

Pazufloxacinの短時間殺菌力と*in vitro* postantibiotic effectに関する検討

山城芳子・高畑正裕・島倉雅子・黒瀬朱美子・福岡義和・保田 隆・渡辺泰雄・
成田弘和

富山化学工業株式会社総合研究所*

Pazufloxacin (PZFX) の *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* および methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) に対する短時間殺菌力と postantibiotic effect (PAE) を, ofloxacin (OFLX) および ciprofloxacin (CPFX) と比較した。

1) 200mg経口投与時に得られるヒト血清中濃度の薬剤を作用させ, 4時間までの生菌数の変化から短時間殺菌力を比較した。いずれの薬剤においても *P. aeruginosa* と *E. coli* では0.25時間後にすでに菌数の減少が確認されたが, *P. aeruginosa* においてより強い短時間殺菌効果が認められた。*P. aeruginosa* や *E. coli* に比べMRSAに対する短時間殺菌効果は, いずれの薬剤でも若干劣っていた。同じ薬剤濃度での殺菌効果を比較すると, PZFXは *P. aeruginosa*, *E. coli* に対してはOFLXより優れており, CPFXとはほぼ同程度であり, MRSAに対しては最も優れていた。

2) 8 MICの薬剤を0.5時間作用させた時のPZFX, OFLXおよびCPFXのPAEは, *P. aeruginosa* に対して4.2h, 3.1h, 2.8h, *E. coli* に対して2.2h, 1.9h, 1.5h, MRSAに対して1.7h, 2.0h, 1.2hであった。また, 2 MICの薬剤を2時間作用させた時のPZFX, OFLX, CPFXのPAEは, *P. aeruginosa* に対して1.1h, 0.3h, 0.3h, *E. coli* に対して1.5h, 1.4h, 1.3h, MRSAに対して1.5h, 1.6h, 1.2hであった。このように, *P. aeruginosa* および *E. coli* では薬剤濃度下面積(濃度×接触時間)が同じ場合には, 高濃度を短時間に作用させた方が本剤のPAEは長くなる傾向が認められ, *P. aeruginosa* では特に顕著であった。

Key words : PZFX, 短時間殺菌力, postantibiotic effect

近年, Eagleらの実験¹⁾に端を発した postantibiotic effect (PAE) が, 臨床効果を考える上で有意義なものと考えられるようになっており, PAEを考慮した薬剤の投与方法が指摘されるようになってきている²⁻⁴⁾。このPAEは, 臨床において幅広く使用されるようになったニューキノロン系抗菌薬においても認められている⁵⁻⁷⁾。

そこで我々は, 新たに開発されたニューキノロン系合成抗菌薬 pazufloxacin (PZFX) の *in vitro* でのPAEを検討した。また, 近年 feroxacin (FLRX) や sparfloxacin (SPFX) のような血中半減期の長いニューキノロン系抗菌薬が開発されている中で, 本剤は高い最高血中濃度と短い血中半減期を示すことをその特徴としている⁸⁾。そこで, このような薬物動態が本剤の殺菌効果にどう影響するかを調べるため, 臨床常用量で得られる血清中濃度での短時間殺菌効果についても, あわせて検討した。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

PZFXは富山化学工業株式会社総合研究所で合成されたものを用いた。Ofloxacin (OFLX, 第一製薬) および ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品) は市販品より抽出して

用いた。

2. 使用菌株

臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* S-1299株, *Escherichia coli* TK-779株および methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) F-2341株を用いた。菌株は, 20% グリセリン中で-130℃にて保存し, 随時Heart infusion agar (HIA, 栄研) 平板に分離して使用した。

3. 使用培地

MIC測定, 短時間殺菌曲線, PAEにはCa²⁺, Mg²⁺調整 Mueller-Hinton broth (Cation-adjusted Mueller-Hinton broth: CAMHB, Difco)⁹⁾ を, 生菌数測定にはHIAを用いた。

4. MICの測定

日本化学療法学会標準法¹⁰⁾ に準じ微量液体希釈法によりMICを測定した。

5. 短時間殺菌力の測定

MHBで一夜培養した菌液を, 10⁸CFU/mlとなるようCAMHBに接種し, 37℃で1.5時間培養した後薬剤を添加した。37℃で静置培養し, 0.25, 0.5, 1, 2および4時間後の生菌数を混釈培養法により測定した。添加する

*〒930 富山市下奥井2-4-1

薬剤の濃度は、各薬剤200mgをヒトに経口投与した時に血清中で得られる濃度^{8,10,11)}をもとに設定した。すなわち、最高血清中濃度の近似値を最高濃度とし、PZFXおよびOFLXでは3, 2, 1および0.5 μ g/ml, CPFXでは1.5, 1, 0.5および0.25 μ g/mlとした。

