

新規経口キノロン薬 NM441 の細菌学的評価

中塩 哲士^{1,3)}・岩沢 博子³⁾・須佐 千尋³⁾・金光 敬二^{2,3)}・嶋田甚五郎^{2,3)}¹⁾聖マリアンナ医科大学内科学・臨床検査医学教室*²⁾同 微生物学教室, ³⁾同 難病治療研究センター

NM441 は新規のチアゼトキノリン骨格を有するプロドラッグ型経口キノロン薬である。その抗菌活性本体 NM394 の *in vitro* 抗菌力を対照薬 (norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPFX), fleroxacin (FLRX), tosufloxacin (TFLX), sparfloxacin (SPFX)) と比較した。使用菌株は当院における臨床分離新鮮株で、グラム陽性球菌 270 株、腸内細菌科菌群 297 株、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 148 株および嫌気性菌 54 株である。

NM394 は *Streptococcus* 属, *Enterococcus* 属に対して、対照薬のうち OFLX, CPFX と同等の抗菌力を示した。*Enterococcus faecium* に対する NM394 の MIC_{90%} は 1.56 μg/ml で、検討薬中最も優れていた。しかし、本薬の *Staphylococcus* 属に対する抗菌力は LVFX, TFLX, SPFX より劣り、メチシリン感受性およびメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* に対する NM394 の MIC_{S90%} はそれぞれ 1.56, 50 μg/ml であった。腸内細菌科菌群に対する NM394 の抗菌力は良好で *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* に対しては検討薬中最も良好な抗菌力を示した。同じく *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* に対する本薬の MIC_{S90%} はそれぞれ 0.39, ≤0.05 μg/ml で、検討薬中最も良好であった。

E. coli, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* の各々 3 株ずつを用いて NM394 の postantibiotic effect (PAE) を測定した結果、それぞれ 1.4, 1.8, 1.9h を示し、対照薬 (NFLX, OFLX, CPFX) とほぼ同程度であった。Teflon sheet 表面に形成させた *P. aeruginosa* の biofilm 形成菌 (sessile cells) に対して、NM394 あるいはマクロライド薬 (erythromycin, clarithromycin) のそれぞれ単独では殺菌作用はなかったが、両系統薬の併用により相乗的殺菌作用がみられた。

Key words: NM441, キノロン薬, *in vitro* 抗菌力, postantibiotic effect, バイオフィーム

NM441 は 6-フルオロキノロン骨格の 1 位と 2 位に硫黄を含む 4 員環架橋構造としたチアゼトキノリン型の新規プロドラッグ型経口抗菌薬で、経口投与後小腸上部より吸収されて、体内では抗菌活性本体 NM394 として作用する。本薬はグラム陽性菌、腸内細菌科菌群、*Pseudomonas aeruginosa* をはじめとするブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌、および抗酸菌も含めた幅広い抗菌スペクトルを有しており、DNA gyrase を阻害して殺菌的に作用する¹⁻³⁾。今回、当院において各種の臨床材料から分離され起炎菌と推定された新鮮分離菌に対する NM394 の *in vitro* 抗菌力、postantibiotic effect (PAE) を検討した。ところで近年、ヒト体内へ挿入・留置する各種の医用材料・器材が開発され多くの臨床的有用性が認められるが、その医用器材表面に種々の細菌が付着して特有の glycocalyx を産生し、強固な biofilm を形成することが大きな問題となっている^{4,5)}。Biofilm 形成菌 (sessile cell) は各種の抗菌薬・消毒薬あるいはヒト生体防御因子に高度の抵抗性を示すことから除菌・殺菌は困難で、種々の慢性型・難治性感染症を起こす⁶⁻⁸⁾。そこで今回、医用材料として Teflon 表面に形成させた *P. aeruginosa* の biofilm に対する NM394 あるいはマクロライド薬との併用による殺菌作用の有無を検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

当院において 1993 年に各種臨床材料から分離された新鮮菌株 861 株を用いた。*Staphylococcus aureus* および *Staphylococcus epidermidis* については、methicillin (DMPPC) 感受性菌 (MIC ≤ 1.56 μg/ml) と DMPPC 耐性菌 (MIC ≥ 25 μg/ml) に分けた。

2. 使用抗菌薬

NM394 (日本新薬, 明治製薬) の他に、対照薬として norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), ofloxacin (OFLX, 第一製薬), levofloxacin (LVFX, 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品), tosufloxacin (TFLX, 富山化学), fleroxacin (FLRX, 杏林製薬), sparfloxacin (SPFX, 大日本製薬), nalidixic acid (NA, 第一製薬), マクロライド薬として erythromycin (EM, 塩野義製薬), clarithromycin (CAM, ダイナボット・大正製薬) を用いた。

