

NM441 の細菌学的検討

浅田 和美¹⁾・桑原 京子¹⁾・平松 啓一¹⁾・横田 健²⁾¹⁾順天堂大学医学部細菌学教室*, ²⁾順天堂医療短期大学

新規プロドラッグ型キノロン系合成抗菌薬 NM441 の活性本体である NM394 の *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), 高度耐性 MRSA, coagulase-negative staphylococci (CNS), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2 (R⁺), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* (1987 年分離), *P. aeruginosa* (1991 年分離), *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* および *Bacteroides fragilis* の 21 菌種 10~66 臨床分離株に対する MIC₉₀ はそれぞれ 25, 1.56, 100, 0.39, 0.39, 1.56, 1.56, 1.56, 0.2, 0.1, 0.1, 0.025, 0.2, 25, 0.39, 1.56, 0.39, 1.56, 1.56, 12.5, 6.25, 3.13, 0.05 および 25 μ g/ml であった。NM394 は腸内細菌科の菌種を含む多くのグラム陰性菌に対して被検薬剤 (ofloxacin (OFLX), norfloxacin, ciprofloxacin, tosufloxacin, sparfloxacin (SPFX)) 中最も優れた抗菌力を示した。マウス培養マクロファージとの協力的食菌作用は比較的弱く, 1/2 MIC 以上の NM394 存在下においてのみ *E. coli* 細胞はよく食菌消化された。NM394 の CHO-K1, HeLa, IMR-32 細胞に対する細胞増殖抑制作用は OFLX より強く, SPFX と同程度であった。

Key words: NM441, キノロン系合成抗菌薬, 抗菌力, マウス培養マクロファージ, 細胞毒性

NM441 は日本新薬株式会社で合成され, 明治製菓株式会社と共同開発されたプロドラッグ型のキノロン系合成抗菌薬である。NM441 は経口投与後小腸上部より吸収され, オキソジオキソレニルメチル基が離脱することにより活性本体 NM394 となる。NM394 はグラム陽性菌, グラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルをもち, 特に緑膿菌に対して強い抗菌力を示すことが報告されている¹⁻³⁾。本研究では, 活性本体 NM394 の基礎的研究として各種臨床分離株に対する試験管内抗菌力, マウス培養マクロファージとの協力的食菌作用, および培養動物細胞に対する増殖抑制作用について検討した。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

NM394 は明治製菓株式会社・日本新薬株式会社から分与された純末を使用した。対照薬剤として ofloxacin (OFLX: 第一製薬), norfloxacin (NFLX: 杏林製薬), ciprofloxacin (CPFX: バイエル薬品), tosufloxacin (TFLX: 富山化学工業), sparfloxacin (SPFX: 大日本製薬) の純末を使用した。

2. 被検菌株

順天堂大学付属病院中央検査室および東京都老人研究所付属病院中央検査室から分与された 21 菌種 10~66 株 (1987~1991 年分離) を使用した。なお, R 因子保有 *Escherichia coli* は, *E. coli* CS2 に順天堂大学付属病院中央検査室の臨床分離株から得られた R 因子を当教室で接合伝達したものである。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法

日本化学療法学会法⁴⁾による平板希釈法で測定した。すなわち被検菌を L-broth 中で一夜振盪培養し, グラム陽性菌は 100 倍, グラム陰性菌は 1,000 倍に希釈し, これを 10⁶ CFU/ml の接種菌液とした。マイクロプランター (佐久間製作所) を用い, 接種菌液を 0.013~100 μ g/ml の薬剤を含む Mueller Hinton agar (Difco) にスポット接種し, 37°C 一夜培養後, 菌増殖の有無により MIC を求めた。ただし, *Streptococcus pyogenes* は前培養に Heart infusion (HI) broth, MIC 測定に 5% 羊脱線維血液加 HI agar (羊血液寒天平板) を使用した。*Streptococcus pneumoniae* は羊血液寒天平板に発育した菌をかきとり, L-broth に 10⁶ CFU/ml となるように浮遊した菌液を希釈して接種菌液とし, MIC 測定に羊血液寒天平板を使用した。*Haemophilus influenzae* は前培養に 5% Fildes Extract (OXOID) 加 HI broth, MIC 測定に 5% Fildes Extract (OXOID) 加 HI agar を使用した。*Bacteroides fragilis* は前培養に GAM broth (日水), MIC 測定に GAM 寒天を使用し, ガスパック法 (BBL) で嫌気培養した。

