

## *Pseudomonas aeruginosa* に対する各種ニューキノロン系抗菌薬の *in vitro* および *in vivo* における抗菌効果の比較検討

田場 秀樹<sup>1)</sup>・當山 真人<sup>1)</sup>・豊田 和正<sup>1)</sup>・新里 敬<sup>1)</sup>  
 斎藤 厚<sup>1)</sup>・仲宗根 勇<sup>2)</sup>・草野 展周<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 琉球大学医学部第一内科\*

<sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院検査部

(平成 8 年 1 月 24 日受付・平成 8 年 4 月 11 日受理)

*Pseudomonas aeruginosa* に対する各種ニューキノロン系抗菌薬 (NQs) の *in vitro* 抗菌活性および *in vivo* 治療効果について検討し、以下の結果を得た。

1) 1993 年 1 月～12 月の間に琉球大学医学部附属病院検査部にて各種臨床材料より分離された *P. aeruginosa* (100 株) に対する ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), tosufloxacin (TFLX), sparfloxacin (SPFX), levofloxacin (LVFX) および新規抗菌薬である NM 441 (活性本体: NM 394) の MIC を微量液体希釈法により測定した。検討薬剤のなかでは、CPFX, TFLX, および NM 441 の MIC<sub>50</sub> がともに 0.25 μg/ml であり、もっとも優れた抗菌活性を示した。OFLX の MIC<sub>50</sub> は 2.0 μg/ml であった。また OFLX 耐性株のうち 50% の株は NM 441 に対して感受性であった。

2) 正常マウスを用いた *P. aeruginosa* 呼吸器感染モデルに対する治療実験の結果、各 NQs 間に明らかな治療効果の差は認められず、治療群と未治療群との間にも生存率の差は認められなかった。

3) Cyclophosphamide 処理マウスを用いた *P. aeruginosa* 呼吸器感染モデルに対する治療実験の結果、LVFX 治療群に比較して NM 441 治療群が有意差をもって優れた治療効果を示した。

4) *In vitro* では CPFX と NM 441 は同等の抗菌活性を示したものの、治療成績において NM 441 が CPFX を上回る成績を示したことより、両薬剤の組織移行性の差異が影響をおよぼした可能性が考えられた。

以上、*in vitro* および *in vivo* の成績より、*P. aeruginosa* 感染症の治療に際して、OFLX あるいは LVFX に対する感受性の低下した株に対しては、CPFX や NM 441 が優れた治療効果を期待しうる選択薬剤になるものと考えられた。

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, ニューキノロン, *in vitro* 抗菌活性, *in vivo* 抗菌力, マウス呼吸器感染モデル

*Pseudomonas aeruginosa* は compromised host において重篤な感染症を引き起こし、種々の抗菌薬に対して抵抗性を示すことから、難治性細菌感染症の代表的な起炎菌としてきわめて重要な存在となっている<sup>1,2)</sup>。

今日に至るまで、本菌種に対して抗菌活性を有する薬剤が多数開発されてきたものの、これらの薬剤に対して本菌種は徐々に耐性を獲得しつつあり、施設による違いはあるが、臨床の場において優れた治療効果を期待しうる薬剤は限られたものとなっているのが実状である<sup>3,4)</sup>。

本菌種に対して優れた抗菌力を有する薬剤として、注射剤では第 3 世代以降のセフェム系やモノバクタム系、カルバペネム系等の β-ラクタム系抗菌薬、およびアミノグリコシド系抗菌薬がある。一方、経口剤ではニューキノロン系抗菌薬 (NQs) 以外に有効性を期待しうる薬剤はないに等しい状況となっている。

NQs は *P. aeruginosa* を含むグラム陰性桿菌群、およびグラム陽性菌群にもおよぶ幅広い抗菌スペクトルを有しており、良好な経口吸収性や組織移行性ともあわせて本薬剤の大きな特徴となっている<sup>5-7)</sup>。1984 年に norfloxacin (NFLX) が登場して以来、これまでに 9 種類 (1995 年 12 月現在) の NQs が市販されており、各科領域において臨床応用がなされているが<sup>8)</sup>、その使用頻度は年々増加傾向にある。特に呼吸器感染症領域において、これまで入院加療が原則であった疾患に対する治療が、本薬剤を使用することにより外来通院でも一部可能となるなど、臨床における評価も高まりつつある。