3. 抗菌力測定法

日本化学療法学会標準法により最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた⁹⁻¹¹⁾。使用培地は Mueller-Hinton 培地

(BBL)を基礎培地とし、*Streptococcus* 属、*Enterococcus* 属にはヒツジ脱繊維血液（コーニング）を終濃度 10% (V/V) に、*Staphylococcus* 属には NaCl を終濃度 2% (W/V) に添加した。*Bacteroides* 属、*Clostridium difficile* の場合には GAM 寒天培地（日水）を用いた¹²⁾。

4. PAE の検討

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* および *P. aeruginosa* のそれぞれ 3 株を用い、PAE を検討した¹³⁾。被験菌 (10⁶ CFU/ml) を NM394 および対照薬とした NA, NFLX, OFLX, CPFX のそれぞれ 2 倍 MIC 濃度で 37°C、2 時間接触させた後、membrane filter (millipore, ϕ 0.23 μ m) を用いて抗菌薬を洗浄・除去した。37°Cにて振盪培養し、0, 1, 2, 3, 4 時間後に生菌数を測定した。PAE は薬剤除去後に生菌数が 1 log 増加する時間から薬剤無添加のコントロール培養で生菌数が 1 log 増加する時間を差し引いた時間 (h) とした¹⁴⁾。

5 *P. aeruginosa* sessile cells に対する NM394 とマクロライド薬の相乗的殺菌作用

Teflon sheet (1cm²) を混入した trypticase soy broth (BBL) に *P. aeruginosa* SMU9001 株を 10⁶ CFU/ml に接種し 37°Cにて 5 日間培養した。Teflon 表面に強固に付着した菌を sessile cells, 付着しないで培地中に浮遊している菌を floating cells とした。NM394, マクロライド薬 (EM, CAM) をそれぞれ単独, あるいは両系統薬を併用して各濃度に含んでいる trypticase soy broth 中に Teflon sheet を移植し, 37°Cで保温して Teflon sheet 表面の sessile cells の生菌数を経時的に測定した¹⁵⁾。

II. 成 績

1. NM394 の *in vitro* 抗菌力 (Table 1)

Streptococcus 属に対する NM394 の MIC range は 0.2~3.13 μ g/ml の範囲にあり、*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* に対する NM394 の MICs_{90%} はいずれも 1.56 μ g/ml で、OFLX, CPFX とほぼ同等の抗菌力であった。*Enterococcus* 属に対する NM394 の MIC は菌種により大きく異なった。*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium* に対する MIC range はそれぞれ 0.39~50 μ g/ml, 0.39~200 μ g/ml 以上の範囲で、MICs_{90%} はそれぞれ 50, 12.5 μ g/ml であった。これに対して、*Enterococcus faecium* に対する NM394 の MIC range は 0.39~12.5 μ g/ml で、MIC_{90%} は 1.56 μ g/ml と検討薬中最も良好な抗菌力を示した。*Staphylococcus* 属のうち methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) に対する NM394 の MIC_{90%} は 1.56 μ g/ml と良好な抗菌力を示したが、methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) に対する MIC_{90%} は 50 μ g/ml で LVFX, TFLX, SPFX より劣った。Methicillin-sensitive *S. epidermidis* (MSSE), methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE) に対する本薬の MICs_{90%} はそれぞれ 50, 25 μ g/ml で LVFX, TFLX, SPFX より劣った。

腸内細菌科菌群に対して、NM394 は検討薬中最も優れた抗菌力を示した。すなわち *E. coli*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* に対する本薬の MICs_{90%} はそれぞれ 0.1, 0.1, \leq 0.05, 0.2, \leq 0.05, \leq 0.05, 0.39 μ g/ml で、検討薬中最も良好な抗菌力を示した。この他、*Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* に対する本薬の MICs_{90%} はそれぞれ 6.25, 0.78, 0.78 μ g/ml で、LVFX, TFLX, SPFX とほぼ同等の抗菌力を示した。*Serratia marcescens* に対する本薬の MIC range, MIC_{90%} はそれぞれ \leq 0.05~50 μ g/ml, 12.5 μ g/ml と比較的高い MIC 値を示したが、検討薬中では最も良好な抗菌力を示した。ブドウ糖非発酵グラム陰性菌のうち *P. aeruginosa* に対する本薬の MIC range, MIC_{90%} は \leq 0.05~12.5 μ g/ml, 0.39 μ g/ml で、検討薬中最も良好な抗菌力を示した。*Haemophilus influenzae* に対する NM394 の MIC_{90%} は 0.05 μ g/ml 以下と大変良好であった。嫌気性菌に対して NM394 は検討薬のうち中等度の抗菌力を示し、*Bacteroides fragilis*, *C. difficile* に対する MICs_{90%} はそれぞれ 3.13, 12.5 μ g/ml であった。Table 2 に検討したキノロン薬の各菌種に対する MICs_{90%} をまとめた。なお、*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* および *P. aeruginosa* の各 2 株ずつを用いて NM394 の最小殺菌濃度 (MBC) を測定し MIC 値と比較したところ、両者に 2~4 倍以内の差しかなかったことから NM394 は殺菌的に作用することが示された。