4. マウス培養マクロファージとの協力的食菌作用

5 週齢の ICR 雄マウスの腹腔を 8ml の 10% fetal calf serum 加 F12 培地 (日水) で洗って腹腔マクロファージを採取した。低速遠心で集め, 1 回洗浄後, 新鮮同培地中に 10⁵ cells/ml になるように浮遊した。カ

バースリップを沈めた24穴 CORNING multi dish の各 well に細胞浮遊液 0.1ml (10^4 cells) を接種し, 5% CO_2 存在下で30分静置後, 同培地を1ml ずつ加え, 一夜 CO_2 培養した。翌日培地を除き20% L-CM (conditioned medium L-929)⁵⁾ 加 F12 培地 1ml と交換し, 2時間 CO_2 培養を行ってマクロファージを活性化した。これに *E. coli* NIHJ JC-2 一夜培養液を希釈したものをマクロファージの50倍量 (5×10^5 cells/well) 接種し, 一部の well には NM394 を 1~1/8MIC になるように加えて5% CO_2 存在下で5時間培養を行った。カバースリップを取り出して saline G で洗浄し, メタノールで固定後 Giemsa 染色を行い光学像を撮影した。

5 培養動物細胞に対する増殖抑制作用の検討

教室保存のハムスター由来 CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞を10% fetal calf serum 加 F12 培地で, 5% CO_2 存在下 37°C 7日間 CORNING culture bottle 中で培養した。培養後 0.5mM EDTA 加 0.05% trypsin で 37°C 5分間処理し細胞をはがした。低速遠心で細胞を集め, trypsin を除いて10% fetal calf serum 加 F12 培地に再浮遊したものを24穴 CORNING multi dish に 1×10^4 cells/ml/well ずつ接種した。各 well に 1ml の10% fetal calf serum 加 F12 培地, あるいは 0.2~200 $\mu\text{g/ml}$ の NM394, OFLX または SPFX を含む同培地 1ml を添加し, 5% CO_2 存在下 37°C 4日間培養した。培養後, 各 well の培地・浮遊細胞を除き, 0.5mM EDTA 加 0.05% trypsin で 37°C 5分間処理して生細胞をはがした。Trypsin を除いた後,

ISOTON 液に再浮遊して Coulter counter で細胞数を自動測定した。薬剤無添加時の細胞数を100とし, 薬剤添加時の相対細胞数を求めた⁶⁾。

II. 成績

1 NM394 の試験管内抗菌力

各種臨床分離株に対する NM394 の試験管内抗菌力を Table 1 に示した。1988年に分離された *Staphylococcus aureus* 66株に対する NM394 の MIC_{90} は 25 $\mu\text{g/ml}$ で CPFX と同等, NFLX (=100 $\mu\text{g/ml}$) より4倍優れていたが, OFLX (=12.5 $\mu\text{g/ml}$), SPFX (=12.5 $\mu\text{g/ml}$), TFLX (=6.25 $\mu\text{g/ml}$) より2~4倍劣る成績だった。1981年に分離された methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 47株に対する NM394 の MIC_{90} は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ で OFLX と同等, CPFX より2倍, NFLX より8倍優れていたが, TFLX, SPFX より4~8倍劣っていた。1987年に分離された高度耐性 MRSA 64株に対する NM394 の MIC_{90} は 100 $\mu\text{g/ml}$ で CPFX, NFLX より優れていたが OFLX, SPFX, TFLX より4~16倍劣る成績だった。Coagulase-negative staphylococci (CNS) 41株に対する NM394 の MIC_{90} は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ で SPFX より2倍劣るが, TFLX と同等, CPFX, OFLX, NFLX より2~16倍優れていた。 *S. pyogenes* 48株に対する NM394 の MIC_{90} は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ で SPFX, TFLX と同等で CPFX, OFLX, NFLX より2~8倍優れていた。 *S. pneumoniae* 18株に対する NM394 の MIC_{90} は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ で CPFX と同等, OFLX, NFLX より4~8倍優れていたが, SPFX, TFLX より4倍劣る成績だった。

