

合成化学療法剤 NM441 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力

西野 武志・富井 由文・芝田 和夫・川井 真好・汐月 紀子・大槻 雅子
京都薬科大学微生物学教室*

NM441 は新しいプロドラッグ型キノロン系合成抗菌薬で、本薬は経口投与後、吸収され代謝を受けて活性本体の NM394 となる。今回、NM441 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について、ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), enoxacin (ENX) および tosufloxacin (TFLX) を比較薬として検討し、以下の結果を得た。

NM394 は教室保存の標準株であるグラム陽性菌、陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。NM394 は臨床分離のグラム陽性菌、陰性菌に対して CPFX と同等ないし 1/2 の抗菌力を示した。また、OFLX との比較では、NM394 の抗菌力はグラム陽性菌に対して OFLX と同等、*Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対して OFLX の 2~8 倍強かった。NM394 の抗菌力は培地、血清添加および接種菌量の影響を受けなかったが、pH5.5 における NM394 の *Escherichia coli* および *P. aeruginosa* に対する MIC 値は pH7.0 の場合と比較し 4~16 倍上昇した。NM394 は *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Serratia marcescens* および *P. aeruginosa* に対して濃度依存的な殺菌作用を示し、検討した薬物の中で最も優れた殺菌作用を示した。NM394 の *S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa* に対する菌体内蓄積量は OFLX および CPFX より高かった。NM394 を作用させた *E. coli* および *S. marcescens* の形態観察では菌体の伸長化および溶菌が認められた。また、*P. aeruginosa* では菌体の膨化および溶菌が観察された。NM441 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌によるマウス全身感染症に対して OFLX, CPFX および ENX と比較し最も優れた感染防御効果を示した。

Key words: 合成化学療法剤, NM441, *in vitro* 抗菌力, *in vivo* 抗菌力, 菌体内移行

NM441 は日本新薬株式会社で創製された新しい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、生体内では NM394 として抗菌活性を示す。

NM441 は化学名を (±)-6-fluoro-1-methyl-7-[4-(5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methyl-1-piperazinyl]-4-oxo-4 H-[1,3]thiazeto[3,2-a]quinoline-3-carboxylic acid といい、化学式 $C_{21}H_{20}FN_3O_5S$ 、分子量 461.47 の白色ないし淡黄色の結晶性の粉末である。また、NM441 の活性本体である NM394 は化学名を (±)-6-fluoro-1-methyl-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-4 H-[1,3]thiazeto[3,2-a]quinoline-3-carboxylic acid といい、分子式 $C_{16}H_{16}FN_3O_5S$ 、分子量 349.39 の白色ないし淡黄色の結晶性の粉末である。NM441 および NM394 は quinoline 骨格の 1 位と 2 位をイオウを含む 4 員環構造とした thiazeto quinoline 骨格を有する特徴的な化学構造を有している。

今回、我々は NM441 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について、ofloxacin (OFLX)¹⁾, ciprofloxacin (CPFX)²⁾, enoxacin (ENX)³⁾ および tosufloxacin (TFLX)⁴⁾ を比較薬として種々の細菌学的検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

教室保存のグラム陽性菌 16 株、グラム陰性菌 35 株、嫌気性菌 11 株および臨床材料から分離された *Staphylo-*

coccus aureus 37 株、methicillin 耐性 *S. aureus* 38 株、*Staphylococcus epidermidis* 35 株、*Streptococcus pyogenes* 34 株、*Streptococcus pneumoniae* 31 株、*Enterococcus faecalis* 40 株、*Enterococcus faecium* 30 株、*Enterococcus avium* 14 株、*Escherichia coli* 43 株、*Citrobacter freundii* 34 株、*Enterobacter cloacae* 42 株、*Enterobacter aerogenes* 43 株、*Klebsiella pneumoniae* 43 株、*Proteus mirabilis* 43 株、*Proteus vulgaris* 43 株、*Morganella morganii* 43 株、*Providencia rettgeri* 43 株、*Serratia marcescens* 43 株、*Pseudomonas aeruginosa* 42 株、*Acinetobacter calcoaceticus* 40 株、*Haemophilus influenzae* 48 株、*Moraxella catarrhalis* 10 株を使用した。

2. 使用薬物

NM441 および NM394 は日本新薬株式会社で合成されたものを用い、*in vitro* の試験には NM394 を、*in vivo* の試験には NM441 を使用した。また、比較薬として OFLX (第一製薬)、CPFX (バイエル薬品)、ENX (大日本製薬) および TFLX (富山化学工業) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

3. 感受性測定法

薬剤感受性測定にあたっては、前培養に Trypto-soya broth (TSB, 日水製薬)、感受性測定用培地に Heart

infusion agar (HIA, 日水製薬) を用いて日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法⁵⁾ に準じて、接種菌量を 10^6 CFU/ml として、 37°C 、20 時間培養後の MIC ($\mu\text{g/ml}$) を求めた。ただし、*Streptococcus* 属および *Corynebacterium diphtheriae* には 10% 脱繊維馬血液を添加した HIA を、*H. influenzae* には 5% Bacto Fildes enrichment (Difco) を添加した HIA を、さらに *M. catarrhalis* には 10% 脱繊維馬血液加 HIA をチョコレート寒天培地として用いた。また、*Neisseria* 属については 10% 脱繊維馬血液を添加したチョコレート寒天培地を測定用培地とし、 37°C で 48 時間ローソク培養後の MIC を求めた。嫌気性菌については前培養に GAM broth (日水製薬)、測定用に GAM agar (日水製薬) を用いて日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法⁶⁾ に準じて行った。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地の種類、培地 pH、馬血清添加および接種菌量の影響について、*S. aureus* Smith, *E. coli* KC-14 および *P. aeruginosa* E-2 を試験菌として、寒天平板希釈法により検討した。検討にあたっては、接種菌量の影響以外は接種菌量を 10^6 CFU/ml として、 37°C 、20 時間培養後の MIC を求めた。

培地の影響の検討には、測定培地として HIA, Sensitivity disk agar (SDA, 栄研化学), Trypto-soya agar (TSA, 日水製薬) および Nutrient agar (NA, 日水製薬) を使用した。

培地 pH の影響の検討には、測定培地として pH5.5, 7.0 および 8.5 に調整した HIA を用いた。

血清添加の影響の検討には、測定培地として非働化馬血清を 0, 10, 25 および 50% になるように添加した HIA を使用した。

接種菌量の影響については、接種菌量を約 10^5 , 10^6 , 10^7 および 10^8 として検討した。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

TSB で一夜培養した *S. aureus* Smith, *E. coli* KC-14, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 を Heart infusion broth (HIB, 日水製薬) に接種し、さらに振盪培養を続け、対数期中期となった時点で各薬剤を添加した。以後、経時的に菌液を採取し、生菌数を測定した。

6. 菌体内蓄積

Antibiotic medium 3 (Difco) で対数期後期まで増殖させた *S. aureus* FDA 209P JC-1, *E. coli* K-12 W3110 および *P. aeruginosa* PAO1 を集菌し、*S. aureus* および *E. coli* については 10mM glucose 加 50mM potassium phosphate buffer (pH7.0) で、*P. aeruginosa* については 200mM glucose 加 50mM potassium phosphate buffer (pH7.0) で洗浄後、それぞれ同じ buffer に再懸濁した。各薬物を最終濃度 $40\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、薬物

添加直後、10 および 30 分後に、Chapman ら⁷⁾ の方法に準じて蛍光測定法により、乾燥菌体重量あたりの菌体内薬物濃度を測定した。なお、各時間における菌体内薬物濃度はそれぞれ薬物添加直後の値を差し引いて求めた。