しかしながら、近年では本薬剤の優れた抗菌スペクトルゆえの濫用傾向も目立つようになり、特に NQs に対する *P. aeruginosa* の耐性化が急速に進みつつあることから、薬剤選択には個々の薬剤の抗菌力の差異を把握しておくことが必

要であると考えられる。

以上のような背景を踏まえ、我々は新規キノロン系抗菌薬である NM 441 を含めた各種 NQs について、*in vitro* および *in vivo* の両面から *P. aeruginosa* に対する抗菌効果について比較・検討を行ったので報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 対象菌株

1993 年 1 月より 12 月まで琉球大学医学部附属病院検査部にて各種臨床材料より分離された *P. aeruginosa* 100 株を対象とした。由来材料の内訳は呼吸器 (42 株)、泌尿・生殖器 (27 株)、膿 (27 株)、血液・穿刺液 (4 株) であり、菌株は原則として 1 患者 1 菌株とした。また *P. aeruginosa* の同定には VITEK GNI card (bioMérieux Vitek, Inc.) を用いた。

### 2. 使用薬剤

検討した薬剤は、ofloxacin (OFLX, 第一製薬), ciprofloxacin (CPF, バイエル薬品), tosufloxacin (TFLX, 富山化学工業), sparfloxacin (SPFX, 大日本製薬), levofloxacin (LVFX, 第一製薬), NM 441 (活性本体: NM 394, 日本新薬, 明治製薬) の NQs 6 剤であり、比較薬剤として ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ) および gentamicin (GM, シェリング・プラウ) を使用した。

### 3. 薬剤感受性試験

日本化学療法学会標準法<sup>9)</sup>にもとづき、MIC-2000 system (Dynatech Laboratories Inc.) を用いた微量液体希釈法により、各種 NQs の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

感受性測定用培地として、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を添加して調製した Mueller Hinton Broth (BBL) を用い、各抗菌薬の濃度は 64  $\mu\text{g/ml}$  から 0.03125  $\mu\text{g/ml}$  までの 12 段階希釈とした。最終接種菌量を約 10<sup>4</sup> CFU/ウェルに設定し、37 °C、24 時間培養後に各薬剤の MIC を判定した。

### 4. *P. aeruginosa* 感染マウスに対する治療効果

ddY 系、雄、7 週齢の SPF マウス (成和実験動物研究所) を使用した。菌株は呼吸器材料より分離された *P. aeruginosa* HR 52 株 (非ムコイド株) を用いた。HR 52 株に対する個々の薬剤の MIC 値は、OFLX: 8  $\mu\text{g/ml}$ , CPF: 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , TFLX: 2  $\mu\text{g/ml}$ , SPFX: 2  $\mu\text{g/ml}$ , LVFX: 2  $\mu\text{g/ml}$ , NM 394: 0.5  $\mu\text{g/ml}$  であった。Trypticase® Soy Agar (BBL) 培地上にて 18 時間培養した HR 52 株を生理食塩水に浮遊させ、所定の菌量に調節したものを接種菌液とした。pentobarbital をマウス腹腔内に注入して麻酔した後、22 G 留置針外筒を用いて接種菌液 0.08 ml を気管内に注入することによりマウス実験肺炎を惹起した。感染 12 時間後より、生理食塩水に溶解した各薬剤を胃ゾンデを用いて 1 回 5 mg/kg, 1 日 2 回経口投与し、7 日間治療を行った。感

染 7 日後の生存率にて各薬剤の治療効果を判定した。

### 5. 好中球減少マウス肺炎モデルの作成

マウスに cyclophosphamide (CY) 200 mg/kg を腹腔内投与し、好中球数の減少がピークとなる投与後 3 日目に所定の菌量に調製した菌液を経気管的に接種した。薬剤投与および治療効果判定は CY 非処理マウスと同様に行った。

