Grepafloxacinの in vitro, in vivo 抗菌作用

大黒絹枝・分部浩和・東 敦・向井典江・今田拓磨・米田裕光・大西久子・蔵本美香・ 宮本 寿・大森和則・玉岡 寿・菊地幹雄 大塚製薬株式会社微生物研究所*

ニューキノロン薬grepafloxacin (GPFX) の in vitroおよび in vivo抗菌力について検討し、以下の結果を得た。

- 1. GPFXは好気性菌及び嫌気性菌に対し幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有していた。
- 2. 臨床分離菌株に対するGPFXの抗菌力は、グラム陽性菌では比較薬剤中最も強い抗菌力を示し、グラム陰性菌ではCPFXに次ぐ抗菌力であった。
- 3. GPFXは各種測定培地、培地のpH、接種菌量、血清添加および金属イオンの影響をほとんど受けなかったが、培地の酸性pHおよび高濃度の金属イオン存在下で、わずかに抗菌力の低下が認められた。
- 4. GPFXはMIC以上の濃度で用量依存的に殺菌作用を示し、MICとMBCの差は小さく、殺菌的に作用した。
 - 5. GPFXに対する自然耐性菌の出現頻度は低く、継代培養による耐性も獲得しにくかった。
- 6. GPFXはEscherichia coli由来のDNA gyraseにより、DNAから超螺旋型DNA生成する反応を強く阻害した。
- 7. GPFXのpost antibiotic effect (PAE) は Staphylococcus aureus FDA 209Pで2時間, E. coli NIHJ JC-2で1.6時間であり、CPFX同様に比較的長かった。
- 8. マウス実験的感染症に対するGPFXの治療効果は、グラム陽性菌では比較薬剤のなかで最も強く、グラム陰性菌ではCPFXと同等もしくは優れた効果を示した。

以上のin vitroおよびin vivo抗菌作用の検討成績より、GPFXは呼吸器感染症をはじめ各種細菌感染症に対して、有用な薬剤であることが示唆された。

Key words: grepafloxacin (GPFX), in vitro, in vivo, 抗菌力, DNA gyrase

Grepafloxacin $[(\pm)$ -1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-5-methyl-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinoline carboxilic acid monohydrochloride] は大塚製薬株式会社で合成された新キノロン系合成抗菌薬である。その構造上の特徴はキノリン環の5位にメチル基を導入したことである。この5-メチル基の導入により既存の新キノロン剤の抗菌活性が必ずしも十分でない連鎖球菌をはじめとするグラム陽性菌、マイコプラズマおよびクラミジアに対する抗菌活性が改良された $^{1-3}$)。本報告ではgrepafloxacin (GPFX) の in vitro及 $^{1-3}$ in vivo抗菌作用をnorfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), enoxacin (ENX)およびciprofloxacin (CPFX) と比較検討したので、その成績について報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

GPFX (Lot No. 8K83) は大塚製薬(㈱で合成したものを, NFLX(杏林製薬), OFLX(第一製薬), ENX(大日本

製薬)およびCPFX (バイエル薬品)は市販の製剤より抽出・精製した何れも力価の明らかな原末を使用した。

2. 使用菌株

当社微生物研究所保存の標準的菌株であるグラム陽性菌 12株, グラム陰性菌 29株, 嫌気性菌 20株及び臨床材料から分離されたMethicillin-sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) 100株, Methicillin-resistant S. aureus (MRSA) 206株, Staphylococcus epidermidis 75株, Streptococcus pyogenes 60株, Streptococcus pneumoniae 59株, Enterococcus faecalis 100株, Escherichia coli 100株, Citrobacter freundii 100株, Citrobacter diversus 50株, Klebsiella pneumoniae 100株, Klebsiella oxytoca 100株, Enterobacter cloacae 100株, Enterobacter aerogenes 100株, Serratia marcescens 100株, Proteus vulgaris 98株, Proteus mirabilis 100株, Providencia rettgeri 50株, Morganella morganii 100株, Haemophilus influenzae 100株, Pseudomonas aeruginosa 100株, Pseudomonas putida 34株,

Moraxella (Branhamella) catarrhalis 40株, Bacteroides fragilis 22株, を用いた。

3. 使用動物

SLCより供給されたICR系雄マウス(4週齢)を用い, 1 群10匹にて試験を行った。

4. 感受性測定および使用培地

日本化学療法学会標準法"及び日本化学療法学会嫌気性菌MIC測定法"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主として Mueller-Hinton agar (MHA, Difco)を使用した。なお、Streptococcus属は 10% 羊脱繊維血液添加 brain-heart infusion agar (BHIA, Difco)を, Haemophilus influenzaeでは 5% Fildes enrichment添加 BHIAを使用した。Neisseria属は 10% 羊脱繊維血液添加チョコレート trypticase soy agar (TSA)を使用した。嫌気性菌は GAM agar (日水製薬) およびGAM broth (日水製薬)を使用した。また菌の接種はミクロプランター(佐久間製作所)を用い、好気性菌は37℃、18時間培養後、Neisseria属はローソク培養下、37℃、72時間培養後、嫌気性菌は嫌気性培養装置(フォーマ社)内で37℃、72時間培養後にそれぞれ MICを判定した。

5. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

培地の種類の検討では、MHA、heart infusion agar (HIA)、nutrient agar (NA)、BHIA、TSAの5種類の培地を用い、他の試験ではMHAを用いた。pHの影響では培地のpHをpH 6, 7, 8, 9に調整し、接種菌量の影響は接種菌量を 10^4 ~ 10^8 cfu/mlに調整した。接種菌量の検討以外の試験では 10^6 cfu/mlを用いた。また血清添加 (0, 10, 20, 50%馬血清;日本バイオテスト研) および金属イオン (0.1, 1.0, 5.0, 10mMのCaCl₂及びMgCl₂)添加等の諸因子の抗菌力におよぼす影響を検討した。

6. 殺菌作用

1) 増殖曲線におよぼす薬剤の影響

Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) で37℃, 18時間培養した菌液を新鮮培地にて約10℃fu/mlに調製し, 37℃の振盪培養器にて1時間振盪培養した。1/2 MIC, 1 MIC, 2 MICおよび 4 MICとなるように薬剤を添加し, 1, 2, 4, 8時間後に混釈法にて生菌数を測定した。

2) 最小殺菌濃度(MBC)の測定

MHBを用いた微量液体希釈法によりMICを測定した。 次に菌の増殖の認められないMIC以上の培養液 5μ lを新鮮MHB5mlに接種し、37°、18時間培養後、菌の生育の認められない最小の薬剤濃度を MBCとした。

7. 自然耐性変異菌の出現頻度

Nutrient broth (NB, 栄研化学)で37℃, 一夜培養した 試験菌を 10MICの薬剤を含む NAに接種し、37℃, 18 時間培養後に生育した菌を自然耐性菌とした。また薬剤 を含まない同培地に生育する菌数との比で出現頻度を求 めた。

8. In vitro耐性獲得試験

MHBで37℃,一夜培養した試験菌を10°cfu/mlに調製し、薬剤含有MHAに接種しMICを求めた。1/2 MIC濃度の培地上に増殖した菌を用い、再度MICを求めた。この操作を20代繰り返し耐性獲得を検討した。20代継代後に各薬剤に対する交差耐性を、更に薬剤不含 MHAで10代継代し、耐性脱落を検討した。

9. DNA gyraseに対する阻害作用

DNA gyraseは Escherichia coli K·12株よりSato®らの方法にて精製した。DNA gyraseのスーパーコイリング活性は、Topoisomerase I (BRL)により弛緩させたpBR322 plasmid DNA (宝酒造(株)を基質として37℃、50分間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、超螺旋型DNAをデンシトメーター(LKB社)により定量した。薬剤の阻害作用はDNA gyraseのスーパーコイリング活性を50%阻害する濃度(IC50)で比較した。

10. PAEの測定

Fuurstedの方法"に準じて、S. aureus FDA 209PおよびE. coli NIHJ JC-2に対する各薬剤の PAEを測定した。PAEは薬剤と菌を1時間接触後、薬剤を遠心分離により洗浄除去した菌が $1\log_{10}$ 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)との差として表した[PAE(時間): =T-C]。