2. NM394 の PAE

E. coli, *K. pneumoniae* および *P. aeruginosa* のそれぞれ 3 株を用いて NM394 の PAE (h) を測定した結果、それぞれ 1.4, 1.8, 1.9h を示し対照薬の NA より長く、NFLX, OFLX, CPFX とほぼ同程度であった (Table 3)。

3. *P. aeruginosa* sessile cells に対する NM394 とマクロライド薬の相乗的殺菌作用

Teflon 表面に形成された *P. aeruginosa* SMU9001 株の sessile cells に対する NM394 単独と、マクロライド薬 (EM, CAM) との併用時の殺菌作用を検討した (Fig. 1)。被験株の浮遊菌 (floating cells) に対する NM394, EM, CAN の MIC はそれぞれ 0.2, 200, 200 μ g/ml で、いずれの抗菌薬も単独では被験菌 sessile cells に対して全く殺菌作用はなかった。しかし、それぞれ subMIC 濃度である 0.1 μ g/ml の NM394 と、50 μ g/ml の EM あるいは CAM を併用した場合に相乗的殺菌作用がみられた。

III. 考 察

臨床分離株多数を用いた今回の検討で、NM394 は対照としたキノロン系薬と同等またはより優れた *in vitro* 抗菌力を示した。特に腸内細菌科菌群のうち *E. coli*, *C. diversus*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morganii* に対して検討薬中最も良好な抗

Table 1. Antimicrobial activity of NM394

Species (no. of strains tested)	Agent	MIC		
		range	50%	90%
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (27)	NM394	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	norfloxacin	0.39~ 12.5	3.13	6.25
	ofloxacin	0.39~ 6.25	1.56	1.56
	levofloxacin	0.2 ~ 6.25	0.78	1.56
	ciprofloxacin	0.2 ~ 3.13	0.39	1.56
	tosufloxacin	≦0.05~ 3.13	0.39	0.78
	floxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	3.13
	sparfloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> (27)	NM394	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	norfloxacin	0.39~ 6.25	3.13	3.13
	ofloxacin	0.2 ~ 3.13	1.56	1.56
	levofloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	ciprofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.39	0.78
	tosufloxacin	0.1 ~ 1.56	0.39	0.78
	floxacin	0.2 ~ 1.56	0.78	0.78
	sparfloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
<i>Streptococcus agalactiae</i> (27)	NM394	0.2 ~ 3.13	1.56	1.56
	norfloxacin	1.56~ 25	6.25	12.5
	ofloxacin	0.39~ 6.25	1.56	3.13
	levofloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	3.13
	ciprofloxacin	0.39~ 3.13	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.1 ~ 3.13	0.39	0.78
	floxacin	0.39~ 3.13	1.56	1.56
	sparfloxacin	0.39~ 3.13	0.78	1.56
<i>Enterococcus faecalis</i> (27)	NM394	0.39~ 50	0.78	50
	norfloxacin	1.56~ 100	3.13	100
	ofloxacin	0.78~ 50	1.56	50
	levofloxacin	0.39~ 25	0.78	25
	ciprofloxacin	0.39~ 50	0.78	50
	tosufloxacin	0.1 ~ 25	0.39	25
	floxacin	3.13~ ≧200	6.25	≧200
	sparfloxacin	0.39~ 25	0.39	12.5
<i>Enterococcus avium</i> (27)	NM394	0.39~ ≧200	1.56	12.5
	norfloxacin	0.78~ ≧200	3.13	50
	ofloxacin	1.56~ 100	3.13	50
	levofloxacin	1.56~ 50	1.56	25
	ciprofloxacin	0.78~ 100	1.56	25
	tosufloxacin	0.39~ 50	1.56	25
	floxacin	3.13~ ≧200	6.25	≧200
	sparfloxacin	0.2 ~ 25	0.78	25
<i>Enterococcus faecium</i> (27)	NM394	0.39~ 12.5	0.78	1.56
	norfloxacin	0.78~ 50	3.13	6.25
	ofloxacin	0.78~ 25	3.13	12.5
	levofloxacin	0.2 ~ 25	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.1 ~ 50	1.56	3.13
	tosufloxacin	0.1 ~ 25	1.56	12.5
	floxacin	1.56~ 100	6.25	25
	sparfloxacin	0.2 ~ 25	0.39	3.13
methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) (27)	NM394	0.39~ 1.56	0.78	1.56
	norfloxacin	0.39~ 12.5	0.78	12.5
	ofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.39	0.78
	levofloxacin	0.2 ~ 0.78	0.2	0.78
	ciprofloxacin	0.1 ~ 1.56	0.78	0.78
	tosufloxacin	≦0.05~ 0.39	0.1	0.2
	floxacin	0.39~ 3.13	0.78	3.13
	sparfloxacin	≦0.05~ 0.1	≦0.05	0.1
methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (27)	NM394	0.39~ 50	0.78	50
	norfloxacin	0.39~ ≧200	1.56	≧200
	ofloxacin	0.2 ~ 25	0.39	25
	levofloxacin	0.2 ~ 12.5	0.39	12.5
	ciprofloxacin	0.39~ 100	0.78	100
	tosufloxacin	≦0.05~ 6.25	≦0.05	6.25
	floxacin	0.78~ 100	0.78	50
	sparfloxacin	≦0.05~ 6.25	≦0.05	6.25