6. PAEの測定

MHBで一夜培養した菌液を、 10^5 CFU/mlとなるようCAMHBに接種し、37 $^{\circ}$ Cで培養した。1~1.5時間後に、1~8 MICの薬剤を添加し、0.5~2時間作用させた後、0.2 μ m membrane filter (Schleicher & Schuell, FP 030/3)を用いて薬剤を除去し、滅菌した生理食塩液で2回洗浄した。CAMHBに再浮遊させ37 $^{\circ}$ Cで静置培養後、経時的に菌数を測定した。

PAEは以下の式により求めた。

$$PAE(h) = T - C$$

T: 薬剤除去直後の生菌数より1 log CFU/ml増殖するのに要した時間(h)

C: 薬剤無作用の菌が1 log CFU/ml増殖するのに要した時間(h)

なお、薬剤の濃度と接触時間の組み合わせは、薬剤濃度下面積(濃度 \times 接触時間, AUC)が2 MIC \cdot hもしくは4 MIC \cdot hとなるよう、各々以下の3通りに設定した。

AUCが2 MIC \cdot hの場合は4 MIC \times 0.5h, 2 MIC \times 1h, 1 MIC \times 2h。

AUCが4 MIC \cdot hの場合は8 MIC \times 0.5h, 4 MIC \times 1h, 2 MIC \times 2h。

各菌株ともに2~4回の実験を行い、その平均を求めた。

II. 結 果

1. 各薬剤の抗菌力

Table 1に、*P. aeruginosa* S-1299, *E. coli* TK-779および*S. aureus* F-2341に対するPZFX, OFLX, CPFXの微量液体希釈法でのMICを示す(Table 1)。

PZFXのMICは*P. aeruginosa* S-1299と*S. aureus* F-2341で0.39 μ g/ml, *E. coli* TK-779で0.025 μ g/mlであった。*E. coli*に対してはCPFXより1管劣っていたが、*P. aeruginosa*に対してはCPFXと同等でOFLXよりも2管優れており、*S. aureus*に対しては3薬剤中最も優れていた。

2. 短時間での殺菌力

200mg経口投与時にヒト血清中で得られる濃度^{8,10,11)}の薬剤を作用させた時の殺菌曲線を、Fig. 1~3に示す。

P. aeruginosa S-1299株の場合、PZFX 3 μ g/ml(約8 MIC)の添加では0.25時間後に、0.5 μ g/mlでは2時間後に菌が検出不能となり、強い短時間殺菌効果が認められた。同様の効果はCPFXにおいても認められ、1.5 μ g/ml(約4 MIC)では0.5時間後、0.5 μ g/mlでは2時間後に菌が検出不能となった。OFLXのMICは1.56 μ g/mlとPZFXよりも2管劣っており、3 μ g/mlの作用で菌が検出不能となったのは2時間後であった。また、1 μ g/ml以下では殺菌効果は見られなかった(Fig. 1)。

E. coli TK-779株の場合、PZFXではMICの100倍以上の濃度となる3 μ g/mlの添加で0.5時間後に菌が検出不能となった。また、0.5 μ g/mlでも4時間後には菌が検出されなくなった。OFLXは3 μ g/ml(60 MIC)では2時間後、2~0.5 μ g/mlでは4時間後に菌が検出されなくなった。同様にCPFXでもMICの100倍以上となる1.5 μ g/mlでは0.5時間後に菌が検出不能となったが、0.25 μ g/ml(20 MIC)では4時間後においてもわずかながら菌が検出された(Fig. 2)。

S. aureus F-2341株の場合、いずれの薬剤においても0.25時間後では菌数の減少は認められなかった。PZFXでは、1~3 μ g/mlの添加で0.5時間後から、0.5 μ g/mlで1時間後から菌数の減少がみられ、約8 MICに相当する3 μ g/mlでは4時間後に約4オーダーの菌数の減少が認められた。OFLXおよびCPFXのMICは1.56 μ g/mlでPZFXよりも2管劣っており、1/2 MICよりも低い濃度となる0.5 μ g/ml以下では、殺菌効果はみられなかった。また、最も高い濃度(OFLXでは3 μ g/ml, CPFXでは1.5 μ g/ml)でも4時間後に菌が検出された(Fig. 3)。