Table 1. Antibacterial activities of NM394 and reference drugs against clinical isolates

Organism (No. of strain)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> [1988] (66)	NM394	0.39 ~ 100	1.56	25
	ofloxacin	0.2 ~ 50	0.78	12.5
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	0.1	12.5
	ciprofloxacin	0.2 ~ 100	0.78	25
	norfloxacin	0.78 ~ >100	3.13	100
	tosufloxacin	0.025 ~ >100	0.1	6.25
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> [1981] (47)	NM394	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	ofloxacin	0.05 ~ 1.56	0.78	1.56
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.2	0.1	0.2
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	3.13
	norfloxacin	0.39 ~ 25	3.13	12.5
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.39	0.05	0.39
High-level methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> [1987] (64)	NM394	0.39 ~ 100	25	100
	ofloxacin	0.39 ~ 50	6.25	25
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	6.25	12.5
	ciprofloxacin	0.2 ~ >100	25	>100
	norfloxacin	0.78 ~ >100	>100	>100
	tosufloxacin	0.025 ~ 12.5	3.13	6.25
Coagulase-negative staphylococci (41)	NM394	<0.013 ~ 0.39	0.2	0.39
	ofloxacin	0.39 ~ 6.25	1.56	3.13
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.78	0.1	0.2
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	0.78
	norfloxacin	0.2 ~ 6.25	3.13	6.25
	tosufloxacin	<0.013 ~ 3.13	0.2	0.39

Table 1. Continued

Organism (No. of strain)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Range	50%	90%	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (48)	NM394	0.1 ~ 1.56	0.2	0.39	
	ofloxacin	0.2 ~ 3.13	1.56	1.56	
	sparfloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39	
	ciprofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.78	0.78	
	norfloxacin	0.39 ~ 6.25	3.13	3.13	
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (18)	NM394	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56	
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	6.25	
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.39	0.39	0.39	
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	1.56	1.56	
	norfloxacin	1.56 ~ 12.5	6.25	12.5	
	tosufloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39	
<i>Enterococcus faecalis</i> (37)	NM394	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56	
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	3.13	3.13	
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78	
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	1.56	1.56	
	norfloxacin	1.56 ~ 50	6.25	6.25	
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78	
<i>Enterococcus faecium</i> (41)	NM394	0.2 ~ 3.13	1.56	1.56	
	ofloxacin	1.56 ~ 12.5	6.25	6.25	
	sparfloxacin	0.1 ~ 6.25	0.39	0.78	
	ciprofloxacin	0.2 ~ 12.5	3.13	6.25	
	norfloxacin	1.56 ~ 25	6.25	6.25	
	tosufloxacin	0.1 ~ 3.13	1.56	3.13	
<i>Escherichia coli</i> CS2 (R ⁺) (43)	NM394	0.05 ~ 1.56	0.1	0.2	
	ofloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.78	
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.39	
	ciprofloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39	
	norfloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.78	
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (47)	NM394	< 0.013 ~ 3.13	0.05	0.1	
	ofloxacin	0.05 ~ 12.5	0.1	1.56	
	sparfloxacin	< 0.013 ~ 3.13	0.05	0.39	
	ciprofloxacin	0.025 ~ 6.25	0.1	0.39	
	norfloxacin	0.05 ~ 25	0.1	1.56	
	tosufloxacin	0.025 ~ 1.56	0.05	0.2	
<i>Proteus mirabilis</i> (48)	NM394	< 0.013 ~ 0.2	0.05	0.1	
	ofloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.2	
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39	
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.39	0.05	0.1	
	norfloxacin	0.025 ~ 0.78	0.1	0.2	
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39	
<i>Proteus vulgaris</i> (54)	NM394	< 0.013 ~ 0.1	< 0.013	0.025	
	ofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.1	0.39	
	sparfloxacin	0.05 ~ 6.25	0.2	0.78	
	ciprofloxacin	< 0.013 ~ 0.1	0.025	0.1	
	norfloxacin	0.025 ~ 0.2	0.05	0.1	
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39	
<i>Morganella morganii</i> (49)	NM394	< 0.013 ~ 0.39	0.05	0.2	
	ofloxacin	0.05 ~ 6.25	0.1	0.78	
	sparfloxacin	0.1 ~ 6.25	0.2	1.56	
	ciprofloxacin	< 0.013 ~ 1.56	0.025	0.2	
	norfloxacin	0.025 ~ 1.56	0.05	0.39	
	tosufloxacin	0.1 ~ 6.25	0.2	1.56	
<i>Providencia rettgeri</i> (45)	NM394	0.025 ~ 50	1.56	25	
	ofloxacin	0.1 ~ > 100	6.25	100	
	sparfloxacin	0.1 ~ 100	6.25	50	
	ciprofloxacin	< 0.013 ~ 50	3.13	50	
	norfloxacin	0.05 ~ > 100	12.5	> 100	
	tosufloxacin	0.05 ~ > 100	6.25	> 100	