Table 1. Continued

Species (no. of strains tested)	Agent	MIC		
		range	50%	90%
methicillin-sensitive <i>Staphylococcus epidermidis</i> (MSSE) (27)	NM394	0.1 ~ 100	0.2	50
	norfloxacin	0.2 ~ ≥ 200	0.78	50
	ofloxacin	0.2 ~ 50	0.39	50
	levofloxacin	0.1 ~ 25	0.2	12.5
	ciprofloxacin	$\leq 0.05 \sim \geq 200$	0.2	50
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.1	6.25
	fleroxacin	0.39 ~ ≥ 200	0.78	100
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 25$	0.1	6.25
methicillin-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE) (27)	NM394	$\leq 0.05 \sim 50$	0.39	25
	norfloxacin	0.2 ~ ≥ 200	1.56	100
	ofloxacin	0.2 ~ 50	0.78	50
	levofloxacin	0.1 ~ 100	0.39	12.5
	ciprofloxacin	0.1 ~ 100	0.78	50
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 12.5$	0.1	6.25
	fleroxacin	0.39 ~ ≥ 200	1.56	≥ 200
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 25$	0.1	12.5
<i>Escherichia coli</i> (27)	NM394	$\leq 0.05 \sim 1.56$	≤ 0.05	0.1
	norfloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.1	0.78
	ofloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.1	0.78
	levofloxacin	$\leq 0.05 \sim 1.56$	≤ 0.05	0.78
	ciprofloxacin	$\leq 0.05 \sim 1.56$	≤ 0.05	0.39
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	≤ 0.05	0.78
	fleroxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.1	1.56
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.1	0.39
<i>Citrobacter freundii</i> (27)	NM394	$\leq 0.05 \sim 6.25$	≤ 0.05	6.25
	norfloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.39	6.25
	ofloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.78	6.25
	levofloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.39	6.25
	ciprofloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.1	6.25
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.39	6.25
	fleroxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.78	6.25
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.78	6.25
<i>Citrobacter diversus</i> (27)	NM394	$\leq 0.05 \sim 0.2$	≤ 0.05	0.1
	norfloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
	ofloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
	levofloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
	ciprofloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.78$	≤ 0.05	0.2
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
	fleroxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	0.1	0.78
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (27)	NM394	$\leq 0.05 \sim 1.56$	≤ 0.05	0.78
	norfloxacin	0.1 ~ 6.25	0.1	3.13
	ofloxacin	0.1 ~ 6.25	0.1	1.56
	levofloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
	ciprofloxacin	$\leq 0.05 \sim 1.56$	≤ 0.05	0.78
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	≤ 0.05	0.78
	fleroxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	0.2	6.25
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 6.25$	≤ 0.05	0.78
<i>Klebsiella oxytoca</i> (27)	NM394	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
	norfloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.39$	0.1	0.1
	ofloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.1$	0.1	0.1
	levofloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.1$	≤ 0.05	≤ 0.05
	ciprofloxacin	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.1$	≤ 0.05	≤ 0.05
	fleroxacin	$\leq 0.05 \sim 0.2$	0.1	0.1
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.1$	≤ 0.05	0.1
<i>Enterobacter aerogenes</i> (27)	NM394	$\leq 0.05 \sim 0.39$	≤ 0.05	0.2
	norfloxacin	$\leq 0.05 \sim 3.13$	0.1	1.56
	ofloxacin	0.1 ~ 1.56	0.2	1.56
	levofloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.78$	0.1	0.78
	ciprofloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.78$	≤ 0.05	0.39
	tosufloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.78$	≤ 0.05	0.78
	fleroxacin	0.1 ~ 3.13	0.2	1.56
	sparfloxacin	$\leq 0.05 \sim 0.78$	≤ 0.05	0.78