3. In vitro PAE

AUCを2 MIC \cdot hもしくは4 MIC \cdot hとしたときのin vitro PAEをFig. 4~6に示す。

P. aeruginosa S-1299株の場合、AUCを同一にした場合には、高濃度で短時間作用させた方がPAEは長く、その傾向はAUCを4 MIC \cdot hとしたときにより顕著であった。PZFXのPAEは3薬剤の中では最も長く、8 MICを0.5時間作用させたときのPAEは、PZFXでは4.2h, OFLXでは3.1h, CPFXでは2.8hであった。また、接触時間を同じにして薬剤濃度を変えた場合には薬剤濃度が高いほどPAEは長くなり、薬剤濃度を同じにして接触時間を変えた場合には、OFLXの2MIC作用を除けば接触時間が長いほどPAEは長くなったが、薬剤濃度を変えた方がその開

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of quinolones

| Drug | Organism | MICs (μ g/ml) | | |
|---------------|----------|--------------------------------------|--------------------------------|---|
| | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S-1299 | <i>Escherichia coli</i> TK-779 | Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> F-2341 |
| Pazufloxacin | | 0.39 | 0.025 | 0.39 |
| Ofloxacin | | 1.56 | 0.05 | 1.56 |
| Ciprofloxacin | | 0.39 | 0.0125 | 1.56 |

きは大きかった(Fig. 4)。

E. coli TK-779株の場合も、AUCが同一の場合には高濃度で短時間作用させた方がPAEは長くなった。8 MICを0.5時間作用させたときのPZFX, OFLX, CPFXのPAEは各々2.2h, 1.9h, 1.5hであり、PZFXが最も長いPAEを

示したが、4 MICを0.5時間作用させた場合にはPZFXのPAEはCPFXよりはやや長く、OFLXと同程度であった。また、PZFXやOFLXでは接触時間を同一にした場合には薬剤濃度が高いほどPAEが長くなったが、CPFXではそのような傾向は認められなかった(Fig. 5)。

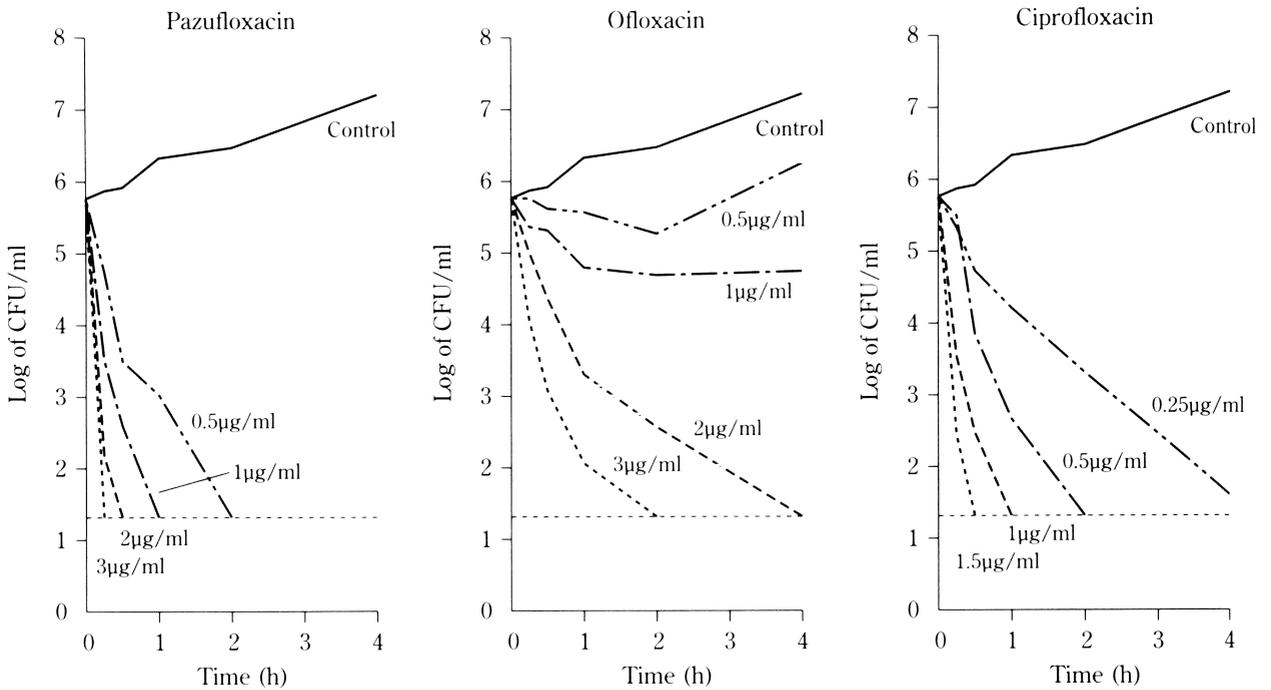


Fig. 1. Bactericidal activities of quinolones against *Pseudomonas aeruginosa* S-1299.