7. 形態変化の観察

E. coli KC-14, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 に薬物を作用させたときの形態変化を位相差顕微鏡 (日本光学) により観察した。

スライドガラス上に作製した薬物を含む HIA の薄層寒天上に、対数期途中の菌液を塗布したカバーガラスをのせ、パラフィンで封入し薬物と菌を接触させた。試料を 37°C 恒温器に移し培養を続け、一定時間ごとに位相差顕微鏡で観察した。

8. マウス実験的全身感染症

S. pyogenes C-203 および *S. pneumoniae* Type III については 10% 馬血清加 HIB を用いて 37°C 、18~20 時間培養した菌液を HIB で希釈し接種用菌液とした。他の菌株については Nutrient broth (NB, 日水製薬) で 37°C 、18 時間培養した後、同培地で適宜希釈し、6% gastric mucin (Nutritional Biochemicals Corporation) と等量混合し接種用菌液とした。上記により調製した接種用菌液を 1 群 10 匹の ddY 系、雄マウス ($18\pm 1\text{g}$) に腹腔内接種することにより全身感染症を惹起させ、2 時間後に各薬剤を 1 回経口投与した。なお、NM441 については 0.5% hydroxypropyl cellulose (HPC-SL, 日本曹達), OFLX および ENX については 0.5% carboxy methylcellulose (CMC, 和光純薬) を用いて懸濁化し、CPFEX については滅菌精製水で溶解して投与した。感染防御効果の判定にあたっては菌接種 5~6 日後の生存率から Probit 法により半数の動物を生存せしめる用量 (ED_{50} : mg/kg) を算出し、効果の指標とした。なお、NM441 の用量は NM394 換算量とした。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

教室保存のグラム陽性菌、グラム陰性菌および嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌力について検討した結果を、Table 1~3 に示した。NM394 はグラム陽性菌 7 菌種 16 菌株に対して $0.10\sim 1.56\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し、TFLX より劣ったが、ENX より優れ、CPFEX および OFLX とほぼ同等の抗菌力を示した。グラム陰性菌 22 菌種 35 菌株に対しては $0.012\sim 1.56\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し、CPFEX より劣ったが、ENX より優れ、OFLX, TFLX とほぼ同等の抗菌力を示した。一方、嫌気性菌に対しては $\leq 0.006\sim > 100\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し、菌種により MIC 値に大きな差が認められた。その中で *Bacteroides* 属 5 菌種に対しては $0.78\sim > 100\mu\text{g/ml}$ であり、高い MIC 値を示す菌種があった。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

各種臨床分離株の NM394, OFLX, CPFEX, ENX お

Table 1. Antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin against gram-positive bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
	NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.10	0.39	0.10	0.78	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.20	0.39	0.20	0.78	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	0.39	0.20	0.39	0.78	0.025
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.78	0.39	0.39	0.78	0.025
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80	0.78	0.39	0.78	1.56	0.025
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	1.56	1.56	1.56	12.5	0.78
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I ^{b)}	0.39	0.78	0.39	3.13	0.10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II ^{b)}	0.20	0.78	0.39	1.56	0.10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III ^{b)}	0.39	0.78	0.39	3.13	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23 ^{b)}	0.20	0.78	0.39	3.13	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook ^{b)}	0.20	0.78	0.39	1.56	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203 ^{b)}	0.20	0.78	0.39	3.13	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i> KP-1 ^{b)}	0.39	1.56	0.78	6.25	0.39
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.10	0.05	0.012	0.20	≤ 0.006
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Toronto ^{b)}	0.10	0.10	0.05	0.39	0.05

^{a)} Inoculum size: 10^8 CFU/mlMedium: heart infusion agar, ^{b)} supplemented with 10% horse blood

Table 2. Antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin against gram-negative bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
	NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> KP-1 ^{b)}	0.025	0.025	0.012	0.10	0.025
<i>Neisseria meningitidis</i> KP-1 ^{b)}	0.025	0.05	0.025	0.10	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.05	0.10	0.012	0.20	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.025	0.025	≤ 0.006	0.10	≤ 0.006
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.025	0.05	≤ 0.006	0.10	0.025
<i>Escherichia coli</i> KC-14	0.05	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-60	0.10	0.20	0.05	0.20	0.20
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.05	0.025	0.012	0.20	0.012
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.012	0.012	≤ 0.006	0.10	≤ 0.006
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.025	0.05	≤ 0.006	0.10	0.025
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.05	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Salmonella enteritidis</i> KP-1	0.025	0.05	≤ 0.006	0.20	0.025
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.05	0.10	0.012	0.20	0.025
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.025	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Shigella flexneri</i> Komagome	0.025	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.025	0.05	≤ 0.006	0.20	0.05
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.025	0.05	≤ 0.006	0.10	0.012
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.05	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DT-S	0.05	0.05	0.025	0.20	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.025	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.10	0.10	0.025	0.39	0.05
<i>Enterobacter aerogenes</i> KP-1	0.20	0.39	0.05	0.78	0.10
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.10	0.10	0.05	0.39	0.05
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.025	0.05	≤ 0.006	0.10	0.05
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.20	0.39	0.10	0.39	0.39
<i>Serratia marcescens</i> T-55	0.39	0.20	0.10	0.39	0.20
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.20	0.05	0.10	0.20	0.20
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.10	0.10	0.025	0.20	0.20
<i>Proteus mirabilis</i> 181	0.10	0.20	0.025	0.39	0.20
<i>Morganella morganii</i> Kono	0.20	0.20	0.025	0.39	0.10
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	0.20	0.05	0.10	0.10	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	0.20	0.78	0.20	0.78	0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	0.20	0.20	0.025	0.20	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	0.39	0.78	0.20	1.56	0.39
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	1.56	0.39	0.78	3.13	0.20

^{a)} Inoculum size: 10^8 CFU/mlMedium: heart infusion agar, ^{b)} chocolate agar

Table 3. Antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin against anaerobic bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
	NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Clostridium tetani</i> KP-1	0.05	0.20	0.10	0.78	0.025
<i>Clostridium perfringens</i> KP-1	0.78	0.78	0.78	3.13	0.20
<i>Clostridium sporogenes</i> KP-1	0.10	0.20	0.10	0.78	0.012
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	6.25	1.56	3.13	12.5	0.39
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	3.13	0.78	3.13	12.5	0.20
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	50	6.25	25	25	0.78
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	12.5	12.5	12.5	12.5	0.78
<i>Bacteroides vulgatus</i> ES-14	0.78	0.20	0.78	3.13	0.20
<i>Bacteroides ovatus</i> JU-6-1	>100	50	>100	100	6.25
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> ATCC 14953	≤ 0.006	0.20	1.56	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 14952	0.39	6.25	1.56	1.56	0.10