Table 1. Continued

Species (no. of strains tested)	Agent	MIC			
		range		50%	90%
<i>Enterobacter cloacae</i> (27)	NM394	≤0.05~	1.56	≤0.05	0.78
	norfloxacin	≤0.05~	6.25	0.2	3.13
	ofloxacin	≤0.05~	3.13	0.2	3.13
	levofloxacin	≤0.05~	1.56	≤0.05	1.56
	ciprofloxacin	≤0.05~	1.56	≤0.05	1.56
	tosufloxacin	≤0.05~	1.56	≤0.05	1.56
	floxacin	0.1 ~	6.25	0.2	6.25
	sparfloxacin	≤0.05~	0.78	0.1	0.78
<i>Proteus mirabilis</i> (27)	NM394	≤0.05~	0.1	≤0.05	≤0.05
	norfloxacin	≤0.05~	0.2	≤0.05	0.1
	ofloxacin	≤0.05~	0.39	0.1	0.2
	levofloxacin	≤0.05~	0.2	0.1	0.1
	ciprofloxacin	≤0.05~	0.2	≤0.05	≤0.05
	tosufloxacin	0.1 ~	0.2	0.2	0.2
	floxacin	0.1 ~	0.39	0.2	0.2
	sparfloxacin	≤0.05~	0.39	0.2	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> (27)	NM394	≤0.05~	0.1	≤0.05	≤0.05
	norfloxacin	≤0.05~	0.2	≤0.05	≤0.05
	ofloxacin	0.1 ~	0.78	0.1	0.39
	levofloxacin	≤0.05~	0.39	≤0.05	0.2
	ciprofloxacin	≤0.05~	0.2	≤0.05	0.1
	tosufloxacin	≤0.05~	0.78	0.1	0.39
	floxacin	0.1 ~	0.78	0.2	0.39
	sparfloxacin	≤0.05~	1.56	0.1	0.78
<i>Morganella morganii</i> (27)	NM394	≤0.05~	0.78	≤0.05	0.39
	norfloxacin	≤0.05~	3.13	≤0.05	0.78
	ofloxacin	≤0.05~	1.56	0.1	0.78
	levofloxacin	≤0.05~	0.78	0.1	0.39
	ciprofloxacin	≤0.05~	0.78	≤0.05	0.39
	tosufloxacin	≤0.05~	0.39	0.1	0.39
	floxacin	≤0.05~	6.25	0.1	0.39
	sparfloxacin	≤0.05~	0.39	0.2	0.39
<i>Serratia marcescens</i> (27)	NM394	≤0.05~	50	1.56	12.5
	norfloxacin	≤0.05~	100	6.25	50
	ofloxacin	0.1 ~	50	3.13	25
	levofloxacin	0.1 ~	25	1.56	12.5
	ciprofloxacin	0.1 ~	50	0.78	25
	tosufloxacin	≤0.05~	50	1.56	50
	floxacin	0.1 ~	100	3.13	25
	sparfloxacin	≤0.05~	50	1.56	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (40)	NM394	≤0.05~	12.5	0.2	0.39
	norfloxacin	≤0.05~	100	0.78	1.56
	ofloxacin	0.1 ~	50	1.56	3.13
	levofloxacin	≤0.05~	50	0.78	1.56
	ciprofloxacin	≤0.05~	25	0.39	0.78
	tosufloxacin	≤0.05~	50	0.39	1.56
	floxacin	0.1 ~	50	1.56	3.13
	sparfloxacin	≤0.05~	50	0.78	3.13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (27)	NM394	0.39~	100	3.13	12.5
	norfloxacin	6.25~	≥200	12.5	100
	ofloxacin	0.39~	50	1.56	3.13
	levofloxacin	0.39~	25	0.78	6.25
	ciprofloxacin	0.39~	50	3.13	12.5
	tosufloxacin	0.1 ~	100	0.39	0.78
	floxacin	0.78~	50	1.56	3.13
	sparfloxacin	0.1 ~	12.5	0.39	0.78
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (27)	NM394	≤0.05~	25	0.1	6.25
	norfloxacin	≤0.05~	100	1.56	50
	ofloxacin	0.1 ~	50	0.2	25
	levofloxacin	≤0.05~	25	0.2	12.5
	ciprofloxacin	≤0.05~	12.5	0.2	12.5
	tosufloxacin	≤0.05~	25	0.2	12.5
	floxacin	0.1 ~	100	0.39	12.5
	sparfloxacin	≤0.05~	50	0.1	6.25