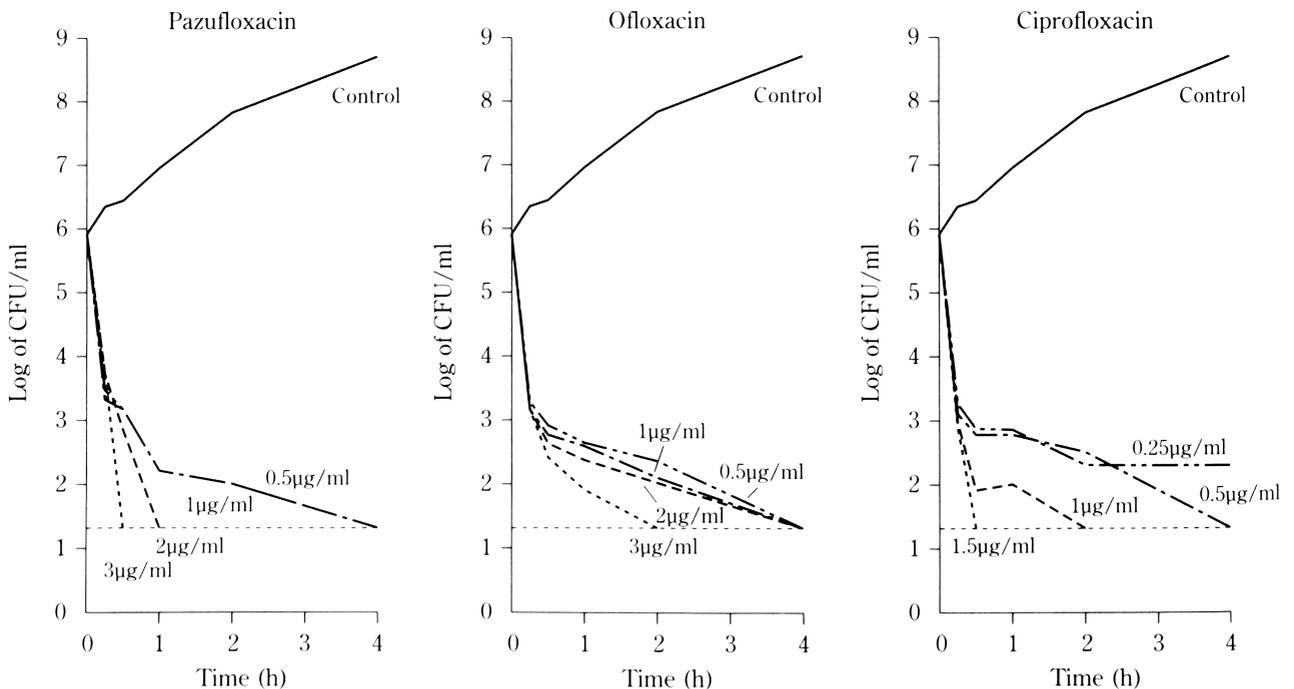


Fig. 2. Bactericidal activities of quinolones against *Escherichia coli* TK-779.

S. aureus F-2341株では上記と異なり、高濃度短時間作用でPAEが長くなる傾向は認められなかった。8 MICを0.5時間作用させた時のPAEは、PZFXでは1.7h, OFLXでは2.0h, CPFXでは1.2hであり、PZFXのPAEはOFLXと同程度で、CPFXよりは長かった。また、2 MIC・h作用時よりも4 MIC・h作用時の方がPAEは長くなったが、PZFXやOFLXに比べるとCPFXではその差は小さかった (Fig. 6)。

Ⅲ. 考 察

抗菌薬の有効な投与方法を考える際に、最高濃度とMIC以上を持続する時間 (time above MIC) のどちらが重要であるかについては、古くから議論されている。近年開発されたニューキノロン系抗菌薬は、アミノグリコシド系抗菌薬に近い濃度依存性の殺菌作用を示すことが報告されており、その活性にはMICに対する薬剤のピーク濃度の比が最も関与しているといわれているが⁵¹²⁾、β-