11. マウス全身感染症治療効果

S. aureus Smith, S. aureus C196(メチシリン耐性株), S. pneumoniae type III, E. faecalis C63, E. coli No. 29, K. pneumoniae NCTC9632, P. mirabilis No. 42, Salmonella typhimurium 5, Serratia marcescens IFO 12648, H. influenzae C8, P. aeruginosa E-2, P. aeruginosa ATCC 10145, M. (B.) catarrhalis C6の13株を用い検討した。S. pneumoniae, E. faecalis, H. influenzae以外の菌ではNBにて一夜培 養した菌を用いた。S. pneumoniaeでは5%馬血清を,H. influenzaeでは5%Fildes enrichment(Difco)を添加した brain-heart infusion broth (BHIB, Difco) にて前培養され た菌を用い, E. faecalisではBHIBにて37℃18時間前培養 した菌を用いた。各菌液は所定の菌量に調整し、そのま ま又はムチン(Difco)と等量混合させ、感染菌液とした。 マウスの腹腔内に0.5mlの感染菌液を投与し、感染1時 間後に薬剤を1回経口投与した。但し, E. faecalis感染症 の場合は感染直後に薬剤を投与した。感染7日後の生存 率からProbit法を用い、ED50値及び95%信頼限界値を求 めた。

Ⅱ. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

好気性菌および通性嫌気性菌の各種標準株に対する GPFXの抗菌力をNFLX, OFLX, ENXおよびCPFXと比較 した成績をTable 1に示した。GPFXは対照薬剤と同様に グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して広域抗菌スペクトラムを示した。GPFXはS. pneumoniaeをはじめとするグラム陽性菌に対し最も優れた抗菌力を示した。グラム陰性菌に対する抗菌力は大半の菌種においてCPFXと同等か若干弱い抗菌力であった。しかしH. influenzaeおよびPseudomonas属を除くブドウ糖非醱酵菌に対してはCPFXよりも優れ、最も強い抗菌力であった。

偏性嫌気性菌の各種標準株に対する抗菌力をTable 2 に示した。GPFXはグラム陽性菌に対して他の対照薬剤より強く、最も優れた抗菌力を示した。グラム陰性菌では OFLXとほぼ同等の抗菌力を示した。

2. 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GPFXの 抗菌力をNFLX, OFLX, ENXおよびCPFXと比較した成 績をTable 3に示した。

S.~aureus (MSSA) 100株に対するGPFXの抗菌力はMIC $_{80}$ 値が $0.10\mu g/ml$ であり、対照薬に比較し $8\sim32$ 倍強い抗菌力を示した。

メチシリン耐性 S. aureus (MRSA) 206 株に対して GPFXは12.5 μ g/mlで全ての菌株の発育を阻止し、その MIC80値は0.20 μ g/mlであり、対照薬に比較し8倍以上の強い抗菌力を示した。 S. epidermidis 75 株に対する

Table 1. Antibacterial spectrum of grepafloxacin, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin and ciprofloxacin against aerobic bacteria

Organism		MIC	(μg/ml) (10 ⁶ cfu/	ml)	
Organism	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
S. aureus FDA 209P	0.025	0.78	0.2	0.78	0.2
S. aureus Newman	0.05	0.78	0.39	0.78	0.39
S. aureus Smith	0.025	0.39	0.2	0.78	0.2
S. aureus Terajima	0.05	0.78	0.39	0.78	0.2
S. epidermidis ATCC 12228	0.012	0.2	0.1	0.39	0.1
S. pyogenes IID Cook*	0.2	3.13	1.56	6.25	0.78
S. pyogenes IID S-23*	0.39	3.13	1.56	12.5	0.78
S. pneumoniae type I*	0.39	6.25	1.56	12.5	1.56
S. pneumoniae type II*	0.2	3.13	1.56	12.5	0.78
S. pneumoniae type III*	0.2	6.25	1.56	12.5	1.56
E. faecalis IFO 12580	0.2	1.56	1.56	3.13	0.39
B. subtilis ATCC 6633	0.012	0.2	0.1	0.2	0.05
E. coli NIHJ JC-2	0.012	0.2	0.1	0.2	0.025
E. coli No. 29	0.012	0.05	0.05	0.1	0.012
S. flexneri Komagome	0.2	1.56	0.39	1.56	0.39
S. sonnei EW-33	0.05	0.1	0.1	0.2	0.025
S. typhi NCTC 8393	≤0.006	0.025	0.012	0.1	≤0.006
S. paratyphi A	0.025	0.05	0.05	0.1	≦0.006 ≦0.006
S. typhimurium kh	0.05	0.1	0.1	0.2	0.012
S. enteritidis IFO 3313	0.012	0.05	0.05	0.1	≤0.006
C. freundii IFO 12681	≤0.006	0.025	0.012	0.05	≡ 0.000 ≤ 0.006
K. pneumoniae NCTC 9632	0.012	0.05	0.05	0.2	0.012
E. cloacae ATCC 13047	0.1	0.1	0.1	0.2	0.025
E. aerogenes IFO 12979	0.05	0.05	0.05	0.2	0.012
S. marcescens IFO 12648	0.2	0.1	0.2	0.2	0.05
P. vulgaris NCTC 8313	0.1	0.1	0.05	0.2	0.025
P. mirabilis 1287	0.2	0.1	0.00	0.2	0.025
P. stuartii IFO 12930	0.39	0.1	0.39	0.39	0.05
P. rettgeri NIH 96	0.025	0.05	0.05	0.39	≤0.006
M. morganii IID Kono	0.1	0.1	0.03	0.1	0.025
Y. enterocolitica O-3	0.025	0.1	0.1	0.1	0.025
H. influenzae C-1**	≤0.006	0.1	0.025	0.1	0.025
P. aeruginosa NCTC 10490	0.39	0.39	0.78	0.78	0.023
P. aeruginosa ATCC 10145	0.39	0.78	1.56	1.56	0.39
P. aeruginosa E-2	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39
P. putida IFO 12996	0.78	0.78	1.56	0.78	0.39
X. maltophilia IFO 12020	0.39	12.5	1.56	6.25	1.56
N. gonorrhoeae C-1	≤0.006	0.025	≤0.006	0.05	
N. meningitidis IID855	≦0.000 ≦0.006	0.025	≦0.006 ≦0.006	0.05	≦0.006 ≤0.006
A. calcoaceticus Ac-54	0.05	3.13	≥0.000 0.39	1.56	≦0.006
F. meningosepticum IFO 12535	0.03	12.5	1.56	6.25	0.39
1. moningosepiicum 11 O 12000	V.Z	12.0	1.00	0.20	1.56

^{*} BHIA supplemeated with 5% sheep blood

^{**} BHIA supplemented with 5% Fildes enrichment

GPFXの抗菌力は0.20μg/mlで全ての菌株の発育を阻止し、対照薬に比較し最も強い抗菌力を示した。

S. pyogenes 60株に対するGPFXの MIC_{80} 値は $0.39\mu g/ml$ であり、対照薬に比較し $2\sim16$ 倍強い抗菌力を示した。

S. pneumoniae 59株に対し、 MIC_{80} 値で比較すると GPFXは対照薬剤より $16\sim128$ 倍優れた抗菌力を示した。NFLXおよびENXでは MICが $100\mu g/ml$ 以上の菌株が認められたが、GPFXは全株の発育を $1.56\mu g/ml$ で阻止し、優れた抗菌力が確認された。

E. faecalis 100株に対し GPFXの抗菌力は $0.78\mu g/ml$ で全ての菌株の発育を阻止した。その MIC80値は $0.78\mu g/ml$ であり、対照薬に比較し最も強い抗菌力を示した。 E. coli 100株, C. diversus 50株, K. pneumoniae 100株, E. aerogenes 100株に対するGPFXの MIC分布は ≤ 0.006 $\sim 0.39 \mu g/ml$ にあり、NFLX、ENX、OFLXより優れ、CPFXとほぼ同等の強い抗菌力を示した。K. oxytoca 100株, E. cloacae 100株, S. marcescens 100株, P. aeruginosa 100株, および P. putida 34株に対するGPFXのMIC80値はそれぞれ0.10, 0.10, 6.25, 0.78および $3.13 \mu g/ml$ で、CPFXよりは劣るものの、NFLX、ENXおよびOFLXよりは優れた抗菌力を示した。