^{a)} Inoculum size: 10^6 CFU/ml

Medium: GAM agar

よび TFLX に対する感受性分布を Table 4 に示した。結果は MIC 値の分布範囲および 50% (MIC₅₀) または 90% (MIC₉₀) の菌株の増殖を阻害した濃度として示した。S. aureus, methicillin 耐性 S. aureus および S. epidermidis に対する NM394 の MIC₉₀ 値はそれぞれ 1.56, 12.5 および 0.39 $\mu\text{g/ml}$ と、TFLX より劣ったが ENX より優れ、OFLX の 0.78, 6.25 および 0.78 $\mu\text{g/ml}$, CPFX の 1.56, 25 および 0.39 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ同等の抗菌力であった。S. pyogenes および S. pneumoniae に対する NM394 の MIC₉₀ 値はそれぞれ 0.78, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と、TFLX と比較し同等ないし劣ったが ENX より優れ、OFLX の 1.56 および 3.13 $\mu\text{g/ml}$, CPFX の 0.78 および 3.13 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ同等の抗菌力であった。E. faecalis, E. faecium および E. avium に対する NM394 の MIC₉₀ 値はそれぞれ 1.56, 3.13 および 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であり、TFLX の 0.39, 3.13 および 0.39 $\mu\text{g/ml}$ と比較し同等ないしやや劣ったが ENX より優れ、また OFLX の 3.13, 6.25 および 3.13 $\mu\text{g/ml}$ より 2 倍優れていた。一方、CPFEX の 1.56, 3.13 および 0.78 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ同等であった。E. coli, C. freundii, E. cloacae, E. aerogenes, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. vulgaris, M. morgani および S. marcescens に対する NM394 の MIC₉₀ 値は 0.05~6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、ENX の 0.39~25 $\mu\text{g/ml}$ より 2~8 倍、OFLX の 0.1~12.5 $\mu\text{g/ml}$ と比較し同等ないし 8 倍優れた抗菌力を示した。また、CPFEX の 0.05~6.25 $\mu\text{g/ml}$, TFLX の 0.05~25 $\mu\text{g/ml}$ と比較し、ほぼ同等の抗菌力を示した。P. rettgeri では NM394 の MIC₅₀ 値は 0.78 $\mu\text{g/ml}$, MIC₉₀ 値は 25 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、OFLX, CPFEX, ENX および TFLX の MIC₉₀ 値はそれぞれ 50, 50, >100 および >25 $\mu\text{g/ml}$ であり、本菌においては各薬物に対する感受性の低下が認められた。P. aeruginosa に対する NM394 の MIC₉₀ 値は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ と、CPFEX の 0.39 $\mu\text{g/ml}$ および TFLX の 0.78 $\mu\text{g/ml}$ と同等の抗菌力を示し、OFLX および ENX の 3.13 $\mu\text{g/ml}$ より優れていた。H. influenzae および M. catarr-

halis に対する NM394 の MIC₉₀ 値はそれぞれ 0.05 および 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であり、他の 4 薬物とはほぼ同等の抗菌力を示した。一方、A. calcoaceticus に対する NM394 の MIC₉₀ 値は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と、ENX の 2 倍の抗菌力を示したが、他の 3 薬物より劣った。

3 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

S. aureus Smith, E. coli KC-14 および P. aeruginosa E-2 に対する NM394 の抗菌力に及ぼす測定培地の種類、培地 pH, 馬血清添加および接種菌量の影響について検討した結果をそれぞれ Table 5~8 に示した。NM394 の抗菌力は、測定培地として HIA, SDA, TSA および NA を用いた場合ほとんど影響を受けなかった。この結果は、比較薬においても同様であった (Table 5)。培地 pH を 5.5, 7.0 および 8.5 として抗菌力に与える影響を検討した結果、NM394 の S. aureus Smith に対する抗菌力は影響を受けなかったが、比較薬の MIC 値は pH5.5 では pH7.0 の場合と比較し 2~4 倍高い値となった。一方、E. coli KC-14 および P. aeruginosa E-2 に対する NM394 の MIC 値は pH7.0 と 8.5 においては同じ値であったが、pH5.5 ではそれぞれ pH7.0 の場合の 16 および 4 倍高い値となり、比較薬と同じ傾向を示した (Table 6)。HIA に馬血清を添加した場合には、血清濃度を 50% とした場合でも NM394 の各菌株に対する MIC 値は 2 倍以内の差であった (Table 7)。また、比較薬においてもほぼ同様の結果であった。接種菌量の影響を検討した結果、接種菌量を 10^4 から 10^8 に変化させた場合、NM394 の各菌株に対する MIC 値は 2~4 倍高い値となった。この傾向は比較薬においても同様に認められた (Table 8)。

4 増殖曲線に及ぼす影響

NM394, OFLX, CPFEX および TFLX の S. aureus Smith, E. coli KC-14, S. marcescens T-55 および P. aeruginosa E-2 の増殖曲線に及ぼす影響について検討した結果を Fig. 1~4 に示した。NM394 は各菌株に対して、1/2MIC 以上の濃度で濃度依存的な殺菌作用を示

Table 4. Antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		
		Range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> (37)	NM394	0.39 ~ 3.13	0.78	1.56
	ofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.39 ~ 6.25	0.39	1.56
	enoxacin	0.78 ~ 12.5	1.56	3.13
	tosufloxacin	0.025~ 0.1	0.05	0.1
methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (38)	NM394	0.78 ~ 100	1.56	12.5
	ofloxacin	0.39 ~ 25	0.78	6.25
	ciprofloxacin	0.78 ~ 100	1.56	25
	enoxacin	1.56 ~ 100	3.13	50
	tosufloxacin	0.05 ~ > 25	0.1	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (35)	NM394	0.1 ~ 0.78	0.39	0.39
	ofloxacin	0.39 ~ 0.78	0.78	0.78
	ciprofloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39
	enoxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	1.56
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.2	0.1	0.1
<i>Streptococcus pyogenes</i> ^{b)} (34)	NM394	0.39 ~ 1.56	0.78	0.78
	ofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	0.39	0.78
	enoxacin	3.13 ~ 12.5	3.13	12.5
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.39	0.1	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ^{b)} (31)	NM394	0.39 ~ 6.25	1.56	6.25
	ofloxacin	0.2 ~ 6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 6.25	0.78	3.13
	enoxacin	3.13 ~ 25	6.25	12.5
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.39	0.39	0.39
<i>Enterococcus faecalis</i> (40)	NM394	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56
	enoxacin	3.13 ~ 25	6.25	12.5
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39
<i>Enterococcus faecium</i> (30)	NM394	0.39 ~ 12.5	1.56	3.13
	ofloxacin	0.78 ~ 12.5	3.13	6.25
	ciprofloxacin	0.2 ~ 12.5	0.78	3.13
	enoxacin	3.13 ~ 50	25	25
	tosufloxacin	0.05 ~ > 25	0.78	3.13
<i>Enterococcus avium</i> (14)	NM394	1.56	1.56	1.56
	ofloxacin	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.78	0.78	0.78
	enoxacin	6.25 ~ 12.5	6.25	12.5
	tosufloxacin	0.39	0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> (43)	NM394	0.05 ~ 0.39	0.1	0.1
	ofloxacin	0.1 ~ 0.78	0.1	0.2
	ciprofloxacin	0.025~ 0.39	0.05	0.05
	enoxacin	0.39 ~ 3.13	0.39	0.39
	tosufloxacin	0.025~ 0.39	0.05	0.1
<i>Citrobacter freundii</i> (34)	NM394	0.025~ 0.78	0.1	0.2
	ofloxacin	0.1 ~ 6.25	0.39	1.56
	ciprofloxacin	0.012~ 0.78	0.1	0.39
	enoxacin	0.1 ~ 1.56	0.39	0.78
	tosufloxacin	0.012~ 1.56	0.2	0.39
<i>Enterobacter cloacae</i> (42)	NM394	0.012~ 0.1	0.05	0.05
	ofloxacin	0.025~ 0.2	0.1	0.1
	ciprofloxacin	\leq 0.006~ 0.05	0.025	0.05
	enoxacin	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39
	tosufloxacin	0.012~ 0.05	0.025	0.05

^{a)} Inoculum size: 10^6 CFU/mlMedium: heart infusion agar, ^{b)} supplemented with 10% horse blood