Table 1. Continued

Organism (No. of strain)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%
<i>Citrobacter freundii</i> (50)	NM394	0.025 ~ 1.56	0.1	0.39
	ofloxacin	0.1 ~ 12.5	0.39	3.13
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	1.56
	ciprofloxacin	0.025 ~ 6.25	0.2	3.13
	norfloxacin	0.2 ~ 12.5	0.39	6.25
	tosufloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	1.56
<i>Serratia marcescens</i> (50)	NM394	0.025 ~ 6.25	0.1	1.56
	ofloxacin	0.1 ~ 12.5	0.39	6.25
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	1.56
	ciprofloxacin	0.025 ~ 12.5	0.1	1.56
	norfloxacin	0.1 ~ 50	0.2	12.5
	tosufloxacin	0.05 ~ 6.25	0.39	1.56
<i>Enterobacter cloacae</i> (50)	NM394	< 0.013 ~ 1.56	0.05	0.39
	ofloxacin	0.05 ~ 25	0.39	6.25
	sparfloxacin	0.025 ~ 25	0.1	1.56
	ciprofloxacin	0.025 ~ 25	0.2	6.25
	norfloxacin	0.05 ~ 25	0.39	12.5
	tosufloxacin	0.025 ~ 25	0.2	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [1987] (50)	NM394	0.05 ~ 25	0.2	1.56
	ofloxacin	0.78 ~ 100	3.13	25
	sparfloxacin	0.1 ~ 100	1.56	12.5
	ciprofloxacin	0.1 ~ 25	0.39	3.13
	norfloxacin	0.39 ~ 50	1.56	12.5
	tosufloxacin	0.1 ~ 25	0.39	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [1991] (32)	NM394	< 0.013 ~ 100	0.78	1.56
	ofloxacin	0.39 ~ > 100	1.56	100
	sparfloxacin	0.39 ~ > 100	3.13	12.5
	ciprofloxacin	0.05 ~ > 100	0.39	25
	norfloxacin	0.39 ~ > 100	1.56	50
	tosufloxacin	0.1 ~ > 100	0.39	25
<i>Burkholderia cepacia</i> (33)	NM394	1.56 ~ 12.5	6.25	12.5
	ofloxacin	3.13 ~ 12.5	6.25	6.25
	sparfloxacin	0.39 ~ 1.56	1.56	1.56
	ciprofloxacin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	norfloxacin	3.13 ~ 25	12.5	12.5
	tosufloxacin	0.39 ~ 6.25	3.13	3.13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (47)	NM394	0.39 ~ 12.5	1.56	6.25
	ofloxacin	0.2 ~ 3.13	1.56	3.13
	sparfloxacin	< 0.013 ~ 0.78	0.2	0.39
	ciprofloxacin	0.2 ~ 25	1.56	6.25
	norfloxacin	0.78 ~ 25	6.25	12.5
	tosufloxacin	0.05 ~ 1.56	0.39	0.78
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (41)	NM394	0.2 ~ 50	0.39	3.13
	ofloxacin	0.05 ~ 50	0.2	1.56
	sparfloxacin	< 0.013 ~ 25	0.025	0.39
	ciprofloxacin	0.05 ~ 50	0.2	1.56
	norfloxacin	0.1 ~ > 100	1.56	12.5
	tosufloxacin	< 0.013 ~ 12.5	0.1	0.39
Ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i> (10)	NM394	< 0.013 ~ 0.05	0.025	0.05
	ofloxacin	0.05	0.05	0.05
	sparfloxacin	0.025 ~ 0.05	0.05	0.05
	ciprofloxacin	< 0.013 ~ 0.025	< 0.013	< 0.013
	norfloxacin	0.05 ~ 0.1	0.05	0.1
	tosufloxacin	< 0.013 ~ 0.025	< 0.013	0.025
<i>Bacteroides fragilis</i> (38)	NM394	3.13 ~ 50	6.25	25
	ofloxacin	1.56 ~ 25	3.13	6.25
	sparfloxacin	0.78 ~ 12.5	1.56	3.13
	ciprofloxacin	3.13 ~ 25	6.25	25
	norfloxacin	12.5 ~ 100	25	50
	tosufloxacin	0.39 ~ 12.5	0.78	1.56