C. freundii 100株, P. vulgaris 98株, P. mirabilis 100株, P. rettgeri 50株およびM. morganii 100株に対するGPFXの MIC₈₀値はそれぞれ0.78, 0.39, 0.39, 0.39および0.39 μ g/mlで, ENXとほぼ同等の抗菌力を示した。

H. influenzae 100株, Xanthomonas maltophilia 78株,

 $A cine to bacter\ cal coaceticus\ 36 株および M. (B.)\ catarrhalis 40 株に対する GPFXの MIC <math>_{80}$ 値はそれぞれ $_{0.0125}$ は $_{1.56}$ の $_{0.0125}$ および $_{0.025}$ $_{\mu g}$ / ml で ,対照薬剤と比較して最も優れた抗菌力を示した。

B. fragilis 22株に対するGPFXの MIC₈₀値は1.56 μ g/ml で対照薬より2~32倍優れた抗菌力を示した。

3. 抗菌力におよほす諸因子の影響

GPFXの抗菌力に及ぼす培地の種類、培地のpH、接種菌量および血清添加の影響を標準株を用いて検討した(Table 4~7)。GPFXの抗菌力は培地の種類、接種菌量および血清添加により大きな影響は認められなかった。また、培地のpHの変化により酸性側でわずかに抗菌力の低下が認められたが、その程度は対照薬剤と同程度であり大きな変化ではなかった。

金属イオン (Mg^2+,Ca^2+) 添加が抗菌力におよぼす影響を検討した結果 $(Table\ 8,9)$, 高濃度の Ca^2+ の存在下で全ての薬剤で僅かに抗菌力の低下が認められた。また,高濃度の Mg^2+ の存在下では全ての薬剤で $1/2\sim1/8$ 程度の抗菌力の低下が認められた。この低下はグラム陽性菌の方がグラム陰性菌よりも影響を受けやすい傾向が認められた。

4. 殺菌作用

1) 増殖曲線におよぼす薬剤の影響

対数増殖期のS. aureusおよびE. coliに各薬剤を種々の 濃度で作用させ、生菌数の変化を経時的に検討した。 GPFXは対照薬剤と同様に、S. aureusおよびE. coliに対し MIC以上の濃度で用量依存的に殺菌作用を示した(Fig.

Table 2. Antibacterial spectrum of grepafloxacin, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin and ciprofloxacin against an aerobic bacteria

Organiam		MIC	$(\mu g/ml)$ (10 ⁶ cfu/	ml)	
Organism	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
S. intermedius GAI 1157	0.39	6.25	3.13	25	1.56
P. anaerobius ATCC 27337	0.78	3.13	0.78	12.5	0.78
P. asaccharolyticus ATCC 14963	0.2	6.25	6.25	25	1.56
P. magnus ATCC 29328	0.05	0.78	0.2	3.13	0.1
P. prevotii ATCC 9321	0.39	6.25	12.5	12.5	1.56
C. boturinum A	0.1	0.39	0.2	0.78	0.1
C. difficile ATCC 17859	12.5	100	12.5	50	25
C. perfringens ATCC 13123	0.2	1.56	0.78	1.56	0.39
C. tetani OT-1	0.05	0.39	0.39	0.78	0.2
P. acnes ATCC 6919	0.78	3.13	0.78	12.5	0.78
P. granulosum ATCC 25564	0.05	0.78	0.1	1.56	0.1
E. limosum ATCC 8486	0.78	12.5	6.25	25	3.13
Bacteroides fragilis GM 7000	1.56	50	3.13	25	6.25
Bacteroides fragilis ATCC 25285	1.56	50	1.56	25	6.25
B. distasonis Ju-II-1	12.5	>100	25	50	25
B. thetaiotaomicron WAL 3304	6.25	>100	25	50	25
B. melaninogenicus GAI 5596	3.13	12.5	1.56	12.5	3.13
P. nucleatum ATCC 25568	3.13	50	1.56	50	6.25
V. parvula ATCC 10790	0.2	1.56	0.78	3.13	0.2
C. gingivalis ATCC 33624	0.1	0.78	0.1	0.78	0.1

Table 3-1. Antibacterial activity of grepafloxacin, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin and ciprofloxacin against clinical isolates

Organism (No.)	Druge	MIC (μg/ml)				
Organism (No.)	Drugs	range	MIC ₅₀	MIC ₈₀		
Methicillin-sensitive	grepafloxacin	0.025~0.39	0.10	0.10		
S. aureus (100)	norfloxacin	$0.39 \sim 12.5$	1.56	3.13		
	ofloxacin	$0.2 \sim 1.56$	0.39	0.78		
	enoxacin	$0.39 \sim 6.25$	1.56	1.56		
	ciprofloxacin	0.2~3.13	0.78	0.78		
Methicillin-resistant	grepafloxacin	$0.012 \sim 12.5$	0.10	0.20		
S. aureus (206)	norfloxacin	$0.78 \sim > 100$	25	50 1.56		
	ofloxacin	$0.2 \sim 50$	1.56	1.56 25		
	enoxacin	$0.78 \sim 100$	25 6.25	6.25		
	ciprofloxacin DMPPC	$0.2 \sim > 100$ $12.5 \sim > 100$	>100	>100		
0 (75)			0.10	0.20		
S. epidermidis (75)	grepafloxacin norfloxacin	$0.025 \sim 0.2$ $0.39 \sim 12.5$	0.78	1.56		
	ofloxacin	$0.39 \sim 12.5$ $0.2 \sim 1.56$	0.36	0.39		
	enoxacin	$0.39 \sim 12.5$	0.78	0.78		
	ciprofloxacin	0.1~3.13	0.39	0.39		
S. pyogenes (60)*	grepafloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.39		
3. pyogenes (00)	norfloxacin	$0.78 \sim 12.5$	1.56	3.13		
	ofloxacin	$0.79 \sim 12.3$ $0.39 \sim 3.13$	1.56	1.56		
	enoxacin	1.56~25	6.25	6.25		
	ciprofloxacin	$0.2 \sim 3.13$	0.78	0.78		
S. pneumoniae (59)*	grepafloxacin	0.1~1.56	0.39	0.39		
	norfloxacin	3.13~>100	25	50		
	ofloxacin	$1.56 \sim 6.25$	3.13	6.25		
	enoxacin	$6.25 \sim 100$	25	25		
	ciprofloxacin	$0.78 \sim 12.5$	3.13	6.25		
E. faecalis (100)	grepafloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78		
	norfloxacin	$0.78 \sim 12.5$	6.25	6.25		
	ofloxacin	$0.78 \sim 6.25$	3.13	3.13		
	enoxacin	3.13~25	6.25	12.5		
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56		
E. coli (100)	grepafloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.39$	0.025	0.05		
	norfloxacin	$0.025 \sim 0.78$	0.10	0.10		
	ofloxacin	$0.012 \sim 0.78$	0.10	0.10		
	enoxacin ciprofloxacin	$0.1 \sim 1.56$ $\leq 0.006 \sim 0.2$	0.20 0.025	0.20 0.025		
0 (111 (100)	<u>-</u>					
C. freundii (100)	grepafloxacin	$\leq 0.006 \sim 6.25$	0.10	0.78 0.39		
	norfloxacin ofloxacin	$0.05 \sim 6.25$ $0.025 \sim 6.25$	0.20 0.20	0.78		
	enoxacin	0.025 - 0.25 $0.1 - 12.5$	0.39	0.78		
	ciprofloxacin	≤0.006~1.56	0.025	0.20		
C. diversus (50)	grepafloxacin	≦0.006 ~ 0.1	0.025	0.05		
S. aiversus (50)	norfloxacin	$0.05 \sim 0.78$	0.10	0.03		
	ofloxacin	$0.05 \sim 0.78$ $0.05 \sim 0.39$	0.10	0.10		
	enoxacin	0.1~0.78	0.20	0.20		
	ciprofloxacin	≤0.006~0.1	0.012	0.025		
K. pneumoniae (100)	grepafloxacin	≦0.006 ~ 0.39	0.05	0.10		
	norfloxacin	$0.025 \sim 0.78$	0.20	0.20		
	ofloxacin	$0.025 \sim 0.78$	0.20	0.20		
	enoxacin	$0.05 \sim 1.56$	0.20	0.39		
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.39$	0.05	0.05		
K. oxytoca (100)	grepafloxacin	0.012~0.78	0.10	0.10		
* * *	norfloxacin	$0.05 \sim 1.56$	0.10	0.20		
	ofloxacin	$0.05 \sim 1.56$	0.10	0.20		
	enoxacin	0.2 ~ 3.13	0.20	0.39		
	ciprofloxacin	≦0.006 ~ 0.39	0.025	0.05		
E. cloacae (100)	grepafloxacin	$0.025 \sim 0.78$	0.10	0.10		
	norfloxacin	$0.05 \sim 0.39$	0.10	0.20		
	ofloxacin	$0.05 \sim 0.78$	0.10	0.20		
	enoxacin	0.1~0.78	0.20	0.20		
	ciprofloxacin	≦0.006 ~ 0.2	0.025	0.05		
E. aerogenes (100)	grepafloxacin	$0.012 \sim 0.39$	0.10	0.10		
	norfloxacin	$0.05 \sim 1.56$	0.20	0.20		
	ofloxacin	$0.1 \sim 0.78$	0.20 0.20	0.20		
	enoxacin	$0.1 \sim 3.13$	0.20	0.39		
	ciprofloxacin	$0.012 \sim 0.39$	0.03	0.05		