### 6. 治療成績の統計学的解析

各薬剤間の治療成績すなわちマウス生存率の比較には  $\chi^2$  検定および Fisher 検定を行い、 $P < 0.05$  のものを有意差ありと判定した。

## II. 成績

### 1. *P. aeruginosa* に対する *in vitro* 抗菌活性

臨床分離 *P. aeruginosa* (100 株) に対する各種 NQs の MIC を Table 1 に示した。MIC<sub>50</sub> で比較した各薬剤の抗菌力の強さは、CPF = TFLX = NM 394 > SPFX > LVFX > OFLX の順となっており、CPF, TFLX および NM 394 が優れた抗菌力を示した。しかしながら、MIC<sub>90</sub> は高度耐性株の影響もあり、各薬剤ともに 16  $\mu\text{g/ml}$  以上の高い MIC 値を示した。特に TFLX の場合、100 株中 15 % の株が MIC > 64  $\mu\text{g/ml}$  の高度耐性株となっていることから、他薬剤に比較して MIC<sub>90</sub> が高値を示す結果となった。

次に各薬剤の MIC と菌株数を比較した相関図を Fig. 1 に示した。なお、各相関図中の太線は日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告<sup>10)</sup>に示されたブレイクポイント理論値計算式により算出された各抗菌薬の臨床的 Breakpoint MIC を示したものであり、各薬剤の MIC が OFLX  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ , CPF  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ , TFLX  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ , NM 394  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  である場合に、各々の薬剤に対して感受性ありと判断した。

CPF と NM 394 の比較では、感受性分布からも分かるように両薬剤ともにほぼ同等な抗菌活性を示しており、また両薬剤に対して耐性を示した株の割合は全体の 22 % にとどまった。

Table 1. Comparative antibacterial activities of fluoroquinolones against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*<sup>a)</sup>

Compound	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b)</sup>		
	range	50%	90%
Ofloxacin	0.25—>64	2.0	32
Ciprofloxacin	$\leq 0.03$ —64	0.25	16
Tosufloxacin	$\leq 0.03$ —>64	0.25	>64
Sparfloxacin	$\leq 0.03$ —>64	0.5	32
Levofloxacin	0.06—>64	1.0	16
NM 394 <sup>c)</sup>	$\leq 0.03$ —32	0.25	16

<sup>a)</sup> 100 strains of clinical isolates of *P. aeruginosa* were tested.

<sup>b)</sup> 50% and 90%, MICs at which 50, and 90% of the isolates are inhibited, respectively.