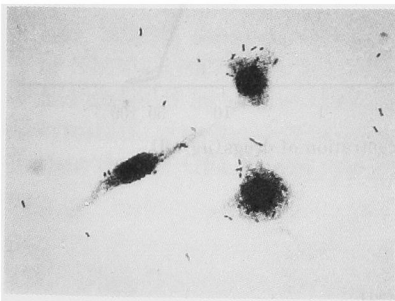
Enterococcus faecalis 37 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml で CPFX と同等, OFLX, NFLX より 2~4 倍優れていたが, SPFX, TFLX より 2 倍劣っていた。*Enterococcus faecium* 41 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml で SPFX には 2 倍劣るが, 他の薬剤より 2~4 倍優れていた。*E. coli* CS2(R⁺) 43 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.2 μ g/ml で, 他剤よりも 2~4 倍優れていた。*Klebsiella pneumoniae* 47 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.1 μ g/ml で被検薬剤中最も強く, 2~16 倍優れていた。*Proteus mirabilis* 48 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.1 μ g/ml で CPFX と同等, OFLX, NFLX の 2 倍, SPFX, TFLX の 4 倍優れた抗菌力を示した。*Proteus vulgaris* 54 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.025 μ g/ml で被検薬剤中最も優れ, 他剤より 4~32 倍強い抗菌力を示した。*Morganella morganii* 49 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.2 μ g/ml で CPFX と同等, NFLX, OFLX, SPFX, TFLX より 2~8 倍優れていた。*Providencia rettgeri* 45 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 25 μ g/ml で他の薬剤の 2~4 倍以上優れていた。*Citrobacter freundii* 50 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.39 μ g/ml で被検薬剤中最も優れ, 4~16 倍強い抗菌力を示した。*Serratia marcescens* 50 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml で SPFX, CPFX, TFLX と同等, OFLX, NFLX より 4~8 倍優れていた。*Enterobacter cloacae* 50 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.39 μ g/ml で, 他剤より 4~32 倍優れた成績だった。1987 年に分離された *Pseudomonas aeruginosa* 50 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml, また,

1991 年に分離された *P. aeruginosa* 32 株に対する NM394 の MIC₉₀ も 1.56 μ g/ml で被検薬剤中最も優れ, それぞれ他剤の 2~16 倍, 8~64 倍強い抗菌力を示した。*Burkholderia cepacia* 33 株に対する NM394 の MIC₉₀ は NFLX と同じく 12.5 μ g/ml で, OFLX, CPFX, TFLX, SPFX よりも 2~8 倍劣る成績だった。*Stenotrophomonas maltophilia* 47 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 6.25 μ g/ml で CPFX と同等, NFLX の 2 倍優れ, OFLX, TFLX, SPFX より 2~16 倍劣っていた。*Acinetobacter calcoaceticus* 41 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 3.13 μ g/ml で NFLX よりも 4 倍優れているが, OFLX, CPFX より 2 倍, SPFX, TFLX より 8 倍劣る成績だった。Ampicillin-resistant *H. influenzae* 10 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.05 μ g/ml で OFLX, SPFX と同等, NFLX より 2 倍優れ, TFLX, CPFX よりも 2~4 倍以上劣る成績だった。*B. fragilis* 38 株に対する NM394 の MIC₉₀ は 25 μ g/ml で CPFX と同等, NFLX より 2 倍優れ, OFLX, SPFX, TFLX より 4~16 倍劣っていた。