^{*} BHIA supplemented with 5% sheep blood Inoculum size: 106 cfu/ml

Table 3-2. Antibacterial activity of grepafloxacin, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin and ciprofloxacin against clinical isolates

Organism (No.)	Drugs	MIC (μg/ml)				
Organism (170.)	Diugo	range	MIC ₅₀	MIC_{80}		
S. marcescens (100)	grepafloxacin	0.05 ~ 50	0.78	6.25		
	norfloxacin	0.1 - 100	3.13	12.5		
	ofloxacin	$0.05 \sim 100$	1.56	6.25		
	enoxacin	$0.1 \sim 100$	6.25	12.5		
	ciprofloxacin	0.025 ~ 25	0.78	3.13		
P. vulgaris (98)	grepafloxacin	$0.1 \sim 3.13$	0.20	0.39		
	norfloxacin	$0.1 \sim 0.39$	0.10	0.20		
	ofloxacin	$0.05 \sim 1.56$	0.10	0.20		
	enoxacin ciprofloxacin	$0.2 \sim 1.56$ $0.012 \sim 0.39$	0.39 0.05	0.39 0.05		
D		· ·				
P. mirabilis (100)	grepafloxacin norfloxacin	$0.05 \sim 0.78$ $0.05 \sim 0.39$	0.39 0.10	$0.39 \\ 0.10$		
	ofloxacin	$0.03 \sim 0.39$ $0.1 \sim 0.39$	0.20	0.20		
	enoxacin	$0.1 \sim 0.39$ $0.2 \sim 0.78$	0.39	0.39		
	ciprofloxacin	$0.012 \sim 0.2$	0.05	0.10		
P. rettgeri (50)	grepafloxacin	0.1 ~ 25	0.20	0.39		
. Tellgett (50)	norfloxacin	$0.1 \sim 25$ $0.05 \sim 50$	0.20	0.39		
	ofloxacin	$0.03 \sim 30$ $0.2 \sim 25$	0.39	0.78		
	enoxacin	$0.2 \sim 23$ $0.2 \sim 100$	0.39	0.78		
	ciprofloxacin	$0.012 \sim 25$	0.05	0.20		
M. morganii (100)	grepafloxacin	0.025~0.78	0.20	0.39		
3	norfloxacin	$0.05 \sim 0.78$	0.10	0.10		
	ofloxacin	$0.1 \sim 1.56$	0.10	0.20		
	enoxacin	$0.1 \sim 1.56$	0.20	0.39		
	ciprofloxacin	$0.012 \sim 0.39$	0.025	0.05		
H. influenzae (100)**	grepafloxacin	≦0.006~0.025	≦0.006	0.0125		
	norfloxacin	$0.05 \sim 0.1$	0.10	0.10		
	ofloxacin	$0.025 \sim 0.1$	0.05	0.05		
	enoxacin	$0.1 \sim 0.39$	0.20	0.20		
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.025$	0.0125	0.025		
P. aeruginosa (100)	grepafloxacin	$0.2 \sim 6.25$	0.78	0.78		
	norfloxacin	$0.39 \sim 12.5$	0.78	1.56		
	ofloxacin	$0.39 \sim 25$	1.56	3.13		
	enoxacin	$0.39 \sim 12.5$	1.56	1.56		
	ciprofloxacin	0.1 ~ 3.13	0.39	0.39		
P. putida (34)	grepafloxacin	0.1 ~ 50	1.56	3.13		
	norfloxacin	$0.2 \sim > 100$	3.13	6.25		
	ofloxacin enoxacin	$0.78 \sim 100$ $0.39 \sim > 100$	6.25 3.13	$12.5 \\ 12.5$		
	ciprofloxacin	$0.05 \sim 100$	0.78	1.56		
X. maltophilia (78)	grepafloxacin	0.1~6.25	0.78	1.56		
a. manophina (10)	norfloxacin	$6.25 \sim 100$	25	25		
	ofloxacin	0.78~25	3.13	6.25		
	enoxacin	1.56~25	6.25	12.5		
	ciprofloxacin	$0.78 \sim 25$	6.25	6.25		
1. calcoaceticus (36)	grepafloxacin	≦0.006 ~ 0.1	≦0.006	0.0125		
, ,	norfloxacin	$0.1 \sim 12.5$	1.56	3.13		
	ofloxacin	$0.025 \sim 1.56$	0.20	0.39		
	enoxacin	$0.2 \sim 12.5$	0.78	1.56		
	ciprofloxacin	≦0.006~1.56	0.20	0.20		
1. (B.) catarrhalis (40)*	grepafloxacin	≦0.006 ~ 0.025	0.0125	0.025		
	norfloxacin	$0.2 \sim 0.78$	0.39	0.39		
	ofloxacin	$0.05 \sim 0.2$	0.10	0.10		
	enoxacin	$0.2 \sim 0.78$	0.39	0.39		
	ciprofloxacin	0.05~0.2	0.10	0.20		
3. fragilis (22)***	grepafloxacin	1.56~3.13	1.56	1.56		
	norfloxacin	50	50	50		
	ofloxacin	$1.56 \sim 3.13$	3.13	3.13		
	enoxacin	25~50	25 12.5	25		
	ciprofloxacin	$6.25 \sim 12.5$		12.5		

^{*} BHIA supplemented with 5% sheep blood ** BHIA supplemented with 5% Fildes enrichment *** GAM agar Inoculum size: 10⁶ cfu/ml

1, 2)。GPFXおよび対照薬剤のS. aureusに対する殺菌作用はE. coliに比較し、弱い傾向が見られ、ENX、CPFXでは薬剤添加8時間後においても4MICで生菌が検出された。一方E. coliでは2MIC以上の濃度で薬剤添加4時間以内に生菌は検出されなくなった。

S. aureus, E. faecalis, E. coliおよび P. aeruginosaの臨床分離株各50株に対するMIC₈₀および MBC₈₀の成績を(Table 10)に示した。GPFXはMICと MBCの差が小さく

臨床分離株においても強い殺菌作用が認められた。

5. 自然耐性変異菌の出現頻度

GPFX は対照薬剤と同様に、試験した S. aureus, E. faecalis, E. coliおよび P. aeruginosaに対し、自然耐性菌の出現頻度が低いことが確認された(Table 11)。

6. In vitro耐性獲得試験

S. aureus, E. faecalis, E. coliおよびP. aeruginosaを各薬 剤含有培地にて継代培養し,薬剤感受性の変化を検討し

Table 4. Effect of medium on antibacterial activity of grepafloxacin and other drugs