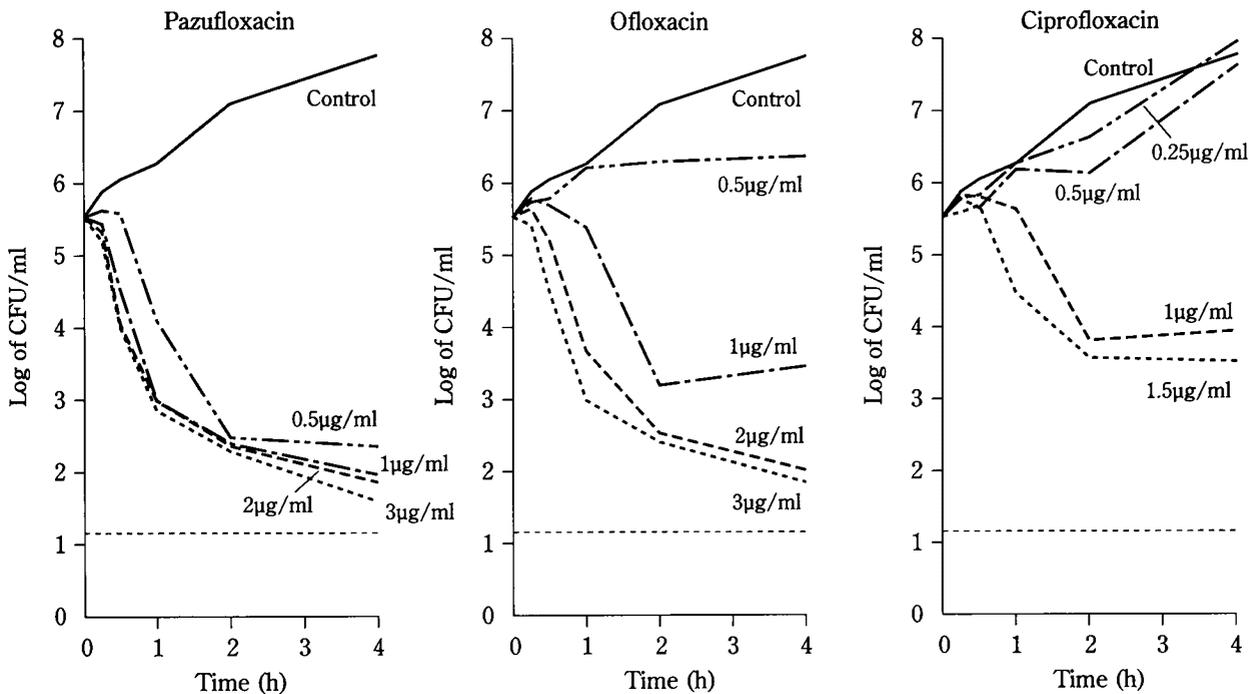


Fig. 3. Bactericidal activities of quinolones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* F-2341.

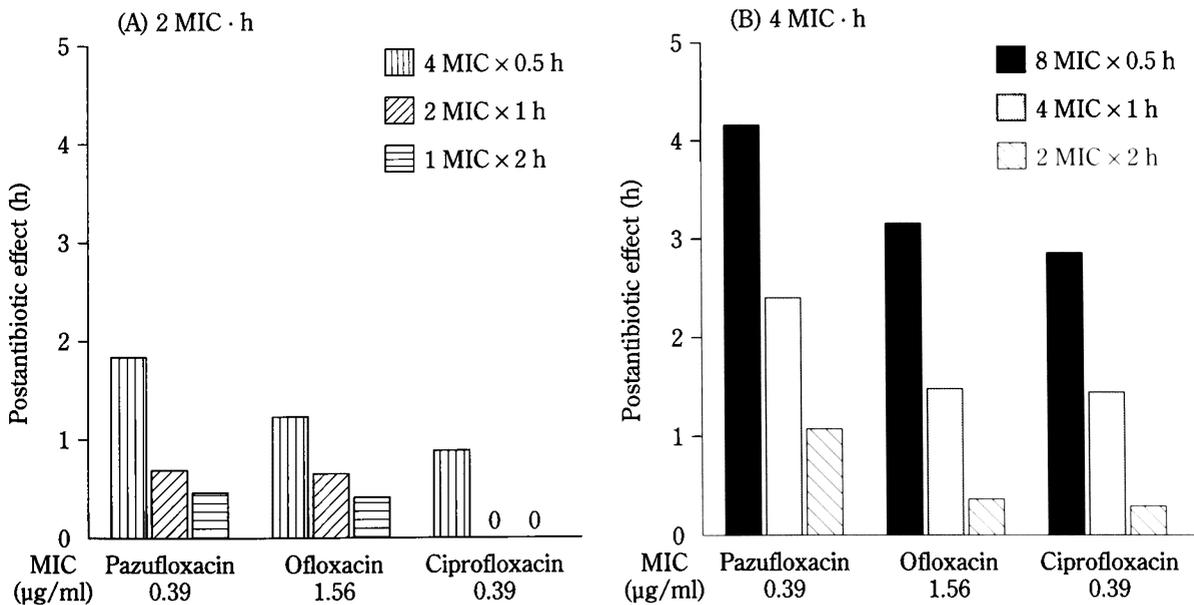


Fig. 4. *In vitro* postantibiotic effects of quinolones against *Pseudomonas aeruginosa* S-1299.