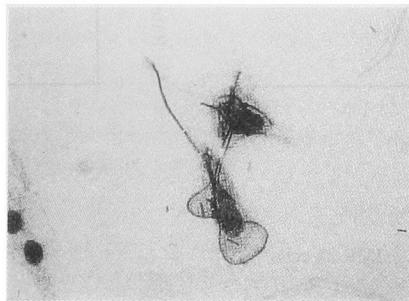
2. マウス培養マクロファージとの協力的食菌作用

E. coli NIHJ JC-2 に対する 1~1/8 MIC の NM394 存在下でのマウス培養マクロファージの食菌像を Fig. 1a~1e に示した。NM394 非存在下では培養マクロファージは生体内ほどの殺菌作用をもたないため, Fig. 1a のように細胞内で増殖した *E. coli* がマクロファージを破壊している像が観察された。1MIC (=0.013 μ g/ml) ~1/2 MIC の NM394 存在下では Fig. 1b, 1c のように薬剤の影響によってフィラメント化した *E. coli* がマク

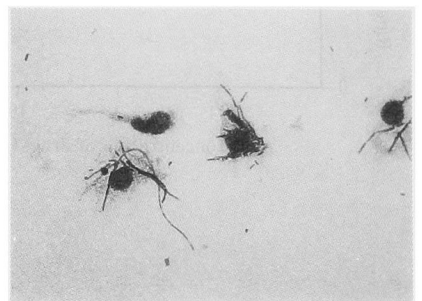
a. without drug



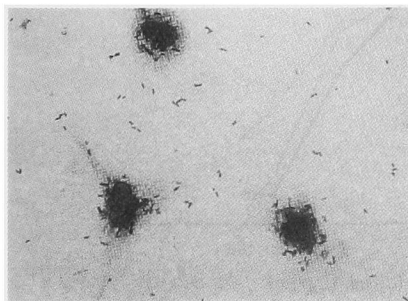
b. 1 MIC



c. 1/2 MIC



d. 1/4 MIC



e. 1/8 MIC

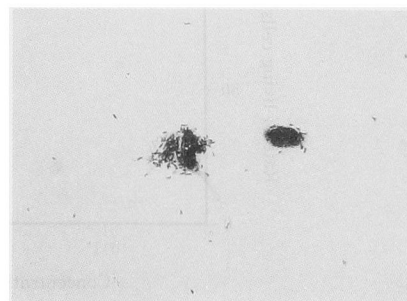


Fig. 1. Phagocytosis of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 by mouse cultured macrophage in the presence of NM394

ロファージによく食菌，消化された像がみられた。1/4 MIC 存在下では Fig. 1d のようにマクロファージの殺菌力と *E. coli* の増殖力がほぼ平行しており，1/8 MIC 存在下では Fig. 1e のように *E. coli* の増殖力が優るため，薬剤無添加時と差が認められなかった。

3. 培養動物細胞に対する増殖抑制作用の検討

種々の濃度の薬剤存在下で CHO-K1, HeLa, IMR-32 細胞を 4 日間培養したときの細胞数の変動を薬剤無添加時の細胞数を 100 として薬剤添加時の相対数を求め，Fig. 2a~2c に示した。CHO-K1 細胞に対しては Fig. 2a に示すように NM394, OFLX, SPFX とともに 10 μ g/ml 添加時までは増殖にほとんど影響を与えないが，50 μ g/ml 添加時では OFLX が薬剤無添加時の約 60% の細胞数であったのに対し，NM394 と SPFX ではそれぞれ 10%，18% に減少した。HeLa 細胞に対しては Fig. 2b に示すように，10 μ g/ml 添加時では OFLX は増殖に影響を与えないが，NM394 は約 80%，SPFX は約 65% に細胞数が減少し，50 μ g/ml 添加時では OFLX が無添加時の約 60% の細胞数であったのに対し，NM394 と SPFX は 10% 以下に減少した。IMR-32 細胞に対しては Fig. 2c に示すように，10 μ g/ml 添加時では NM394 は OFLX, SPFX と同程度であったが，50 μ g/ml 添加時では OFLX は無添加時の約 40%，NM394, SPFX は約