0	34 1			MIC (μg/ml)		
Organism	Medium	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
	MHA	0.025	0.39	0.2	0.39	0.2
	HIA	0.1	0.78	0.39	0.78	0.39
S. aureus FDA 209P	NA	0.025	0.39	0.2	0.39	0.2
	TSA	0.05	0.78	0.2	0.78	0.39
	BHIA	0.05	0.78	0.2	0.78	0.39
	MHA	0.2	1.56	1.56	3.13	0.78
	HIA	0.39	3.13	1.56	6.25	0.78
E. faecalis IFO 12580	NA	0.2	1.56	1.56	3.13	0.78
•	TSA	0.2	3.13	1.56	6.25	0.78
	BHIA	0.39	3.13	1.56	6.25	0.78
	MHA	0.025	0.1	0.1	0.2	0.025
	HIA	0.05	0.2	0.1	0.39	0.05
E. coli NIHJ JC-2	NA	0.025	0.2	0.1	0.39	0.05
	TSA	0.012	0.2	0.1	0.2	0.025
	BHIA	0.05	0.2	0.1	0.2	0.05
	MHA	0.39	0.78	1.56	1.56	0.2
P. aeruginosa ATCC 10145	HIA	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39
	NA	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39
_	TSA	0.39	0.78	0.78	0.78	0.2
	BHIA	0.39	0.78	1.56	0.78	0.39

MHA: Mueller-Hinton agar HIA: Heart infusion agar NA: Nutrient agar TSA: Trypticase soy agar

BHIA: Brain-heart infusion agar

Table 5. Effect of medium pH on antibacterial activity of grepafloxacin and other drugs

Organiam	-u			MIC (μg/ml)		
Organism	pН	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
S. aureus FDA 209P	6	0.05	0.78	0.2	0.78	0.2
	7	0.025	0.78	0.2	0.39	0.2
	8	0.025	0.78	0.2	0.39	0.2
	9	0.025	0.78	0.39	0.39	0.2
E. faecalis IFO 12580	6	0.78	6.25	3.13	12.5	1.56
	7	0.2	3.13	1.56	6.25	0.78
	8	0.2	1.56	1.56	6.25	0.78
	9	0.2	1.56	3.13	6.25	0.78
E. coli NIHJ JC-2	6	0.1	0.78	0.39	0.78	0.1
	7	0.012	0.2	0.1	0.2	0.025
	8	0.012	0.1	0.1	0.2	0.025
	9	≤0.006	0.1	0.2	0.1	0.012
P. aeruginosa ATCC 10145	6	0.78	3.13	3.13	1.56	0.39
	7	0.39	0.78	1.56	0.78	0.2
	8	0.39	0.78	1.56	1.56	0.2
	9	0.39	0.78	3.13	1.56	0.39

Medium: Mueller-Hinton agar

た成績を Table 12に示した。GPFXは薬剤含有培地で継代培養しても薬剤感受性の低下は小さく、対照薬剤同様耐性を獲得しにくい薬剤であることが確認された。また、20代継代後薬剤を含まない培地で薬剤感受性の復帰を検討したが、感受性は復帰しなかった。各薬剤で20代継代後の菌株を用い、GPFXおよび対照薬剤に対する感受性を検討した結果、GPFXと比較薬剤間に交差耐性が

あることが推察された(Table 12, 13)。

7. DNA gyraseに対する阻害作用

E.~coli~K-12株の DNA gyraseにより、 弛緩型 DNAから超螺旋型 DNAを生成する反応をGPFXが阻害する濃度 (IC_{50}) は $0.090\mu g/ml$ であり、対照薬剤であるNFLX、OFLX、CPFXよりそれぞれ7.8, 5.9, および2.2倍強い阻害作用を示した(Table~14)。

Table 6. Effect of inoculum size on antibacterial activity of grepafloxacin and other drugs

Organism	Inoculum size]	MIC (μg/ml)		
Organism	moculum size	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
	1.6×10^{8}	0.05	0.78	0.39	0.78	0.39
	1.6×10^7	0.025	0.78	0.2	0.78	0.39
S. aureus FDA 209P	1.6×10^6	0.025	0.78	0.2	0.78	0.2
	1.6×10^5	0.025	0.78	0.2	0.39	0.2
	1.6×10^4	0.012	0.39	0.2	0.39	0.2
	2.6×10^{8}	0.39	3.13	3.13	6.25	0.78
	2.6×10^7	0.39	3.13	1.56	6.25	0.78
E. faecalis IFO 12580	2.6×10^6	0.2	3.13	1.56	6.25	0.78
	2.6×10^{5}	0.2	3.13	1.56	3.13	0.78
	2.6×10^4	0.2	1.56	1.56	3.13	0.39
	5.8×10^{8}	0.025	0.2	0.1	0.2	0.05
	5.8×10^7	0.025	0.2	0.1	0.2	0.05
E. coli NIHJ JC-2	5.8×10^6	0.025	0.2	0.1	0.2	0.05
	5.8×10^{5}	0.012	0.2	0.1	0.2	0.05
	5.8×10^4	0.012	0.2	0.1	0.2	0.025
	3.4×10^{8}	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39
P. aeruginosa ATCC 10145	3.4×10^7	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39
	3.4×10^6	0.39	0.78	1.56	1.56	0.39
	3.4×10^{5}	0.39	0.78	1.56	0.78	0.39
	3.4×10^4	0.2	0.78	1.56	0.78	0.2

Medium: Mueller-Hinton agar

Table 7. Effect of horse serum on antibacterial activity of grepafloxacin and other drugs

0	Horse serum		I	MIC (μg/ml)		
Organism	(%)	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
	0	0.025	0.39	0.2	0.39	0.2
S. aureus FDA 209P	10	0.025	0.39	0.2	0.39	0.2
5. aureus FDA 2091	20	0.025	0.39	0.2	0.78	0.2
	50	0.05	0.39	0.39	0.78	0.2
	0	0.2	1.56	1.56	3.13	0.78
E f!:- IEO 10500	10	0.2	1.56	1.56	6.25	0.78
E. faecalis IFO 12580	20	0.2	1.56	3.13	6.25	0.78
	50	0.2	1.56	3.13	6.25	0.78
	0	0.025	0.1	0.1	0.2	0.025
E ENHILLO	10	0.025	0.1	0.1	0.2	0.012
E. coli NIHJ JC-2	20	0.025	0.1	0.2	0.2	0.012
	50	≦0.006	0.1	0.2	0.2	0.1
	0	0.39	0.78	1.56	1.56	0.2
D ' AMOO 10145	10	0.39	0.78	1.56	1.56	0.2
P. aeruginosa ATCC 10145	20	0.39	0.78	1.56	1.56	0.39
	50	0.39	0.78	3.13	1.56	0.78

Medium: Mueller-Hinton agar

8. PAEの測定

GPFXのS. aureus FDA 209Pに対するPAEは2時間であり、NFLX, OFLX, CPFXとほぼ同程度であったが、ENXは1.4時間とやや短い傾向であった。GPFXは E. coli

NIHJ JC-2に対しても比較的長いPAE (1.6時間)を示し CPFXとほぼ同程度であった。OFLXは1.1時間および ENXは1.2時間とやや短いPAEであった(Table 15)。

Table 8. Effect of Mg ion on antibacterial activity of grepafloxacin

				MIC (μg/ml)		
Drugs	Organism		Mg++	concentration	(mM)	
		0	0.1	1.0	5.0	10.0
Grepafloxacin	S. aureus FDA 209P	0.05	0.05	0.05	0.10	0.20
	E. faecalis IFO 12580	0.20	0.20	0.20	0.39	0.78
	E. coli NIHJ JC-2	0.025	0.025	0.025	0.05	0.10
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78
Norfloxacin	S. aureus FDA 209P	0.78	0.78	0.78	1.56	3.13
	E. faecalis IFO 12580	1.56	1.56	3.13	6.25	12.5
	E. coli NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.20	0.39
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
Ofloxacin	S. aureus FDA 209P	0.20	0.20	0.39	0.39	0.78
	E. faecalis IFO 12580	1.56	1.56	1.56	3.13	6.25
	E. coli NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.20	0.39
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56
Enoxacin	S. aureus FDA 209P	0.78	0.78	0.78	1.56	3.13
	E. faecalis IFO 12580	3.13	3.13	3.13	12.5	25
	E. coli NIHJ JC-2	0.20	0.20	0.20	0.39	0.78
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56
Ciprofloxacin	S. aureus FDA 209P	0.39	0.39	0.39	0.78	0.78
	E. faecalis IFO 12580	0.39	0.39	0.78	1.56	3.13
	E. coli NIHJ JC-2	0.025	0.025	0.025	0.05	0.10
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.20	0.20	0.20	0.39	0.39