<sup>c)</sup> The active form of prodrug NM 441

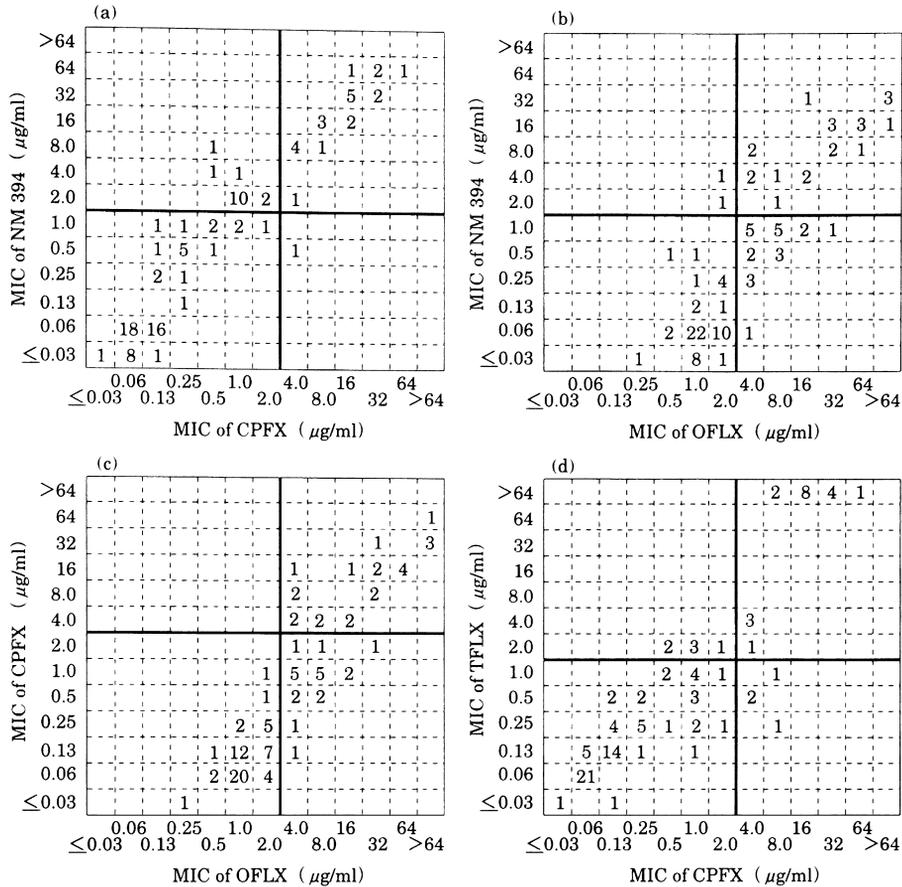


Fig. 1. Comparison of antibacterial activity among fluoroquinolones against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Correlation between (a) ciprofloxacin (CPFAX) and NM 394, (b) ofloxacin (OFLX) and NM 394, (c) OFLX and CPFAX, (d) CPFAX and tosylfloxacin (TFLX). The Breakpoint MIC values of each drug were indicated by bold lines in each figure.

OFLX と NM 394 との比較では、OFLX 耐性株 (44 株) のうち、NM 394 感受性株の占める割合は 50 % (22 株) であった。

OFLX と CPFAX との比較では、OFLX 耐性株 (44 株) に占める CPFAX 感受性株の割合は 47.7 % (21 株) となっており、これは先述の NM 394 と比較しても大差ない成績であった。

CPFAX と TFLX を比較すると、両者はほぼ同等な抗菌力を有しているものの、CPFAX に比して TFLX の MIC が 8 倍以上高い値を示す群が 10 株認められた。これらの株に対しては他の薬剤も breakpoint を大きく上回る高い MIC を示しており、多剤耐性株となっていた。

## 2. *P. aeruginosa* 呼吸器感染マウスを用いた各 NQs の治療効果の比較

### 1) 正常マウス肺炎モデルに対する治療効果

接種菌量を  $5 \times 10^8$  CFU/mouse に設定し、1 群 12 匹として CPFAX, LVFX および NM 441 にて治療した場合のマウス生存曲線を Fig. 2 に示した。

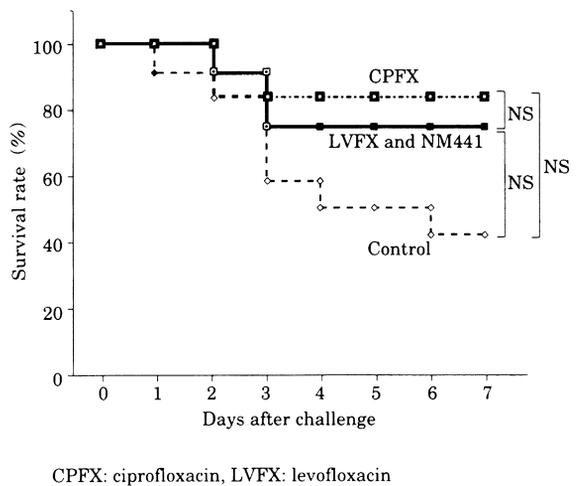


Fig. 2. Therapeutic effects of fluoroquinolones on experimental pneumonia in ddY mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* HR 52 ( $5 \times 10^8$  CFU/mouse). All drugs were administered orally twice a day for 7 days after infection (5 mg/kg/dose).