lactam系抗菌薬の持つ作用時間依存性と、アミノグリコシド系抗菌薬の濃度依存性の双方の性質を合わせ持つという報告もある¹⁰。また、キノロン系抗菌薬はPAEを有することが報告されており¹¹、アミノグリコシド系抗菌薬と同様、短時間に優れた殺菌力を示すことも報告されている¹²。従って、キノロン系抗菌薬の臨床効果を考える上では、このような効果もあわせて検討していかなくてはならない。そこで我々は、PZFXの短時間での殺菌効果ならびにPAEの有無についての検討を行った。

抗菌薬の殺菌曲線に及ぼす影響は、通常MIC濃度を基

準にして検討されているが、我々は、より臨床に近い濃度で検討するという観点から、臨床常用量で得られる血清中濃度^{8,10,11}をもとに濃度を設定した。PZFXでは、*P. aeruginosa*と*E. coli*に対してCPFXと同程度でOFLXよりは優れた短時間殺菌効果が得られた。PZFXやCPFXでは、*P. aeruginosa*に対する抗菌力の方が*E. coli*に対する抗菌力よりも劣っているにもかかわらず、強い短時間殺菌効果が認められた。MRSAに対してはPZFXが最も優れた短時間殺菌力を示したが、いずれの薬剤においても、短時間殺菌力は*P. aeruginosa*や*E. coli*に対する短時間殺

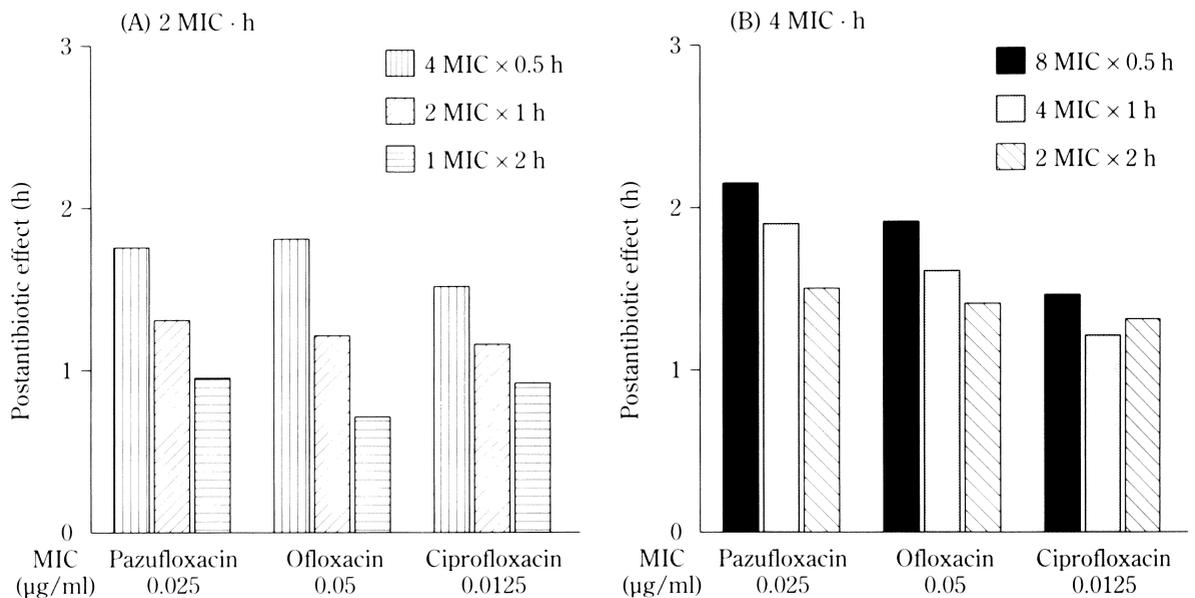


Fig. 5. *In vitro* postantibiotic effects of quinolones against *Escherichia coli* TK-779.