Table 4. Continued

Organism (no. of strains)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}			
		Range		50%	90%
<i>Enterobacter aerogenes</i> (43)	NM394	0.012~	0.1	0.05	0.05
	ofloxacin	0.05 ~	0.2	0.1	0.2
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.1	0.05	0.05
	enoxacin	0.05 ~	0.39	0.2	0.39
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~	0.1	0.05	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (43)	NM394	0.05 ~	0.78	0.1	0.39
	ofloxacin	0.1 ~	1.56	0.2	0.78
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.39	0.1	0.39
	enoxacin	≤ 0.006 ~	3.13	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.05 ~	0.78	0.1	0.39
<i>Proteus mirabilis</i> (43)	NM394	0.1 ~	12.5	0.2	0.78
	ofloxacin	0.2 ~	25	0.2	0.78
	ciprofloxacin	0.05 ~	25	0.1	0.39
	enoxacin	0.39 ~	>100	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.1 ~	>25	0.39	0.78
<i>Proteus vulgaris</i> (43)	NM394	0.05 ~	0.39	0.1	0.2
	ofloxacin	0.1 ~	0.78	0.2	0.39
	ciprofloxacin	0.025~	0.2	0.05	0.1
	enoxacin	0.2 ~	1.56	0.39	0.78
	tosufloxacin	0.05 ~	0.39	0.1	0.2
<i>Morganella morganii</i> (43)	NM394	0.05 ~	25	0.1	0.78
	ofloxacin	0.025~	50	0.2	0.78
	ciprofloxacin	0.012~	12.5	0.05	0.39
	enoxacin	0.1 ~	>100	0.39	1.56
	tosufloxacin	0.012~	12.5	0.1	0.39
<i>Providencia rettgeri</i> (43)	NM394	0.025~	50	0.78	25
	ofloxacin	0.1 ~	100	6.25	50
	ciprofloxacin	0.025~	>100	0.78	50
	enoxacin	0.2 ~	>100	3.13	>100
	tosufloxacin	0.025~	>25	0.78	>25
<i>Serratia marcescens</i> (43)	NM394	0.1 ~	6.25	0.39	6.25
	ofloxacin	0.2 ~	12.5	1.56	12.5
	ciprofloxacin	0.1 ~	12.5	0.39	6.25
	enoxacin	0.2 ~	50	3.13	25
	tosufloxacin	0.1 ~	25	0.78	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (42)	NM394	0.2 ~	1.56	0.39	0.78
	ofloxacin	0.78 ~	6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.1 ~	1.56	0.2	0.39
	enoxacin	0.78 ~	6.25	1.56	3.13
	tosufloxacin	0.2 ~	3.13	0.39	0.78
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (40)	NM394	0.2 ~	12.5	1.56	3.13
	ofloxacin	0.1 ~	12.5	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.1 ~	12.5	0.2	0.78
	enoxacin	0.78 ~	50	3.13	6.25
	tosufloxacin	0.025~	1.56	0.1	0.2
<i>Haemophilus influenzae</i> ^{c)} (48)	NM394	0.012~	0.1	0.025	0.05
	ofloxacin	0.025~	0.39	0.025	0.05
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.05	0.012	0.025
	enoxacin	0.1 ~	0.78	0.1	0.2
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~	0.1	0.012	0.012
<i>Moraxella catarrhalis</i> ^{b)} (10)	NM394	0.1 ~	0.2	0.2	0.2
	ofloxacin	0.1 ~	0.2	0.1	0.2
	ciprofloxacin	0.05 ~	0.1	0.1	0.1
	enoxacin	0.2 ~	0.39	0.2	0.2
	tosufloxacin	0.025~	0.1	0.025	0.05

^{a)} Inoculum size : 10^8 CFU/mlMedium : heart infusion agar, ^{b)} supplemented with 10% horse blood, ^{c)} supplemented with 5% Fildes enrichment

Table 5. Influence of medium on antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin

Organism	Medium	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
		NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	HIA	0.20	0.20	0.10	0.78	0.025
	SDA	0.20	0.20	0.10	0.78	0.025
	TSA	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
	NA	0.10	0.20	0.10	0.39	0.012
<i>Escherichia coli</i> KC-14	HIA	0.025	0.05	0.012	0.20	0.025
	SDA	0.025	0.05	0.012	0.20	0.025
	TSA	0.025	0.10	0.025	0.20	0.025
	NA	0.025	0.05	0.012	0.20	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	HIA	0.20	0.78	0.20	0.78	0.20
	SDA	0.20	1.56	0.20	0.78	0.39
	TSA	0.20	1.56	0.39	1.56	0.39
	NA	0.20	0.78	0.20	0.78	0.39

^{a)} Inoculum size: 10^6 CFU/ml

HIA: heart infusion agar, SDA: sensitivity disk agar, TSA: trypto-soya agar, NA: nutrient agar

Table 6. Influence of medium pH on antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin

Organism	pH	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
		NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	5.5	0.20	0.78	0.39	1.56	0.05
	7.0	0.20	0.20	0.20	0.39	0.025
	8.5	0.20	0.20	0.20	0.39	0.025
<i>Escherichia coli</i> KC-14	5.5	0.39	0.78	0.39	1.56	0.20
	7.0	0.025	0.10	0.012	0.10	0.025
	8.5	0.025	0.10	0.012	0.10	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	5.5	0.78	6.25	1.56	6.25	0.78
	7.0	0.20	1.56	0.20	0.78	0.39
	8.5	0.20	1.56	0.20	0.78	0.39

^{a)} Inoculum size: 10^6 CFU/ml

Medium: heart infusion agar

Table 7. Influence of horse serum on antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin

Organism	Horse serum (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
		NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
	10	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
	25	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
	50	0.39	0.39	0.20	0.78	0.05
<i>Escherichia coli</i> KC-14	0	0.012	0.10	0.012	0.20	0.025
	10	0.012	0.05	0.012	0.20	0.025
	25	0.012	0.10	0.012	0.10	0.025
	50	0.025	0.20	0.012	0.20	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	0	0.20	1.56	0.20	0.78	0.39
	10	0.39	1.56	0.20	0.78	0.39
	25	0.39	1.56	0.20	0.78	0.39
	50	0.39	3.13	0.20	1.56	0.78

Inoculum size; 10^6 CFU/ml^{a)} Medium: heart infusion agar

Table 8. Influence of inoculum size on antibacterial activities of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin and tosufloxacin

Organism	Inoculum size	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}				
		NM394	ofloxacin	ciprofloxacin	enoxacin	tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	4×10^8	0.39	0.39	0.20	0.78	0.05
	4×10^7	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
	4×10^6	0.20	0.20	0.20	0.78	0.025
	4×10^5	0.20	0.20	0.10	0.39	0.012
	4×10^4	0.10	0.20	0.10	0.39	0.012
<i>Escherichia coli</i> KC-14	6×10^8	0.025	0.10	0.025	0.20	0.05
	6×10^7	0.025	0.10	0.025	0.20	0.025
	6×10^6	0.012	0.10	0.012	0.20	0.025
	6×10^5	0.012	0.05	0.012	0.10	0.025
	6×10^4	0.012	0.05	0.012	0.10	0.012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	1.7×10^8	0.78	1.56	0.39	1.56	0.39
	1.7×10^7	0.39	1.56	0.39	1.56	0.39
	1.7×10^6	0.20	1.56	0.20	0.78	0.39
	1.7×10^5	0.20	0.78	0.20	0.78	0.39
	1.7×10^4	0.20	0.78	0.20	0.78	0.20