Table 9. Effect of Ca ion on antibacterial activity of grepafloxacin

				MIC (μg/ml)		
Drugs	Organism		Ca++	concentration	(mM)	
		0	0.1	1.0	5.0	10.0
Grepafloxacin	S. aureus FDA 209P	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	E. faecalis IFO 12580	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39
	E. coli NIHJ JC-2	0.025	0.025	0.025	0.05	0.10
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78
Norfloxacin	S. aureus FDA 209P	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
	E. faecalis IFO 12580	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13
	E. coli NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.10	0.20
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
Ofloxacin	S. aureus FDA 209P	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	E. faecalis IFO 12580	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
	E. coli NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.10	0.20
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
Enoxacin	S. aureus FDA 209P	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
	E. faecalis IFO 12580	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25
	E. coli NIHJ JC-2	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
Ciprofloxacin	S. aureus FDA 209P	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
	E. faecalis IFO 12580	0.39	0.39	0.39	0.78	0.78
	E. coli NIHJ JC-2	0.025	0.025	0.025	0.05	0.05
	P. aeruginosa ATCC 10145	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39

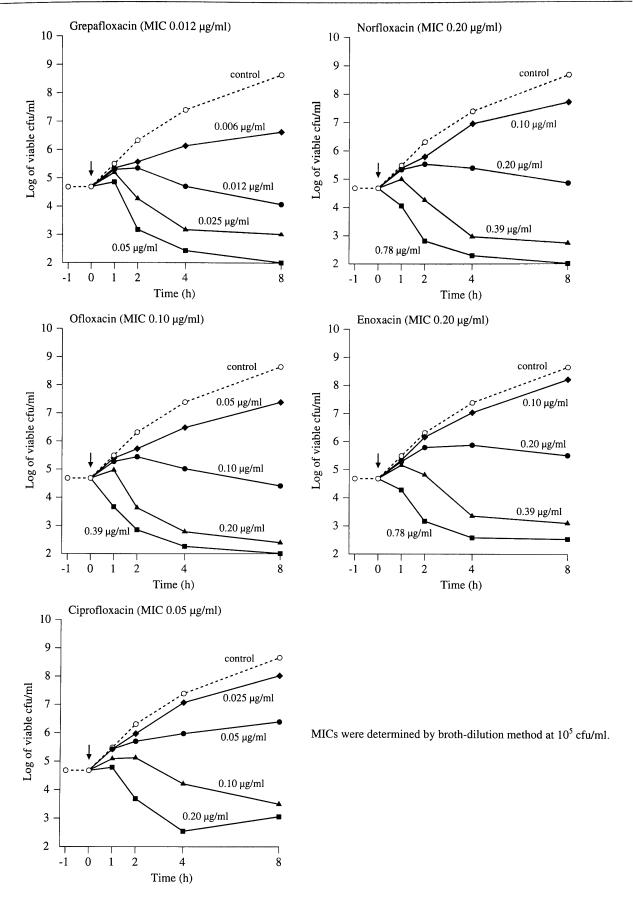


Fig. 1. Effect of grepafloxacin and other antibiotics on viability of Staphylococcus aureus 209P.

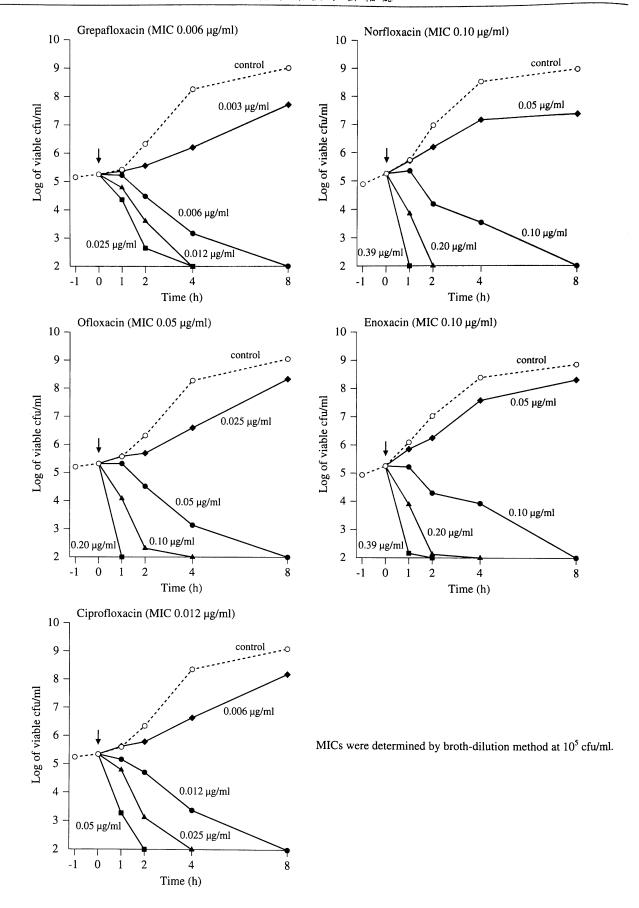


Fig. 2. Effect of grepafloxacin and other antibiotics on viability of Escherichia coli NIHJ JC-2.

9. マウス全身感染症に対する治療効果

グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対するGPFX及び比較薬剤の治療効果をTable 16およびTable 17に示した。 GPFXのin vivo抗菌力はin vitroの抗菌力をよく反映した成績であった。即ち、グラム陽性菌感染症に対しGPFX は低いMICを示すとともに優れた感染治療効果を示した。S.~aureus Smith 感染症に対する効果は ED_{60} 値で1.66mg/kgであり,比較薬剤より3.8~12.7倍優れた成績であった。メチシリン耐性S.~aureusでも同様の成績であった。S.~pneumoniae感染症においてNFLXおよびENX

Table 10. Comparison between MIC and MBC of grepafloxacin and other quinolones

	S. a	ureus	E. fa	ecalis	E. coli		P. aeruginosa	
Drugs	MIC ₈₀	MBC ₈₀	MIC ₈₀	MBC ₈₀	MIC ₈₀	MBC ₈₀	MIC ₈₀	(μg/ml) MBC ₈₀
Grepafloxacin	0.05	0.10	0.39	0.78	0.0125	0.025	0.20	0.78
Norfloxacin	0.78	3.13	3.13	6.25	0.05	0.10	0.39	0.78
Ofloxacin	0.20	0.39	1.56	3.13	0.05	0.05	0.78	3.13
Enoxacin	0.78	3.13	6.25	50	0.10	0.10	0.78	1.56
Ciprofloxacin	0.39	0.78	0.78	3.13	0.0125	0.0125	0.10	0.39

Table 11. Frequency of spontaneous mutants resistant to grepafloxacin

Organism		Fre	equency of mutants	3	
Organism	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
S. aureus FDA 209P	$<1.8 \times 10^{-8}$	<1.8×10 ⁻⁸	$<1.8 \times 10^{-8}$	6.3×10^{-8}	$<1.8 \times 10^{-8}$
E. faecalis IFO 12580	$<1.7 \times 10^{-8}$				
E. coli NIHJ JC-2	$< 3.8 \times 10^{-9}$	$< 3.8 \times 10^{-9}$	<3.8×10 ⁻⁹	$< 3.8 \times 10^{-9}$	$< 3.8 \times 10^{-9}$
P. aeruginosa ATCC 10145	$< 5.9 \times 10^{-9}$				

Table 12. Changes in the MIC of bacteria cultured in the drugs and in continuous culture in the medium

Organism		MIC (μg/ml)	
Drug	Parent	20 times transfer	30 times transfer*
S. aureus FDA 209P			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Grepafloxacin	0.025	0.20	0.20
Norfloxacin	0.39	3.13	3.13
Ofloxacin	0.20	1.56	1.56
Enoxacin	0.39	12.5	12.5
Ciprofloxacin	0.39	1.56	1.56
E. faecalis IFO 12580			
Grepafloxacin	0.20	0.78	0.39
Norfloxacin	1.56	3.13	3.13
Ofloxacin	1.56	3.13	1.56
Enoxacin	3.13	6.25	6.25
Ciprofloxacin	0.78	0.78	0.78
E. coli NIHJ JC-2			
Grepafloxacin	0.025	0.05	0.05
Norfloxacin	0.10	0.39	0.39
Ofloxacin	0.10	0.10	0.10
Enoxacin	0.20	0.39	0.39
Ciprofloxacin	0.025	0.05	0.05
P. aeruginosa ATCC 10145			
Grepafloxacin	0.39	1.56	1.56
Norfloxacin	0.78	12.5	12.5
Ofloxacin	0.78	3.13	3.13
Enoxacin	0.78	6.25	6.25
Ciprofloxacin	0.20	0.78	0.78

^{*} Last 10 times periodic transfer was carried out in drug-free medium.