Table 1. Continued

Species (no. of strains tested)	Agent	MIC		
		range	50%	90%
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> (27)	NM394	≤0.05~ 25	6.25	12.5
	norfloxacin	0.1 ~ ≥200	25	100
	ofloxacin	0.1 ~ 100	6.25	25
	levofloxacin	0.1 ~ 50	1.56	12.5
	ciprofloxacin	≤0.05~ 50	6.25	25
	tosufloxacin	0.1 ~ ≥200	12.5	≥200
	fleroxacin	0.1 ~ 100	6.25	12.5
	sparfloxacin	≤0.05~ 50	6.25	12.5
<i>Haemophilus influenzae</i> (27)	NM394	≤0.05~ 0.1	≤0.05	≤0.05
	norfloxacin	≤0.05~ 0.2	≤0.05	0.1
	ofloxacin	≤0.05~ 0.1	≤0.05	≤0.05
	levofloxacin	≤0.05	≤0.05	≤0.05
	ciprofloxacin	≤0.05	≤0.05	≤0.05
	tosufloxacin	≤0.05	≤0.05	≤0.05
	fleroxacin	≤0.05~ 0.1	≤0.05	≤0.05
	sparfloxacin	≤0.05~ 0.1	≤0.05	≤0.05
<i>Bacteroides fragilis</i> (27)	NM394	0.2 ~ 3.13	0.78	3.13
	norfloxacin	6.25~ ≥200	25	100
	ofloxacin	1.56~ 12.5	3.13	6.25
	levofloxacin	0.39~ 12.5	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.78~ 12.5	3.13	6.25
	tosufloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	3.13
	fleroxacin	0.39~ 12.5	1.56	6.25
	sparfloxacin	≤0.05~ 1.56	0.78	0.78
<i>Clostridium difficile</i> (27)	NM394	0.78~ 25	3.13	12.5
	norfloxacin	12.5 ~ ≥200	100	≥200
	ofloxacin	1.56~ 50	6.25	12.5
	levofloxacin	0.78~ 25	3.13	6.25
	ciprofloxacin	1.56~ 50	6.25	25
	tosufloxacin	0.39~ 12.5	1.56	3.13
	fleroxacin	3.13~ 100	12.5	25
	sparfloxacin	1.56~ 25	3.13	6.25

Table 2. Summary of antimicrobial activity of NM394

		Species against which MIC _{90%} is			
		≤0.1	0.2~6.25	12.5~50	≥100
			<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1.56)		
			<i>Streptococcus pyogenes</i> (1.56)		
			<i>Streptococcus agalactiae</i> (1.56)		
			<i>Enterococcus faecium</i> (1.56)	<i>Enterococcus faecalis</i> (50)	
				<i>Enterococcus avium</i> (12.5)	
			MSSA ^{b)} (1.56)	MRSA ^{c)} (50)	
				MSSE ^{d)} (50)	
				MRSE ^{e)} (25)	
<i>Escherichia coli</i>	(0.1) ^{a)}				
<i>Citrobacter diversus</i>	(0.1)	<i>Citrobacter freundii</i>	(6.25)		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	(≤0.05)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(0.78)		
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	(0.2)		
		<i>Enterobacter cloacae</i>	(0.78)		
<i>Proteus mirabilis</i>	(≤0.05)	<i>Morganella morganii</i>	(0.39)	<i>Serratia marcescens</i>	(12.5)
<i>Proteus vulgaris</i>	(≤0.05)				
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(0.39)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(12.5)
<i>Haemophilus influenzae</i>	(≤0.05)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(6.25)	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	(12.5)
		<i>Bacteroides fragilis</i>	(3.13)	<i>Clostridium difficile</i>	(12.5)

^{a)} No. in parenthesis indicates MIC_{90%} (μg/ml)^{b)} MSSA: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*^{c)} MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*^{d)} MSSE: methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*^{e)} MRSE: methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*