治療群の生存率は各々 CPFX: 83%, LVFX: 75% および NM 441: 75% となっており、各薬剤間で治療成績に有意差は認められなかった。また治療群と未治療群との間にも生存率の有意差は認められなかった。

#### 2) CY 処理マウス肺炎モデルに対する治療効果

接種菌量を  $8 \times 10^6$  CFU/mouse に設定し、1 群 10 匹として OFLX および NM 441 にて治療した場合のマウス生存曲線を Fig. 3 に示した。

NM 441 治療群および OFLX 治療群の生存率は各々 70%, 50% であり、2 薬剤間で生存率の有意差は認められなかったものの、未治療群に比較して NM 441 治療群には生存率の有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。

次に接種菌量を  $9 \times 10^7$  CFU/mouse に設定し、1 群 12 匹として CPFX, LVFX および NM 441 にて治療した場合のマウス生存曲線を Fig. 4 に示した。

未治療群は菌接種後 4 日目までに全例が死亡した。摘出した肺をホモジナイズしたものからは *P. aeruginosa* が分離され、コロニー性状、血清型および薬剤感受性試験の結果から接種菌と同一菌株であることが確認された。

治療群での生存率を比較すると、NM 441, CPFX, LVFX の順に生存率が高く各々 67%, 33%, 25% であり、NM 441 治療群と CPFX 治療群の間に有意差を認めなかったが、NM 441 治療群と LVFX 治療群では有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。

### III. 考 察

NQs は *P. aeruginosa* 感染症において良好な治療効果を期待しうる選択薬剤のひとつである。しかしなが

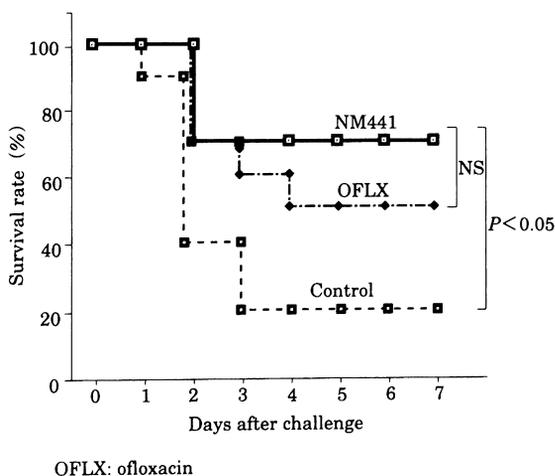


Fig. 3. Therapeutic effects of fluoroquinolones on experimental pneumonia in neutropenic mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* HR 52 ( $8 \times 10^6$  CFU/mouse).

Neutropenia was induced by the single intraperitoneal administration of cyclophosphamide (200 mg/kg), two days previous to the infection. Drug administration was the same as in the Fig. 2 legend.

ら、近年本薬剤の使用頻度が増すのに伴い、耐性菌の増加が懸念されており、臨床上重要な問題となっている。

NQs は細菌 DNA gyrase 活性を阻害することにより抗菌作用を示し、薬剤間での細菌 DNA gyrase に対する阻害活性の差が個々の薬剤の抗菌力の差として表れる<sup>6,13-16</sup>)。

NQs に対する *P. aeruginosa* の耐性化機構として DNA gyrase のサブユニット蛋白質の変異や菌体膜薬剤透過性の減少が知られており、NQs 耐性菌では相互に交差耐性を示す例が少なくないとされているが<sup>11,12</sup>)、臨床分離株のなかには必ずしも交差耐性を示さない株も存在する。

NQs は *P. aeruginosa* に対して優れた抗菌活性を有するものが多く、*P. aeruginosa* 感染症における抗菌薬療法に際して重要な選択薬剤となっている。したがって *P. aeruginosa* に対する各 NQs の抗菌力の差異を把握しておくことは重要であると考えられる。

今回の我々の検討では、*in vitro* において NM 394 (NM 441 の活性本体) および既存薬の CPFX が各種臨床材料より得られた *P. aeruginosa* 新鮮分離株に対しても優れた抗菌活性を有することが確認されたが、これは既報<sup>15,16</sup>) とほぼ同様の結果となっていた。

また NQs 全体でみても、一部の高度耐性株を除いて必ずしも交差耐性を示さない株も存在することから、*P. aeruginosa* に対して NQs を使用する際には、可能な限り薬剤感受性試験を施行し、個々の薬剤に対する耐性度の違いを把握すべきであると考えられる。