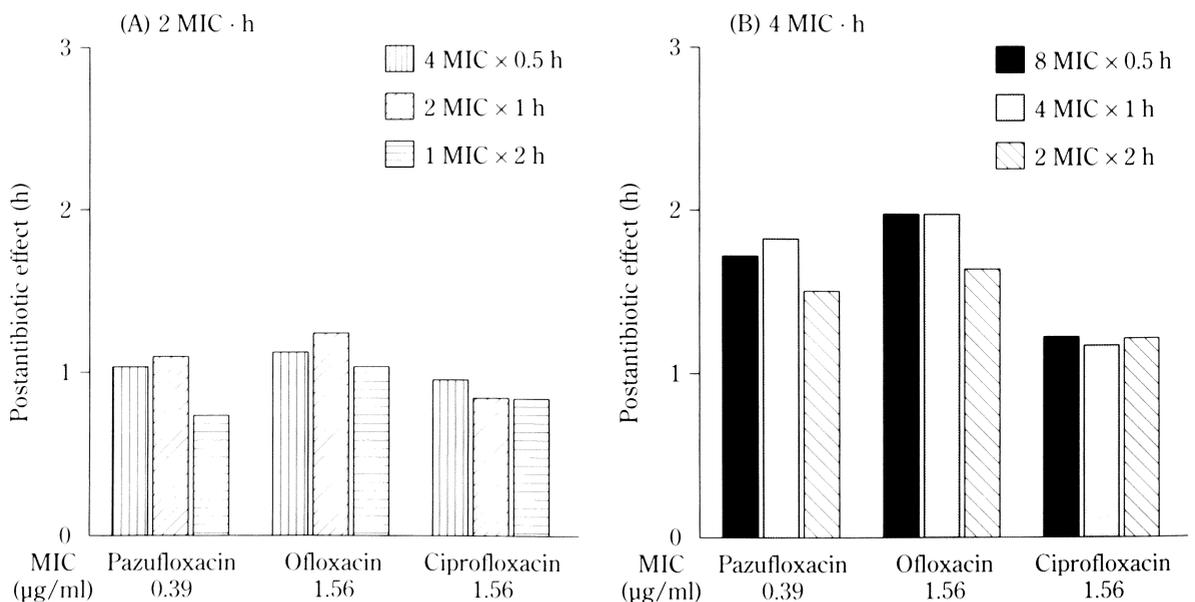


Fig. 6. *In vitro* postantibiotic effects of quinolones against methicilline-resistant *Staphylococcus aureus* F-2341.

菌力よりも若干劣っていた。また、MRSAの場合PZFXでは $1\mu\text{g/ml}$ 以上、OFLXでは $2\mu\text{g/ml}$ 以上でdose responseがほとんどみられず、同じMICを示す*P. aeruginosa*とは異なった傾向を示した。PZFXを $0.5\mu\text{g/ml}$ 作用させると、MRSAでは4時間後に約3オーダーの菌数の減少がみられ、*P. aeruginosa*では2時間後、*E. coli*では4時間後に菌が検出できなくなった。この $0.5\mu\text{g/ml}$ という濃度は、PZFXの場合、ヒト血清中で約5時間維持されている⁸⁾。さらに、生体内では宿主が本来持っている種々の防御機構が働くものと考えられ、より強い殺菌効果が得られるものと期待される。

PAEは、MICを基準にして濃度設定を行ったが、PZFXではほとんどが通常の用量で得られる血清中濃度と接触時間の組み合わせであった。PZFXの*P. aeruginosa*に対するPAEはOFLX、CPFXよりも長く、*E. coli*やMRSAに対するPAEはOFLXと同程度であり、ヒト血清中で得られる濃度でのPAEが認められた。また、*P. aeruginosa*や*E. coli*では、AUCを固定した場合に、高濃度を短時間で作用させた方がPAEが長くなる傾向が認められ、*P. aeruginosa*では特に顕著であった。一方、MRSAでは、AUCを固定するとPAEにあまり差がみられず、短時間殺菌力の場合と同様、PAEにおいても*P. aeruginosa*、*E. coli*とMRSAでは異なった傾向を示した。

今回は、*in vitro*でのPAEのみを検討したが、PAE期の菌は、白血球による殺菌を受けやすくなるという報告¹⁴⁾がある。また、キノロン系抗菌薬では*in vitro* PAEよりも*in vivo* PAEの方が有意に長いという報告⁵⁾もある。したがって、PZFXについても、今後*in vivo*でのPAEについて検討する必要があるだろう。

近年、FLRXやSPFXのように、血中半減期の長いニューキノロン系抗菌薬が開発されている中で、PZFXはむしろ血中半減期は短いものの、最高血中濃度が高いことを特徴としている薬剤であり⁸⁾、このような特性は、特にグラム陰性菌における短時間殺菌効果やPAEに関して有利に働くものと考えられる。今回の検討で、実際にヒトの血清中で得られる濃度でPZFXの短時間殺菌力やPAEが認められた意義は大きいものと考えられる。本剤の短い半減期は、臨床効果において決して不利に働くものではないと考えられ、臨床における有用性が示唆された。