Table 3. Postantibiotic effect (PAE) of NM394 and other quinolones

Organism		PAE (h)				
		NM394	nalidixic acid	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Escherichia coli</i>	SMU 1001	1.5	0.3	1.1	2.0	1.7
	SMU 1002	1.2	0.3	1.9	2.1	2.1
	SMU 1003	1.5	0.2	1.5	1.6	1.6
	Average	1.4	0.3	1.5	1.9	1.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SMU 3001	1.7	0.3	1.5	1.9	2.4
	SMU 3002	2.0	0.3	1.6	2.0	2.1
	SMU 3003	1.8	0.3	1.6	2.2	2.6
	Average	1.8	0.3	1.6	2.0	2.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SMU 9001	1.8	0.1	2.4	1.8	2.1
	SMU 9002	2.2	0.1	3.0	1.8	2.8
	SMU 9003	1.8	0.1	3.0	2.1	3.6
	Average	1.9	0.1	2.8	1.9	2.8

Each strain (10^6 CFU/ml) was incubated for 2h in Mueller-Hinton broth at the concentration of 2MIC of each agent tested.

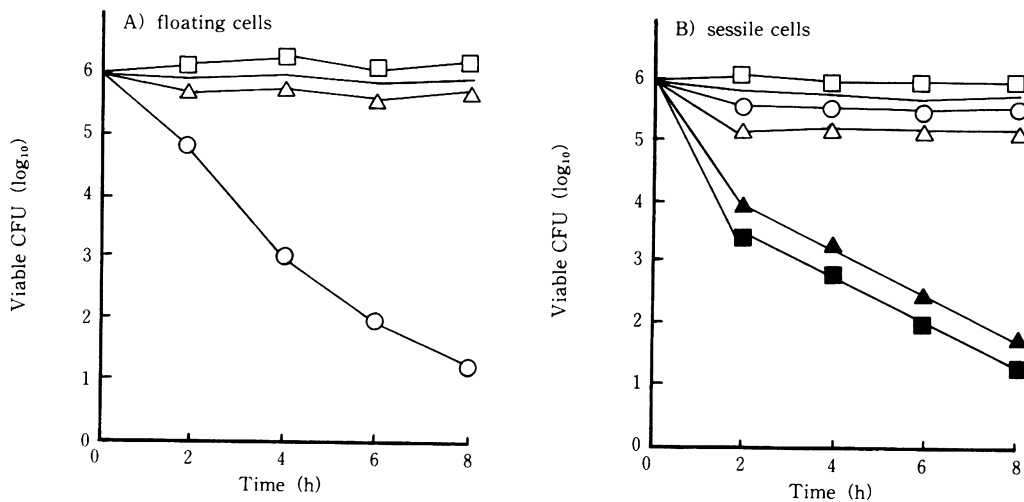


Fig. 1. Synergistic Bactericidal Activity of NM394 Combined with sub MICs of Macrolides against the Sessile Cells of *Pseudomonas aeruginosa* SMU 9001
MIC against the strain tested: 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for NM394, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for erythromycin or clarithromycin respectively
—: control, ○—○: NM394 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, △—△: erythromycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, □—□: clarithromycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
▲—▲: NM394 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and erythromycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ■—■: NM394 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and clarithromycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

菌力を示した。また、有効な抗菌薬が限定されている *P. aeruginosa* に対して NM394 の MIC_{90%} は 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と、検討薬中最も優れた抗菌力を示した。

また、PAE は他のキノロン系薬とほぼ同程度に認められた。

Biofilm 形成菌 (sessile cells) による感染症として *Streptococcus* 属菌による亜急性細菌性心内膜炎, *S. aureus* による慢性骨髄炎, *P. aeruginosa* (特にムコイド型) の関与が強く疑われるびまん性汎細気管支炎, 腎・尿路系の感染結石があげられ, この他にカテーテル・チューブ等の体内へ挿入・留置する医用器材に粘着して長時間にわたり安定した生息圏を形成し持続的な感染源となることが臨床で大きな問題となっている^{6,8)}。今回, 実験的に Teflon 表面に形成された *P. aeruginosa* の sessile cells に対し, NM394 およびマクロライド薬 (EM,

CAM) の subMIC 濃度で併用した場合に相乗的殺菌作用がみられることを明らかにした。この作用機作は不明であるが, マクロライド薬により NM394 が sessile cell 内へ透過し易くなり殺菌作用を示したものと考えられた^{16,17)}。各種の biofilm 感染症に対して, 本薬とマクロライド薬併用療法が臨床的に有効かどうかの検討が今後望まれる。

文 献

- 1) Ozaki M, et al: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2490~2495, 1991
- 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) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇: 新キノロン系薬剤