*In vivo* における抗菌力の比較では、マウスに対する CY 処理の有無により治療成績に差がみられたことが特徴であろう。

正常マウスでは、治療群と未治療群との間に生存率

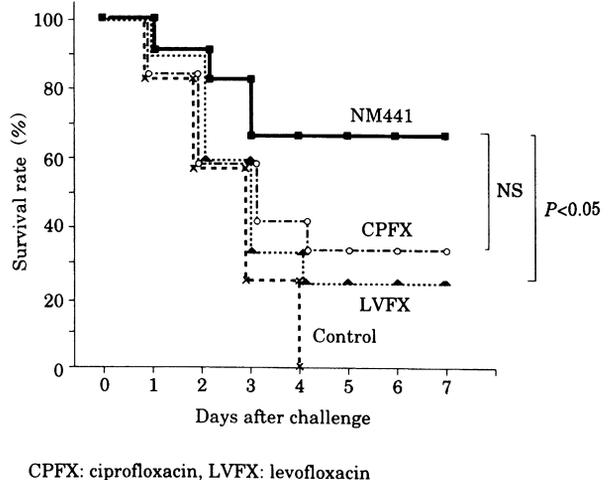


Fig. 4. Therapeutic effects of fluoroquinolones on experimental pneumonia in neutropenic mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* HR 52 ( $9 \times 10^7$  CFU/mouse).

の差が認められなかったが、これは気道局所の感染防御機構により、気道内に到達した *P. aeruginosa* が容易に排除されたことで、治療の有無による差がみられなかったものと考えられる。また薬剤間においても治療効果の差がみられなかったことに関して、NQs と好中球をはじめとする食細胞との協調作用が存在するために各薬剤間の *in vitro* における抗菌活性の差が必ずしも反映されなかったことによる影響と推察された。

一方、CY 処理を行った好中球減少マウスにおける治療効果の比較では各薬剤の本来の抗菌活性が反映されると考えられるが、今回の検討では NM 441 が優れた治療効果を示した。

実験に用いた HR 52 株に対する各 NQs の MIC を比較すると、CPFX および NM 394 がもっとも優れた抗菌活性を示し、LVFX はそれらに比較して劣る成績となっていたが、*in vivo* における成績をみても NM 441 には LVFX を上回る優れた治療効果が認められた。

一方、CPFX は NM 394 と同等の MIC 値を示していたにもかかわらず、NM 441 程の治療効果が認められなかったことに関して、今回の検討では確認していないが、マウス肺における両薬剤の組織移行性の差<sup>17)</sup> が影響をおよぼした可能性が考えられた。

選択薬剤の限られている *P. aeruginosa* 感染症の治療に際して、OFLX あるいは LVFX に対する感受性の低下した株に対して、既存薬である CPFX に加えて、新規薬剤である NM 441 も CPFX と同等もしくはそれ以上の優れた治療効果を期待しうる選択薬剤になるものと考えられた。

#### 文 献

- 1) 松本慶蔵: 緑膿菌感染症の現況とその治療。難治感染症治療の現況 (上田 泰編), p. 90~98, ライフ・サイエンス, 東京, 1990
- 2) 伊豫部志津子: 菌種別難治性感染症と新しい抗菌薬の開発動向—グラム陰性桿菌。日本臨床 52: 372~377, 1994
- 3) 草場耕二, 柿添郁子, 山田尚友, 田辺一郎, 永沢善三, 植田 寛, 田島 裕, 只野篤太郎: 当院における各種薬剤耐性緑膿菌の分離頻度について。Chemotherapy 42: 147~157, 1994
- 4) 中焚茂子, 福田さえ子, 田沢節子, 丸茂健治, 中村良子: 当院で分離された緑膿菌分離株の疫学的評価。日本化学療法学会雑誌 43: 525~530, 1995
- 5) Drusano G L: Pharmacokinetics of the Quinolone

Antimicrobial Agents. In Quinolone Antimicrobial Agents (Wolfson J S, Hooper D C ed.), p. 71~105, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1989