文 献

- 1) Eagle H and Musselman A D: The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J Bacteriol* 58: 475~490, 1949
- 2) 柴田雄介: 黄色ブドウ球菌に対するpostantibiotic effectと投与方法に関する基礎的検討—Minocyclineとflomoxefの併用順序を中心に—。Chemotherapy 40: 1208~1216, 1992
- 3) 長谷川裕美: MRSA感染症に対するvancomycinの投与方法の検討—*In vitro*実験における投与量および投与時間について—。Chemotherapy 41: 329~338, 1993
- 4) 西村昌宏, 熊本悦明, 広瀬崇興, 大屋 哲: *In vitro*高度複雑性膀胱感染実験モデルを用いた最高尿中濃度値およびtime above MICが抗菌効果におよぼす意義についての実験的研究—尿中抗菌薬濃度自動シミュレーターを用いた検討—。感染症誌 68: 353~365, 1994
- 5) Renneberg J and Walder M: Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin, and amikacin in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1714~1720, 1989
- 6) Dudley M N: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *American J Medicine* 91 (S-6A): 45~50, 1991
- 7) 戸塚恭一, 柴田雄介, 菊池 賢, 長谷川裕美, 渡辺忠洋, 片平潤一, 清水喜八郎: 新キノロン剤FleroxacinのPostantibiotic effect。Chemotherapy 38(S-2): 669~671, 1990
- 8) 中島光好・小菅和仁・植松俊彦: Pazufloxacinの臨床第I相試験。日化療会誌43(S-2): 143~163, 1995
- 9) 抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1992年)(委員長: 斉藤 厚): I. 微量液体希釈法によるMIC測定法(日本化学療法学会標準法)の一部修正。Chemotherapy 41: 183~185, 1993
- 10) 第30回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。DL-8280, 1982
- 11) 小林宏行, 志村政文: BAYo9867(ciprofloxacin)の臨床第一相試験。Chemotherapy 33(S-7): 140~170, 1985
- 12) Blaser J, Stone B B, Groner M C and Zinner S H: Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1054~1060, 1987
- 13) 徳山宏基: New quinolone薬の至適作用法に関する研究—試験管内膀胱モデルを用いた検討—。Chemotherapy 42: 711~722, 1994
- 14) McDonald P J, Wetherall B L and Pruell H: Postantibiotic leukocyte enhancement increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Reviews Infectious Diseases* 3: 38~44, 1981

Studies of short term bactericidal activity and *in vitro* postantibiotic effect of pazufloxacin

Yoshiko Yamashiro, Masahiro Takahata, Masako Shimakura, Sumiko Kurose,
Yoshikazu Fukuoka, Takashi Yasuda, Yasuo Watanabe and Hirokazu Narita
Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.,
2-4-1, Shimookui, Toyama 930, Japan

The short term bactericidal activity and the *in vitro* postantibiotic effect (PAE) of pazufloxacin (PZFX) against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were compared with those of ofloxacin (OFLX) and ciprofloxacin (CPFX).

1) For the studies of short term bactericidal activities, viable cell counts were determined until 4h at concentrations which approximated the human serum levels after oral administration of 200 mg. The bacterial killing for *P. aeruginosa* and *E. coli* were seen by 0.25h, and viable cell counts of *P. aeruginosa* decreased more rapidly than *E. coli* in all three drugs. The bacterial killing for MRSA was most slowly. The bactericidal activity of PZFX was superior to that of OFLX and was the same as that of CPFX against *P. aeruginosa* and *E. coli*, and superior to that of OFLX and CPFX against MRSA, when the drug concentrations were equal.

2) Upon an exposure to 8 MIC for 0.5h, the PAEs of PZFX, OFLX and CPFX against *P. aeruginosa* were 4.2h, 3.1h and 2.8h, against *E. coli* were 2.2h, 1.9h and 1.5h and against MRSA were 1.7h, 2.0h and 1.2h, respectively. Upon an exposure to 2 MIC for 2h, the PAEs of PZFX, OFLX and CPFX against *P. aeruginosa* were 1.1h, 0.3h and 0.3h, against *E. coli* were 1.5h, 1.4h and 1.3h and against MRSA were 1.5h, 1.6h and 1.2h, respectively. The exposure to high level for short time produced longer PAEs in *E. coli* and *P. aeruginosa*.