- NM394 の抗マイコバクテリア活性。結核 68 : 517~520, 1993
- 4) Costerton J W : Bacterial biofilm in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 41 : 435~464, 1987
- 5) Dickinson G M, Bisno A L : Infections associated with indwelling devices. *Concepts of pathogenesis. Antimicrob Agents Chemother* 33 : 597~601, 1989
- 6) 小林宏行 : 細菌バイオフィーム。感染症 21 : 161~172, 1991
- 7) 公文裕己 : Biofilm 感染症—総論。化学療法の領域 10 : 1477~1485, 1994
- 8) 中塩哲士 : 医用器材への細菌付着とバイオフィーム。感染症 24 : 226~231, 1994
- 9) 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
- 10) 日本化学療法学会 : 微量液体希釈法による MIC 測定法 (微量液体希釈法)。Chemotherapy 38 : 102~105, 1990
- 11) 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
- 12) 中塩哲士, 須佐千尋, 岩沢博子, 堀 誠治, 嶋田甚五郎 : 新規ペネム系抗菌薬 SY5555 の各種臨床分離新鮮株に対する抗菌力の検討。Chemotherapy 42(S-1) : 656~663, 1994
- 13) 戸塚恭一, 柴田雄介, 菊池 賢, 片平潤一, 清水喜八郎 : Cefozopran の *in vitro* postantibiotic effect に関する検討。Chemotherapy 41(S-4) : 524~526, 1993
- 14) Nakashio S, Hori S, Shimada J : Antimicrobial activities of ciprofloxacin and 6 other new quinolones *in vitro* against recent clinical pathogens. *Drugs* 45 (S-3) : 157~158, 1993
- 15) 中塩哲士, 須佐千尋, 邱 世林, 木島あゆみ, 岩沢博子, 下村晴信, 金光敬二, 堀 誠治, 嶋田甚五郎 : Clarithromycin の *in vitro* 抗菌力と細菌の粘着抑制作用に関する研究。Jap J Antibiotics 46 : 428~436, 1993
- 16) Hoyle B D, Alcantara J, Costerton J W : *Pseudomonas aeruginosa* biofilms as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 36 : 2054~2056, 1992
- 17) Anwar H, DasGupta M K, Costerton J W : Testing the susceptibility of bacteria in biofilm to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 34 : 2043~2046, 1990

Antimicrobial evaluation of new oral quinolone NM441 against the clinical isolates and the sessile cells of *Pseudomonas aeruginosa*

Satoshi Nakashio^{1,3)}, Hiroko Iwasawa³⁾, Chihiro Susa³⁾,
Keiji Kanemitsu^{2,3)} and Jingoro Shimada^{2,3)}

¹⁾Department of Internal Medicine and Laboratory Medicine, St. Marianna University School of Medicine
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216, Japan

²⁾Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine

³⁾Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine

The antimicrobial activity of NM394, the active form of the oral quinolone NM441, was compared to that of seven other quinolones (norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPFX), fleroxacin (FLRX), tosufloxacin (TFLX), sparfloxacin (SPFX)). The susceptibility testing by agar dilution method was carried out in 297 strains of *Enterobacteriaceae*, 148 strains of glucose non-fermentative gram-negative rods, 270 strains of gram-positive cocci and 54 strains of anaerobes.

NM394 showed an almost equivalent activity to OFLX or CPFX against strains of streptococci and *Enterococcus* spp. NM394 showed the highest activity against *Enterococcus faecium* and the MIC_{90%} was 1.56 µg/ml. NM394, however, showed lesser activity than LVFX, TFLX or SPFX against strains of staphylococci. The MICs_{90%} against methicillin-sensitive or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were 1.56 or 50 µg/ml, respectively. Against strains of *Enterobacteriaceae*, NM394 showed superior or equivalent activity to the reference quinolones and showed the highest activity against strains of *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. NM394 also showed the highest activity against strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Haemophilus influenzae* and the MICs_{90%} were 0.39 and ≤0.05 µg/ml, respectively.

The *in vitro* postantibiotic effect (PAE) of NM394 was evaluated. When strains of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* or *P. aeruginosa* were exposed to NM394 at 2 MICs for 2hrs, the duration of PAE was 1.4, 1.8 and 1.9hrs, respectively, and NM394 tended to show an equivalent duration of PAE to NFLX, OFLX and CPFX.

Although NM394 alone had no bactericidal activity against the sessile cells of the *P. aeruginosa* strain formed on the Teflon sheet, NM394 showed synergistic bactericidal activity when combined with subMIC of erythromycin or clarithromycin.