^{a)} Medium: heart infusion agar

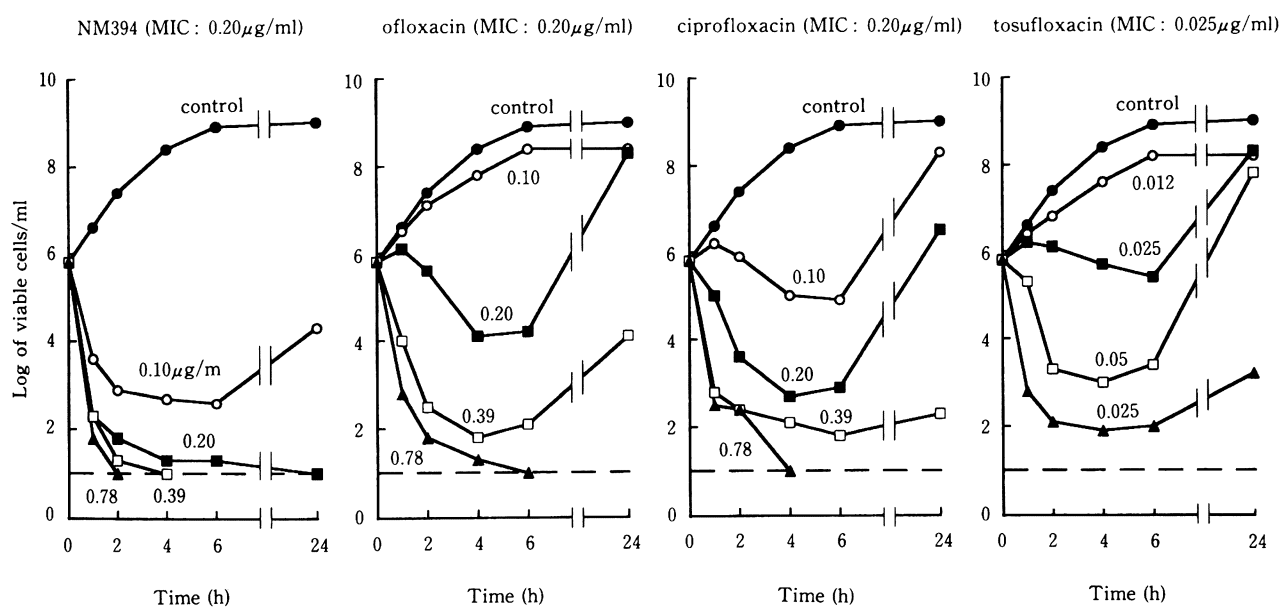


Fig. 1. Effects of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, and tosufloxacin on the viability of *Staphylococcus* Smith

した。NM394は *S. aureus* Smith, *E. coli* KC-14 および *S. marcescens* T-55 に対して、対照として用いた OFLX, CPFX および TFLX と比較し最も強い殺菌作用を示し、薬物作用 24 時間後における残存菌数も比較薬と比較し少なかった。NM394 は *P. aeruginosa* E-2 に対して、比較薬ではほとんど殺菌作用が認められなかった 1/2 および 1 MIC の濃度においても殺菌作用を示し、各濃度において比較薬より優れていた。

5. 菌体内蓄積

S. aureus FDA 209P JC-1, *E. coli* K-12 W3110 および *P. aeruginosa* PAO1 に 40 $\mu\text{g/ml}$ の NM394, OFLX および CPFX を作用させた時の 10 および 30 分後の菌

体内濃度を Table 9 に示した。*S. aureus* FDA 209P JC-1 に NM394 を作用させた 10 および 30 分後の菌体内濃度はそれぞれ 1561.9 および 1637.6 ng/mg dry cells であり、OFLX と比較しそれぞれ 2.2 および 2.5 倍、CPFX と比較し 2.4 および 2.5 倍高い値を示した。*E. coli* K-12 W3110 では、NM394 作用 10 および 30 分後の菌体内濃度は 699.3 および 820.3 ng/mg dry cells であり、OFLX と比較しそれぞれ 2.8 および 2.2 倍、CPFX と比較し 1.6 および 1.3 倍高かった。また、*P. aeruginosa* PAO1 では、NM394 作用 10 および 30 分後の菌体内濃度は 563.6 および 790.8 ng/mg dry cells となり、OFLX と比較し 22 および 18 倍以上、CPFX と比較し

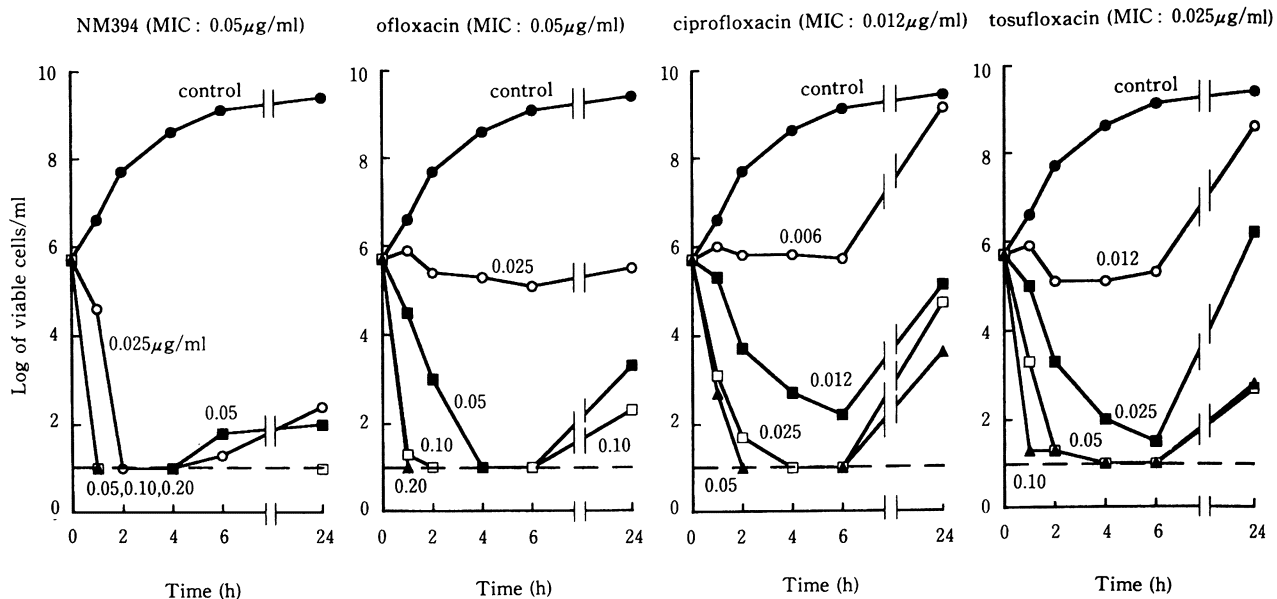


Fig. 2. Effects of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, and tosufloxacin on the viability of *Escherichia coli* KC-14

