗菌力を示したが、*X. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*および*B. fragilis*に対しては本剤はCPFXよりも強い抗菌力を示した。またMRSA, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*などの菌種のなかにキノロン薬に耐性を示す株が見られ、GPFXも同様にMIC値は高く、これら対照薬剤との間に交叉耐性を示すことが推察された。また高濃度のMgイオン、酸性側での培地pH、高接種菌量の影響を受けGPFXのMICはやや低下したが、この現象は従来のキノロン薬と同様の成績であった。このような高濃度のMgイオンの存在による抗菌力の低下は、薬剤の菌体内透過性の低下に起因するものと示唆されており⁸⁾、尿中での抗菌力などを考える場合、この金属イオンの影響を考慮する必要があると考えられる。自然耐性菌は*E. coli* ML4707では2MIC濃度でも出現しなかった。*S. aureus* Smithおよび*P. aeruginosa* GN11189では薬剤の種類により出現頻度に多少の差は見られるが、2MIC濃度で自然耐性菌の出現がみられた。SPFXおよびOFLXでは*P. aeruginosa*において4MICでも耐性菌の出現が見られた。臨床分離株においても*S. aureus*, *P. aeruginosa*では耐性菌の割合が高く、これらの菌種については今後更に詳細な検討が必要であると考えられる。

GPFXはCPFXと同程度の強いDNA gyrase阻害作用を示し、従来のキノロン系薬剤と同様の作用機序を持つものと思われる^{9,10)}。

この様に、GPFXは幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌作用を示し、グラム陽性菌に対しても強い抗菌力を示すことから、臨床的には呼吸器感染症をはじめとする種々の感染症に適応可能な薬剤であると考えられた。

文 献

- 1) OPC-17116, fluoroquinolone antibacterial; Drugs of the Future 17(4) 286~290, 1992
- 2) Kojima T, Inoue M and Mitsunashi S: *In vitro* activity of AT-4140 against clinical bacteria isolates. Antimicrob Agents Chemother 33: 1980~1988, 1989
- 3) Wise R, Andrews JM and Edwards LJ: *In vitro* activity of Bay o 9867, a new quinolone derivative, compared with those of other antibacterial agents. Antimicrob Agents Chemother 23: 559~564, 1983
- 4) Sato K, Matsuura Y, Inoue M, Une T, Osada Y, Ogawa H and Mitsunashi S: *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. Antimicrob Agents Chemomother 22: 548~553, 1982
- 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 29: 76~79, 1981
- 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) Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Inoue M and Mitsunashi S: Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone-resistant strain of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 30: 777~780, 1986
- 8) Valisena S, Palumbo M, Parolin C, Palu G and Meloni GA: Relevance of ionic effects on norfloxacin uptake by *Escherichia coli*. Biochem Pharm 40: 431~436, 1990
- 9) Gellert M, Mizuuchi K, O'dea MH, Itoh T and Tomizawa J: Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. Proc Natl Sci USA 74: 4772~4776, 1977
- 10) Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN and Cozzarelli NR: Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closin enzyme. Proc Natl Sci USA 74: 4767~4771, 1977

In vitro antibacterial activity of grepafloxacin

Hirokazu Wakebe and Susumu Mitsuhashi

Episome Institute

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

The *in vitro* antibacterial activity of grepafloxacin (GPFX), a new fluoroquinolone, was compared with that of sparfloxacin (SPFX), ciprofloxacin (CPFX) and ofloxacin (OFLX). The results are summarized as follows:

1) GPFX showed a broad spectrum of activity against gram-positive and gram-negative bacteria. The activity of GPFX against gram-positive bacteria was comparable to that of SPFX, and superior to that of CPFX and OFLX.

GPFX was less active than CPFX against most gram-negative bacteria but comparable to SPFX and OFLX.

2) GPFX showed bactericidal action at concentrations near the MIC against a variety of bacteria.

3) The activity of GPFX was decreased by several culture conditions such as acidic pH and a high concentration of magnesium ions.

4) The activity of GPFX was decreased when the inoculum size was increased.

5) The frequency of spontaneous mutants resistant to GPFX was low.

6) GPFX strongly inhibited the supercoiling activity of DNA gyrase of *Escherichia coli*.