- 6) Bazile S, Moreau N, Bouzard D, Essiz M: Relationships among antibacterial activity, inhibition of DNA gyrase, and intracellular accumulation of 11 fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 36: 2622~2627, 1992
- 7) Piddock L J V: New Quinolones and Gram Positive Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 38: 163~169, 1994
- 8) 西野武志: キノロン系抗菌剤。臨床成人病 24: 1640~1646, 1994
- 9) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会: 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法)。Chemotherapy 38: 102~105, 1990
- 10) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告: 呼吸器感染症および敗血症におけるブレイクポイント。Chemotherapy 42: 905~914, 1994
- 11) Fukuda H, Hosaka M, Hirai K, Iyobe S: New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Antimicrob Agents Chemother 34: 1757~1761, 1990
- 12) Yamane Y, Nishikawa T, Komatsu Y: Outer membrane proteins responsible for the penetration of  $\beta$ -lactams and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 26: 175~184, 1990
- 13) Maxwell A: The molecular basis for quinolone action. J Antimicrob Chemother 30: 409~414, 1992
- 14) Inoue Y, Sato K, Fujii T, Hirai K, Inoue M, Iyobe S, Mitsuhashi S: Some properties of subunits of DNA gyrase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its nalidixic acid-resistant mutant. J Bacteriol 169: 2322~2325, 1987
- 15) Yoshida T, Mitsuhashi S: Antibacterial activity of NM 394, the active form of prodrug NM 441, a new quinolone. Antimicrob Agents Chemother 37: 793~800, 1993
- 16) Ozaki M, et al.: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM 394. Antimicrob Agents Chemother 35: 2490~2495, 1991
- 17) 菅野利恵, 宮崎修一, 辻 明良, 金子康子, 山口恵三, 五島瑛智子: ニューキノロン系抗菌薬 NM 441 に関する細菌学的検討—*in vitro* および *in vivo* 抗菌力について—。日本化学療法学会雑誌 44 (S-1): 26~41, 1996

*In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of new fluoroquinolones against  
*Pseudomonas aeruginosa*

Hideki Taba<sup>1)</sup>, Masato Tohyama<sup>1)</sup>, Kazumasa Toyoda<sup>1)</sup>, Takashi Shinzato<sup>1)</sup>,  
Atsushi Saito<sup>1)</sup>, Isamu Nakasone<sup>2)</sup> and Nobuchika Kusano<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Ryukyus, 207 Uehara,  
Nishihara-cho, Okinawa 903-01, Japan

<sup>2)</sup> Department of Clinical Laboratory, Ryukyu University Hospital

We investigated the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of new fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa*. The *in vitro* antimicrobial activities of ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), tosufloxacin (TFLX), sparfloxacin (SPFX), levofloxacin (LVFX), and NM 394, the active form of prodrug NM 441, were examined against 100 clinical isolates of *P. aeruginosa*. The MIC<sub>50S</sub> for CPFX, TFLX and NM 394 (0.25 µg/ml) were superior to that of LVFX (1.0 µg/ml) and OFLX (2.0 µg/ml). The *in vivo* therapeutic efficacies of fluoroquinolones (OFLX, CPFX, LVFX, and NM 441) were evaluated by using a normal and a neutropenic murine model of *P. aeruginosa* pneumonia. Neutropenia was induced by the single administration of cyclophosphamide at a dose of 200 mg/kg of body weight on day 0. Experimental pneumonia was established by intratracheal inoculation of *P. aeruginosa* on day 3. Antibiotics were administered orally twice a day for 7 days after bacterial challenge. There was no significant difference between the therapeutic effects of CPFX, LVFX, and NM 441 when using normal ddY mice. However, when neutropenic ddY mice were infected with  $9 \times 10^7$  CFU of *P. aeruginosa*, the survival rates of mice were 67%, 33%, and 25% after treatment with NM 441, CPFX, and LVFX, respectively. The difference in survival rates between the NM 441-treated group and the LVFX-treated group was statistically significant ( $P < 0.05$ ). These results suggest that NM 441 has potent antimicrobial activity against *P. aeruginosa* which shows reduced susceptibility to other fluoroquinolone agents.