Table 13. Antibacterial activity of grepafloxacin and reference drugs after 20 times culture in medium containing each drug

0	MIC (μg/ml)						
Organism —	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin		
S. aureus FDA 209P			-				
Parent	0.025	0.39	0.20	0.39	0.39		
Grepafloxacin ^{a)}	$0.20^{b)}$	3.13	0.78	3.13	3.13		
Norfloxacin ^{a)}	0.39	3.13 ^{b)}	3.13	3.13	1.56		
Ofloxacin ^{a)}	0.20	6.25	1.56^{b}	3.13	3.13		
Enoxacin ^{a)}	0.39	25	3.13	12.5 ^{b)}	6.25		
Ciprofloxacin ^{a)}	0.39	6.25	1.56	6.25	1.56 ^{b)}		
E. faecalis IFO 12580							
Parent	0.20	1.56	1.56	3.13	0.78		
Grepafloxacin ^{a)}	$0.78^{b)}$	3.13	3.13	12.5	3.13		
Norfloxacin ^{a)}	0.39	$3.13^{b)}$	3.13	6.25	1.56		
Ofloxacin ^{a)}	0.39	3.13	$3.13^{b)}$	6.25	0.78		
Enoxacin ^{a)}	0.39	6.25	3.13	6.25^{b}	1.56		
Ciprofloxacin ^{a)}	0.39	3.13	3.13	6.25	0.78 ^{b)}		
E. coli NIHJ JC-2							
Parent	0.025	0.10	0.10	0.20	0.025		
Grepafloxacin ^{a)}	$0.05^{b)}$	0.10	0.10	0.20	0.025		
Norfloxacin ^{a)}	0.025	$0.39^{b)}$	0.20	0.78	0.20		
Ofloxacin ^{a)}	0.05	0.20	$0.10^{b)}$	0.20	0.05		
Enoxacin ^{a)}	0.05	0.39	0.39	$0.39^{b)}$	0.05		
Ciprofloxacin ^{a)}	0.05	0.20	0.20	0.39	0.05 ^{b)}		
P. aeruginosa ATCC 10145							
Parent	0.39	0.78	0.78	0.78	0.20		
Grepafloxacin ^{a)}	$1.56^{b)}$	3.13	6.25	3.13	1.56		
Norfloxacin ^{a)}	3.13	12.5^{b}	12.5	12.5	3.13		
Ofloxacin ^{a)}	1.56	3.13	$3.13^{b)}$	3.13	0.76		
Enoxacin ^{a)}	1.56	3.13	6.25	6.25^{b}	0.78		
Ciprofloxacin ^{a)}	1.56	1.56	6.25	3.13	0.78 ^{b)}		

a): Organisms were cultured in each drugs for 20 times b): MIC against the drugs used in continuous culture

Table 14. Effect of grepafloxacin on DNA gyrase supercoiling activity

Organism	Drug	MIC (μg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
	Grepafloxacin	0.025	0.09
Escherichia coli	Norfloxacin	0.05	0.704
K-12	Ofloxacin	0.05	0.529
	Ciprofloxacin	0.0125	0.197

Table 15. Postantibiotic effect of grepafloxacin and reference drugs against Staphylococcus aureus FDA 209P and Escherichia coli NIHJ JC-2

	S. aureus FDA 209P				E. coli NIHJ JC-2					
	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin	grepafloxacin	norfloxacin	ofloxacin	enoxacin	ciprofloxacin
Drug Concentration (µg/ml)	0.05	1.56	0.78	1.56	0.78	0.025	0.20	0.20	0.39	0.05
PAE (h)	2.0	2.0	2.0	1.4	1.8	1.6	1.4	1.1	1.2	1.7

では200mg/kgの容量でも効果が認められなかったが、GPFXはOFLX、CPFXより2.2および3.9倍強い治療効果を示し、そのED50値は25.79mg/kgであった。グラム陰性菌感染症では、E. coli感染症でGPFXはOFLX、CPFXよりやや優れ、NFLX、ENXより優れた治療効果であった。P. mirabilis感染症ではNFLX、ENXとほぼ同等の効果を示したが、S. marcescens感染症では比較薬剤よりやや劣る成績であった。H. influenzae感染症に対して、GPFXは比較薬剤の中で最も強く、2.4~24.4倍強い効果を示した。P. aeruginosa感染症ではCPFXとほぼ同等の優れた効果を示した。M. (B.) catarrhalis感染症に対してもGPFXは比較薬剤中最も強い効果を示した。

Ⅲ. 考 察

GPFXは幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有していた。グラム陽性菌に対するGPFXの抗菌力は強く、臨床より分離された S. pneumoniae対する MIC_{80} は0.39 $\mu g/ml$ であり、比較薬剤中最も優れた抗菌力を示した。グラム陰性菌では、多くの菌種でCPFXと同等の抗菌力を示したが、Proteus、Providencia、Morganella属の菌種ではやや抗菌力が弱く、ENXと同程度であった。また H. influenzae、M. (B.) catarrhalisおよびブドウ糖非醱酵菌 (P. aeruginosaを除く)に対しては、強い抗菌力を示した。GPFXは呼吸器感染症より高頻度に分離される S. pneumoniae、H. influenzae、P. aeruginosa、M. (B.) catarrhalis等の菌種に強い抗菌力を示すことが確認され、臨床における

有効性が期待された。また、諸因子の影響は殆ど受けないが、酸性pH及び高濃度の金属イオンによりやや抗菌力の低下する傾向が見られたが、その程度は比較薬剤と同程度であった。キノロン薬では金属イオンにより抗菌力が低下する報告は多く見られるが、MICに影響を及ぼす金属イオンの濃度は高く、GPFXの場合では5~10mMで1/2~1/4の抗菌力の低下であった。尿中では高濃度の金属イオンが存在する可能性がありが、尿路感染症においてはこの影響を考慮する必要性があるが、尿中には金属イオンの影響を考慮する必要性があるが、尿中には療効果にまで影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

殺菌力は同系薬剤と同様に強い殺菌作用を示した。GPFXは比較薬剤と同様に耐性は獲得されにくいものの、一旦上昇したMICは継代培養を繰り返しても、元のMICには復帰しなかった。近年の臨床におけるキノロン耐性菌の増加は、キノロン薬の使用頻度と関係があることが示されており、この成績を反映したものと考えられる。またGPFXは低濃度でDNA gyraseを阻害し、in vitro抗菌力をよく反映した成績であった。GPFXの抗菌作用機序は他のニューキノロン薬と同様にDNA gyrase阻害作用であることが示唆された。また動物を用いたin vivo抗菌力はin vitroの成績をよく反映した成績であり、マウスを用いた全身感染症治療効果において、GPFXは特にグラム陽性菌感染症に優れた効果を示した。従来より、新キノロン薬はS. pneumoniaeに対する抗菌力が弱く、本

Table 16. Protective effect of grepafloxacin and reference drugs against experimental systemic infection caused by gram-positive bacteria in mice

Strain	Challenge dose (cfu/mouse)	Mucin	Drugs	MIC (μg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit
S. aureus Smith	3.5 × 10 ⁵	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.025 0.39 0.20 0.78 0.20	1.66 21.16 6.36 15.17 7.57	$1.30 \sim 2.09$ $17.18 \sim 27.20$ $4.89 \sim 8.51$ $12.03 \sim 19.19$ $4.73 \sim 12.69$
S. aureus C196 (MRSA)	7.0 × 10 ⁵	10%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.0125 0.78 0.20 0.78 0.20	4.46 85.48 13.22 25.00 21.37	3.78~5.24 64.35~101.34 10.73~17.00 19.83~31.53 16.09~25.34
S. pneumoniae type III	1.5×10 ³	_	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.20 6.25 1.56 12.5 1.56	25.79 >200 57.20 >200 100.63	17.28 ~ 36.68 41.42 ~ 80.40 66.69 ~ 168.14
E. faecalis C63*	2.0×10^7	10%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.39 6.25 3.13 12.5 1.56	30.34 >100 43.01 >100 >100	22.37 ~ 42.28 33.52 ~ 57.67