10%，約 15% に細胞数が減少した。

III. 考 察

NM394 はグラム陽性菌，グラム陰性菌に対し幅広く優れた抗菌力を示した。グラム陽性菌のうち MRSA を含むブドウ球菌に対し，本剤は SPFX, TFLX に 2~8 倍劣るものの，CPFEX, OFLX とほぼ同等で，NFLX よりも優れた抗菌力を示した。*S. pyogenes* に対する NM394 の MIC₅₀, MIC₉₀ は TFLX 同様他剤より 2~8 倍優れていた。*S. pneumoniae*, *E. faecalis* に対する本剤の MIC₉₀ は CPFEX と同等，OFLX, NFLX より優れ，SPFX, TFLX には劣っていた。*E. faecium* に対しては SPFX には劣るものの，他の薬剤より優れていた。グラム陰性菌に対して NM394 は他のニューキノロン剤に比べ強い抗菌力を示し，特に腸内細菌科の菌種において，被検薬剤中最も優れていた。1987 年分離の緑膿菌に対する NM394 の MIC₅₀, MIC₉₀ は被検薬剤中最も小さく，さらに耐性度が増した 1991 年分離の緑膿菌に対しても NM394 の MIC₅₀ は CPFEX, TFLX と同等，MIC₉₀ は他剤の 8~64 倍と優れていた。マウス培養マクロファージとの協力的食菌作用は，1/2 MIC 以上の本剤存在下において認められたが，これは既存のニューキノロンと比べ同等あるいは若干弱かった。培養動物細胞増殖抑制作用は最も弱いといわれる OFLX に比べ，SPFX と同様に