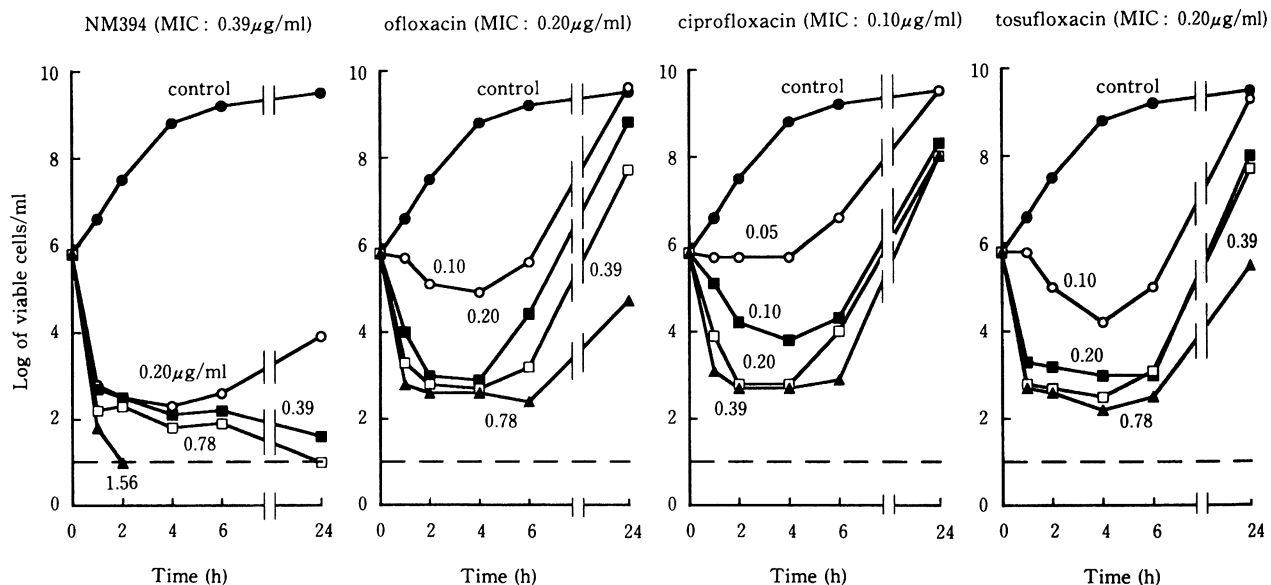


Fig. 3. Effects of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, and tosufloxacin on the viability of *Serratia marcescens* T-55

5 および 7 倍以上高い菌体内蓄積性を示した。

6. 位相差顕微鏡による形態観察

E. coli KC-14, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 の NM394 作用 3 時間後の位相差顕微鏡像を Fig. 5~7 に示した。*E. coli* KC-14 では、NM394 の 0.0015~0.025 $\mu\text{g/ml}$ 作用により菌体の伸長化が、0.006 $\mu\text{g/ml}$ 以上の作用では溶菌像が観察された。また、0.025 $\mu\text{g/ml}$ 以上の作用時にはほとんど伸長化せず溶菌した像が観察された。*S. marcescens* T-55 では、0.025 $\mu\text{g/ml}$ 以上の作用時には菌体の伸長化が、0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以上では

溶菌像が観察された。*P. aeruginosa* では、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上で菌体の膨化や溶菌像が観察され、上記の 2 菌株と異なり菌体の顕著な伸長化はいずれの濃度においても認められなかった。

7. マウス実験的感染症に対する感染防御効果

NM441 の *S. aureus* Smith, *S. pyogenes* C-203, *S. pneumoniae* Type III, *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 によるマウス全身感染症に対する感染防御効果を Table 10 に示した。NM441 は *P. aeruginosa* E-2 を含め試験

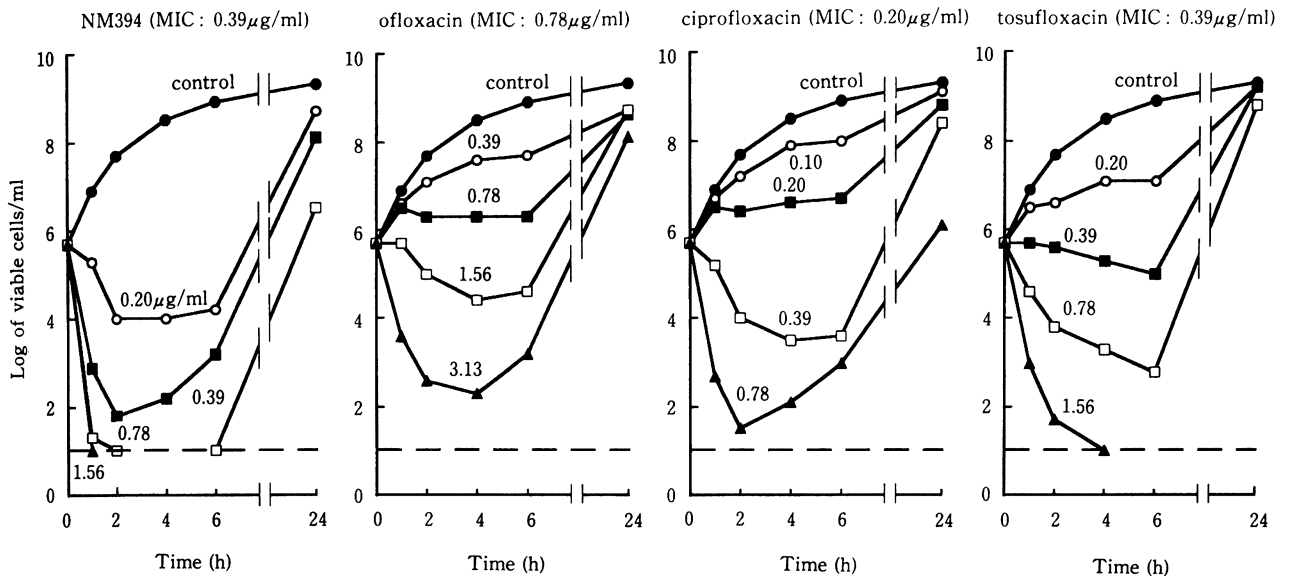


Fig. 4. Effects of NM394, ofloxacin, ciprofloxacin, and tosufloxacin on the viability of *Pseudomonas aeruginosa* E-2

Table 9. Accumulation of NM394, ofloxacin and ciprofloxacin by *Staphylococcus aureus* FDA 209P JC-1, *Escherichia coli* K-12 W3110 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration (ng/mg dry cells)	
			10min	30min
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	NM394	0.05	1561.9	1637.6
	ofloxacin	0.20	706.8	653.8
	ciprofloxacin	0.10	647.7	645.5
<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110	NM394	0.012	699.3	820.3
	ofloxacin	0.05	249.8	375.7
	ciprofloxacin	≤ 0.006	434.9	635.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NM394	0.10	563.6	790.8
	ofloxacin	0.78	25.9	43.6
	ciprofloxacin	0.10	122.8	107.4

Bacterial cells were incubated in the presence of $40\mu\text{g}$ of drug per ml.

した7菌株による全身感染症に対して、検討した薬物中最も優れた感染防御効果を示した。NM441の ED_{50} 値とOFLXの ED_{50} 値を比較すると、*S. aureus* Smithおよび*E. coli* KC-14感染に対してはほぼ同等であったが、その他の菌に対しては2~4倍以上優れていた。CPFAXとの比較では、*E. coli* KC-14にはほぼ同等であったが、その他の菌に対しては2~7倍優れた感染防御効果を示した。また、ENXとの比較では、すべての菌で3~8倍もしくはそれ以上優れた感染防御効果を示した。

III. 総括および考察

Quinoline環の2位に置換基を有するキノロン誘導体については従来よりほとんど報告されていない⁹⁾。新しいプロドラッグ型のキノロン系合成抗菌薬であるNM441およびその活性本体であるNM394はquinoline骨格の1位と2位をイオウを含む4員環構造としたthiazeto quinoline骨格を有する3環性の特徴的な化学構

造を有している。今回、NM441の*in vitro*および*in vivo*抗菌力をOFLX, CPFAX, ENXおよびTFLXを比較薬として検討した。

NM441の活性本体であるNM394は幅広い抗菌スペクトルを有しており、臨床分離株に対する MIC_{90} 値からみた抗菌力は、CPFAXと比較しグラム陽性菌、陰性菌に対して同等ないし1/2であった。OFLXと比較すると、*Staphylococcus*属では1/2、*Streptococcus*属では同等の、*Enterococcus*属、*Enterobacteriaceae*および*P. aeruginosa*には2~8倍の抗菌力を示した。また、TFLXとの比較では、グラム陽性菌に対しては劣ったが、グラム陰性菌に対しては、ほぼ同等の抗菌力を示した。