Therapy: single oral administration at 1 h after infection

^{*}Immediately after infection

菌による感染症の治療に問題を残していた 90 。一方GPFXは 50 。の治療に問題を残していた 90 。一方GPFXは 50 。の神を症に対する抗菌力が強く,全身感染症においても優れた効果が確認され,また 50 50

抗菌力を示し、肺組織内に高濃度分布する"特徴を有することが報告されている。GPFXは呼吸器感染症起因菌に幅広い抗菌スペクトラムを持ち、また高い肺内濃度を示すことが推測されることから、特に呼吸器系の感染症に対して、優れた有効性が期待される薬剤であると推察された。

Table 17. Protective effect of grepafloxacin and reference drugs against experimental systemic infection caused by gram-negative bacteria in mice

Strain	Challenge dose (cfu/mouse)	Mucin	Drugs	MIC (μg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% Confidence limit
E. coli No.29	9.3 × 10 ⁵	3%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.0125 0.05 0.05 0.10 0.0125	0.60 3.53 1.01 2.50 0.95	$0.39 \sim 0.78$ $2.50 \sim 4.89$ $0.80 \sim 1.18$ $1.99 \sim 3.16$ $0.75 \sim 1.20$
K. pneumoniae NCTC 9632	7.8×10^6	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.0125 0.05 0.05 0.20 0.0125	0.81 4.27 0.78 2.29 0.71	$0.51 \sim 1.17$ $3.22 \sim 5.07$ $0.59 \sim 0.99$ $1.78 \sim 3.16$ $0.47 \sim 1.10$
P. mirabilis No.42	7.0 × 10 ⁵	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.39 0.10 0.20 0.39 0.025	6.62 8.10 1.56 5.99 1.77	4.83 ~ 8.72 6.38 ~ 9.47 1.33 ~ 1.94 4.56 ~ 8.07 1.35 ~ 2.30
S. typhimurium 5	1.9×10 ⁵	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.05 0.10 0.10 0.10 ≤0.006	0.78 4.75 1.61 3.79 1.08	$0.59 \sim 0.99$ $3.61 \sim 5.81$ $1.20 \sim 2.24$ $3.01 \sim 4.80$ $0.84 \sim 1.44$
S. marcescens IFO 12648	8.5×10 ⁴	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.20 0.10 0.20 0.20 0.05	6.57 3.31 1.49 3.12 1.15	4.30~9.30 2.42~4.36 0.97~2.27 2.67~3.88 0.85~1.67
H. influenzae C8	6.0 × 10 ⁷	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	≤0.006 0.10 0.05 0.20 0.025	0.54 13.15 1.31 9.50 2.02	$0.36 \sim 0.69$ $8.60 \sim 18.60$ $0.67 \sim 1.90$ $7.22 \sim 11.63$ $1.58 \sim 2.62$
P. aeruginosa E-2	8.8 × 10 ⁵	3%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.78 0.78 1.56 1.56 0.39	12.50 48.75 26.45 26.45 9.46	9.92~15.76 37.77~69.30 21.47~34.00 21.47~34.00 7.10~12.69
P. aeruginosa ATCC 10145	6.0 × 10 ⁵	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.39 0.78 1.56 0.78 0.20	18.96 90.04 28.84 31.18 22.51	$15.04 \sim 23.99$ $67.59 \sim 108.38$ $20.17 \sim 42.08$ $21.01 \sim 49.12$ $16.90 \sim 27.10$
M.(B). catarrhalis C-6	4.2 × 10 ⁷	5%	grepafloxacin norfloxacin ofloxacin enoxacin ciprofloxacin	0.012 0.39 0.10 0.39 0.10	0.99 11.32 2.42 10.86 2.63	$0.54 \sim 0.167$ $4.58 \sim 24.14$ $1.77 \sim 3.76$ $5.45 \sim 20.64$ $0.79 \sim 6.23$

Therapy: single oral administration at 1 h after infection

文 献

- Neu H C, Fang W, Gu J W and Chin N X: In vitro activity of OPC-17116. Antimicrob Agent Chemother 36: 1310~1315, 1992
- 2) Hara K, Kaku M, Koga H and Kohno S: In vitro activity of OPC-17116 against Mycoplasma pneumoniae and its penetration into sputum and human polymorphonuclear leucocytes. 31th ICAAC, abstract p. 344 no. 1469, Chicago, 1991
- 3) 永山在明,中尾偕主:GrepafloxacinのChlamydia trachomatisに対するin vitro抗菌力。日化療会誌43 (S-1): 70~73, 1995
- 4) 日本化学療法学会:最小発育阻止濃度(MIC)の測定法改訂について。Chemotherapy 29:76~79, 1981
- 5) 日本化学療法学会:嫌気性菌の最小発育阻止濃度(MIC)測定法。Chemotherapy 27: 559~560, 1979
- 6) Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Inoue M and Mitsuhashi S: Purification and properties of DNA gyrase from a fluoro-quinolone resistant strain of

- Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 30: 777~780, 1986
- Funrsted K: post-antibiotic effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol 6: 271~274, 1987
- 8) 深田智子:キノロン系薬の尿中抗菌力に及ぼす 諸因子について。東女医大誌 58:1092~1102, 1988
- 9) 谷本普一, 守殿貞夫, 他:キノロン, ピリドンカルボン酸系薬剤。臨床と微生物14:41~56, 1987
- 10) Kenny G E and Cartwright F D: Susceptibility of Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae and Ureaplasma urealyticum of a New quinolone, OPC-17116. Antimicrob Agents Chemother 37: 1726 ~1727, 1993
- 11) 今田拓磨, 五島瑳智子, 宮崎修一, 山口惠三, 桑原章吾:ニューキノロン系抗菌薬grepafloxacin の in vitro, in vivo抗菌作用。日化療会誌43(S-1): 29~41, 1995

In vitro and in vivo antibacterial activity of grepafloxacin

Kinue Ohguro, Hirokazu Wakebe, Atushi Azuma, Fumie Mukai, Takuma Imada, Hiromitsu Yoneda, Hisako Ohnishi, Mika Kuramoto, Hisashi Miyamoto, Kazunori Ohmori, Hisashi Tamaoka and Mikio Kikuchi

Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 463·10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771·01, Japan

The in vitro and in vivo antibacterial activities of grepafloxacin (GPFX), a new synthetic antimicrobial agent, were compared with those of norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), enoxacin (ENX) and ciprofloxacin (CPFX). GPFX showed a broad spectrum of antibacterial activity against gram-positive and gram-negative and aerobic and anaerobic bacteria. GPFX was superior to reference compounds in activity against all gram-positive clinical isolates, including Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae. The antibacterial activity of GPFX against Escherichia coli, Citrobacter diversus, Klebsiella pneumoniae and Enterobacter aerogenes was similar to that of CPFX and superior to those of NFLX, ENX and OFLX. The activity of GPFX against Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida was slightly less than that of CPFX but more active than those other reference drugs. The activity was similar to that of ENX against Citrobacter freundii, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Providencia rettgeri and Morganella morganii. GPFX was superior to the reference compounds in activity against Haemophilus influenzae, Xanthomonas maltophilia, Acinetobacter calcoaceticus, Moraxella (Branhamella) catarrhalis and Bacteroides fragilis. Neither the medium, variation in medium pH, inoculum size, nor the addition of cations or horse serum had any major effect on its activity. But the activity of GPFX was slightly reduced in the acidic condition and of a high concentration of cations. GPFX acted bactericidally over the MIC, and differences were very small between the MIC and MBC.

Frequencies of mutants resistant to GPFX were low. GPFX strongly inhibited the supercoiling activity of DNA gyrase purified from *E. coli* K-12. But inhibition of the relaxing activity of topoisomerase II from calf thymus was very low. GPFX produced excellent postantibiotic effects (PAE) against *S. aureus* and *E. coli*, and those effects were 2 and 1.6 hours, respectively. The therapeutic effect of these quinolones was evaluated against systemic infections in mice. GPFX was the most active against all the gram-positive bacterial infections. In gram-negative bacterial infections, GPFX was similar in activity to CPFX against *E. coli* and *P. aeruginosa* infections and was most active against *H. influenzae* infection. These results indicate that GPFX may be useful for various kinds of infections in humans.