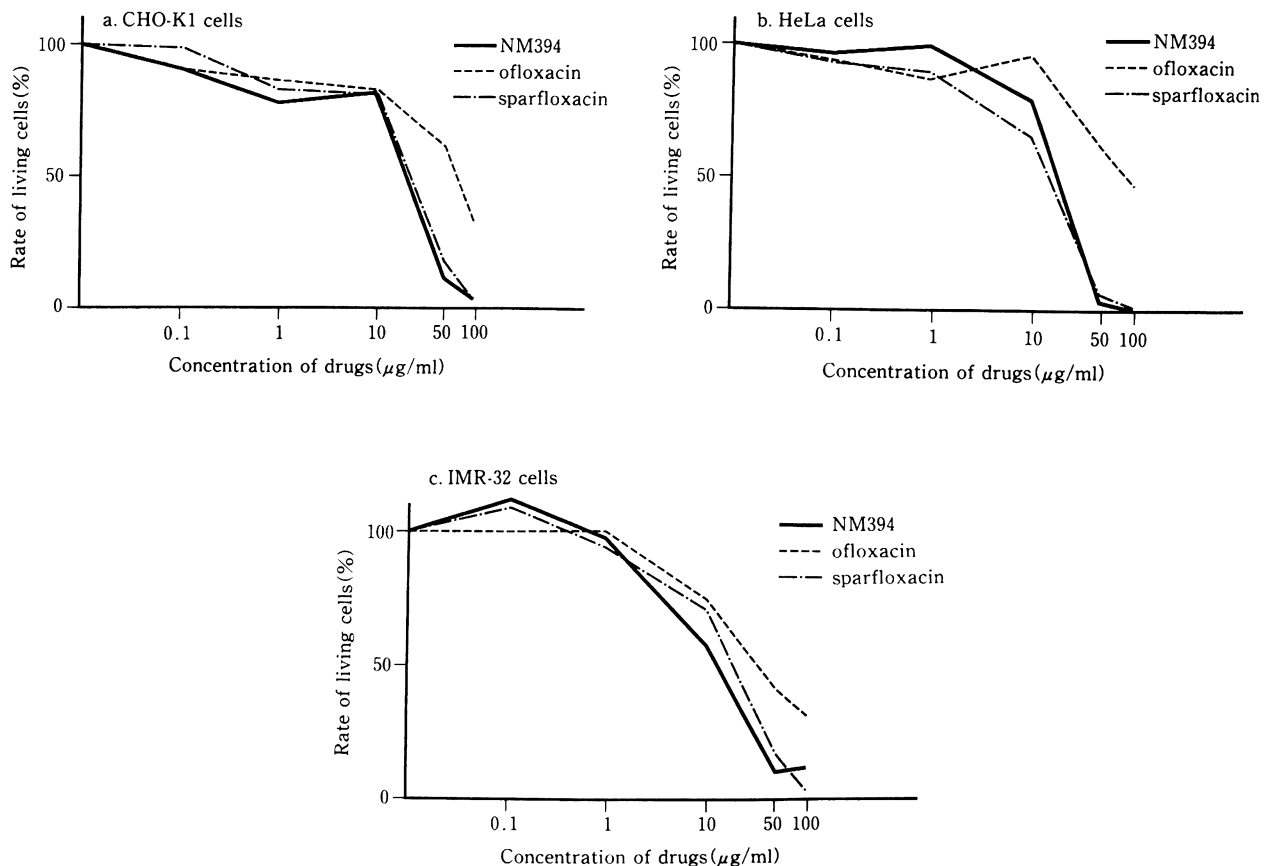


Fig. 2. Influence of NM394, ofloxacin and sparfloxacin on the growth of mammalian cultured cells

比較的強い値を示した。しかし、NM394 は低濃度で優れた抗菌力を有するため、投与量について十分な検討を行えば臨床上に高い効果が得られることが期待できる。

文 献

- 1) 名出頼男, 副島林造: 第 42 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。NM441, 名古屋, 1994
- 2) Yoshida T, Mitsuhashi S: Antibacterial activity of NM394, the active form of prodrug NM441, a new quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 793~800, 1993
- 3) Ozaki M, et al: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2490~2495, 1991
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 5) Nozawa R, Yokota T: Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of newborn hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth). *Cell Physiol* 100: 351~364, 1979
- 6) 横田 健, 神田佳代子, 新井京子: Sparfloxacin の試験管内抗菌力, 血性補体またはマウス培養マクロファージとの協力的殺菌作用, および動物細胞に対する細胞毒性。 *Chemotherapy* 39(S-4): 30~36, 1991

In vitro antibacterial activity of NM441

Kazumi Asada¹⁾, Kyoko Kuwahara¹⁾, Keiichi Hiramatsu¹⁾ and Takeshi Yokota²⁾

¹⁾Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Juntendo University

2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

²⁾Juntendo Medical College of Nursing

The *in vitro* activity of NM394, the active form of a novel oral prodrug type fluoroquinolone NM441, was compared with that of ofloxacin (OFLX), norfloxacin, ciprofloxacin, tosufloxacin, and sparfloxacin (SPFX). The MIC_{90s} of NM394 against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), high-level MRSA, coagulase-negative Staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* CS2(R⁺), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* (1987), *P. aeruginosa* (1991), *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Haemophilus influenzae*, and *Bacteroides fragilis* were 25, 1.56, 100, 0.39, 0.39, 1.56, 1.56, 1.56, 0.2, 0.1, 0.1, 0.025, 0.2, 25, 0.39, 1.56, 0.39, 1.56, 1.56, 12.5, 6.25, 3.13, 0.05, and 25 μg/ml respectively. NM394 showed a broad antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria. Against most species of *Enterobacteriaceae*, NM394 showed superior activity to the other tested quinolones. The synergistic bactericidal effect of NM394 with mouse cultured macrophages was comparatively weak; the cells of *E. coli* were engulfed and digested by mouse cultured macrophages in the presence of greater than 1/2 MIC of NM394. The cytostatic activity of NM394 against CHO-K1, HeLa and IMR-32 mammalian cultured cells was greater than that of OFLX, and was similar to that of SPFX.