抗菌力に与える諸因子の影響を検討した結果、測定培地、血清添加および接種菌量はNM394の抗菌力にほとんど影響を与えなかった。一方、培地pHによって*S. aureus* Smithに対する抗菌力は影響を受けなかったが、

Escherichia coli KC-14 (MIC: 0.025 μ g/ml)

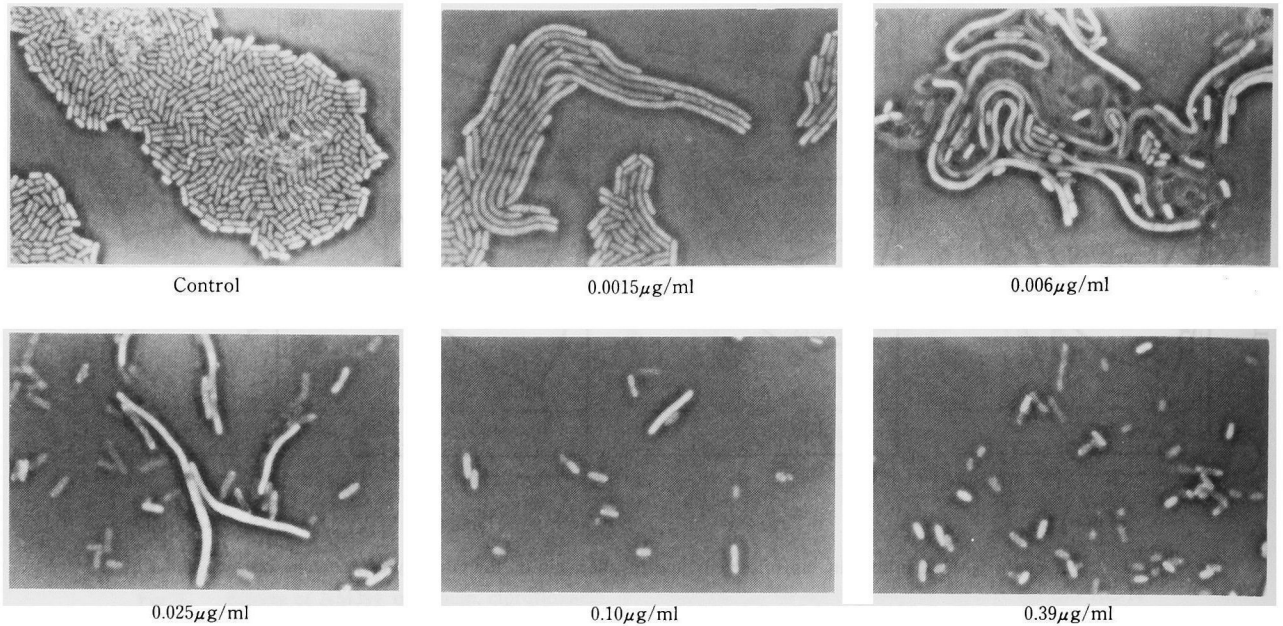


Fig. 5. Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* KC-14 exposed to NM394 for 3 hours

Serratia marcescens T-55 (MIC: 0.39 μ g/ml)

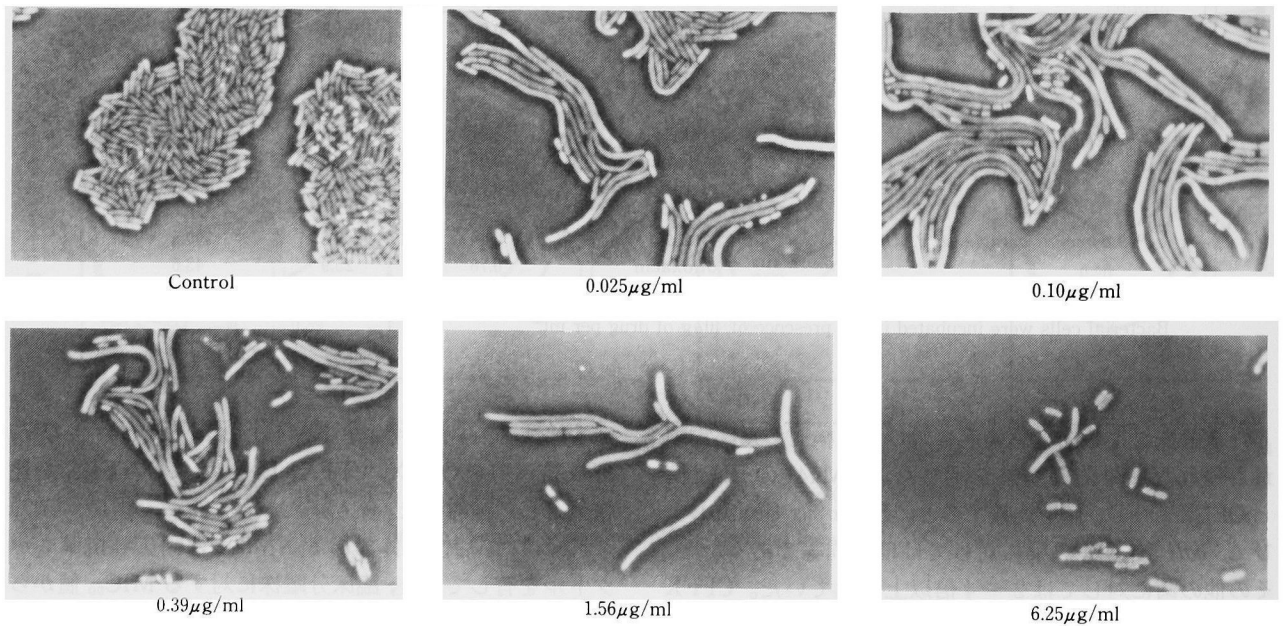


Fig. 6. Phase-contrast micrographs of *Serratia marcescens* T-55 exposed to NM394 for 3 hours

E. coli KC-14 および *P. aeruginosa* E-2 に対する抗菌力は、pH5.5 では pH7.0 と比較して抗菌力が減弱した。これらの結果は比較として用いた CPF_X, OFL_X, EN_X および TFL_X においてもほぼ同様の傾向が認められた。

S. aureus Smith, *E. coli* KC-14, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 の増殖曲線に及ぼす影響について検討した結果、NM394 ではすべての菌株に対し

て比較薬より優れた殺菌作用が認められた。すなわち、比較薬では十分な殺菌作用が認められない 1/2MIC 作用時においても NM394 は強い殺菌作用を示し、薬物作用 24 時間後の残存菌数をみても、*P. aeruginosa* 以外の菌においては、NM394 では比較薬より明らかに少なかった。

これまでにキノロン系合成抗菌薬の抗菌力と、細菌

Pseudomonas aeruginosa E-2 (MIC : 0.39 μ g/ml)

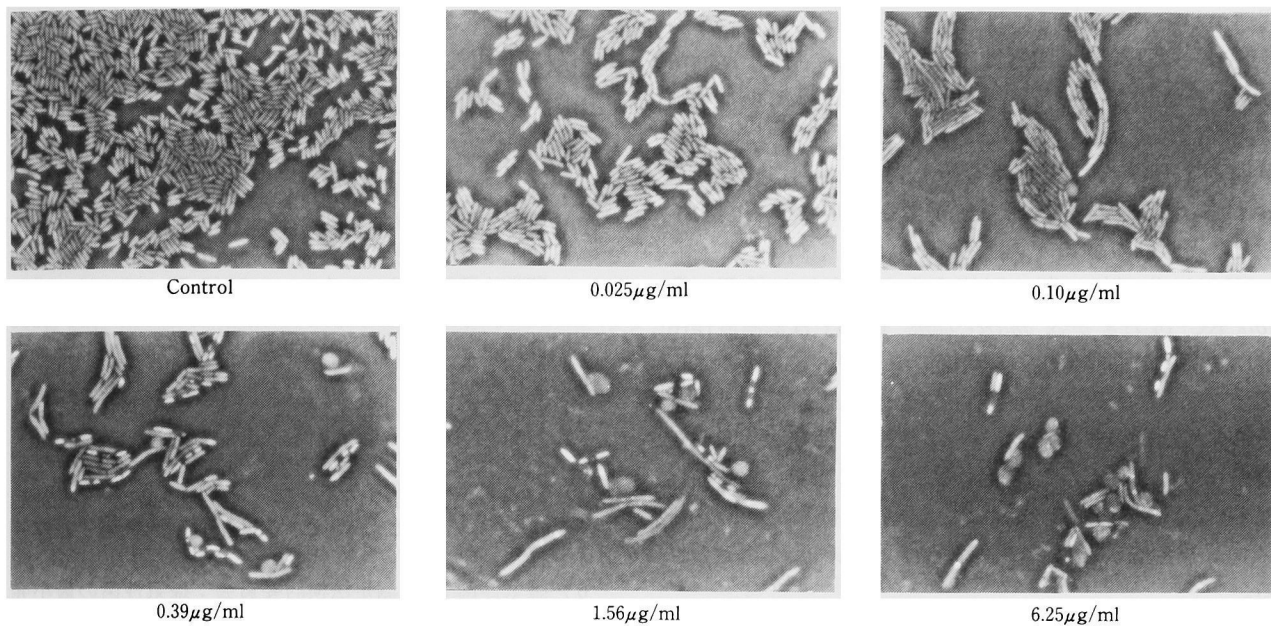


Fig. 7. Phase-contrast micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* E-2 exposed to NM394 for 3 hours

Table 10. Protective effects of NM441, ofloxacin, ciprofloxacin and enoxacin on systemic infections in mice

Organism	Challenge dose (CFU/mouse)	\times LD ₅₀	Drug	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limits)
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	2.1×10^6	184	NM441	0.20 ^{a)}	4.52(3.57~ 5.55)
			ofloxacin	0.20	5.97(4.71~ 7.33)
			ciprofloxacin	0.10	10.99(9.57~ 13.73)
			enoxacin	0.39	15.03(12.34~ 17.09)
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203 ^{b)}	1.4×10^2	312	NM441	0.20 ^{a)}	16.65(14.49~ 20.79)
			ofloxacin	0.78	70.71(55.23~ 90.53)
			ciprofloxacin	0.39	127.92(106.17~144.41)
			enoxacin	3.13	>200.00
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type III ^{b)}	2.1×10^2	5.3	NM441	0.39 ^{a)}	23.08(15.13~ 36.71)
			ofloxacin	0.78	48.81(34.36~ 74.39)
			ciprofloxacin	0.39	112.31(65.88~319.60)
			enoxacin	3.13	>200.00
<i>Escherichia coli</i> KC-14	4.3×10^4	54.9	NM441	0.05 ^{a)}	0.36(0.24~ 0.55)
			ofloxacin	0.05	0.55(0.51~ 0.60)
			ciprofloxacin	0.012	0.45(0.33~ 0.62)
			enoxacin	0.20	2.21(1.73~ 2.83)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	5.6×10^3	141	NM441	0.05 ^{a)}	0.56(0.41~ 0.76)
			ofloxacin	0.05	1.10(0.86~ 1.41)
			ciprofloxacin	0.012	1.18(0.91~ 1.54)
			enoxacin	0.20	4.04(2.95~ 5.56)
<i>Serratia marcescens</i> T-55	4.6×10^6	815	NM441	0.39 ^{a)}	1.92(1.26~ 2.98)
			ofloxacin	0.20	8.94(6.25~ 13.30)
			ciprofloxacin	0.10	5.54(3.28~ 13.55)
			enoxacin	0.39	7.57(5.06~ 11.41)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	3.9×10^6	579	NM441	0.39 ^{a)}	24.94(19.18~ 32.56)
			ofloxacin	1.56	93.00(80.06~118.97)
			ciprofloxacin	0.39	46.50(40.03~ 59.48)
			enoxacin	1.56	122.80(103.00~154.32)

Mice were infected intraperitoneally with test organism in 3% mucin. Drugs were administered orally at 2 hours after challenge.

^{a)} MIC of NM394, ^{b)} Without mucin

NM441 was administered at a dose equivalent to that of NM394. ED₅₀ values were calculated by the probit method.

DNA gyrase に対する阻害作用⁹⁾や菌体内移行性¹⁰⁾との関連が示唆されている。NM394 の菌体内蓄積は、今回比較した OFLX や CPFX より高値を示し、特に *P. aeruginosa* PAO1 においてその差が顕著であった。薬剤の菌体内移行に抵抗性の *P. aeruginosa* に対しても NM394 が他剤より優れた移行性を示したことが、本薬が *P. aeruginosa* に対して優れた抗菌力を示した一要因であると考えられる。

NM394 作用後の菌の形態変化を観察した結果、*E. coli* KC-14 および *S. marcescens* T-55 では低濃度作用時には菌体の伸長化が、作用濃度を上げることにより溶菌像が観察された。しかし、*P. aeruginosa* E-2 では菌体の伸長化は観察されず、菌体の膨化および溶菌像が観察された。このような菌種間における形態変化の多様性は OFLX や CPFX 等においても同様に観察され^{1,2)}、キノロン系合成抗菌薬に共通する作用であると考えられる。

NM441 のマウス全身感染症に対する感染防御効果は検討した薬物の中で最も優れていた。NM394 の臨床分離株に対する MIC₉₀ 値からみた *in vitro* 抗菌力は OFLX と同等ないし 8 倍以上優れ、CPFX と同等ないし 1/2 であった。一方、*in vivo* 抗菌力は、CPFX との比較では *E. coli* KC-14 感染に対しては同等であったが、他の菌においては 2～7 倍優れた感染防御効果を示し、OFLX との比較では同等ないし 4 倍以上優れていた。

以上のように、NM441 は生体内でより高い有効性を示すことが示唆された。この理由として、本薬が比較薬より優れた殺菌作用を示したこと、形態観察で認められたように低濃度域より菌の増殖に影響を及ぼしたことなどが考えられ、これらの作用と本薬の優れた菌体内移行性との関連に興味を持たれる。また、生体内作用については、宿主の生体防御能との相互作用についても検討す

る必要があると考えられる。

以上のように、優れた抗菌力を有する NM441 の臨床における有用性が期待される。

文 献

- 1) 西野武志, 田中真由美, 河端繁勝, 藪 千晶, 山中邦俊, 谷野輝雄: 新しい合成化学療法剤 DL-8280 に関する細菌学的評価。Chemotherapy 32(S-1): 62~83, 1984
- 2) 西野武志, 田中真由美, 監物英男, 谷野輝雄: 新しい合成化学療法剤 BAYo 9867 (ciprofloxacin) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 33(S-7): 39~62, 1985
- 3) 西野武志, 柏本茂樹, 中澤季美, 谷野輝雄: AT-2266 に関する細菌学的評価。Chemotherapy 32(S-3): 43~69, 1984
- 4) 西野武志, 高畑正裕, 大槻雅子: 新合成化学療法剤, T-3262 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力。Chemotherapy 36(S-9): 68~88, 1988
- 5) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 6) 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
- 7) Chapman J S, Georgopapadakou N H: Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 32: 438~442, 1988
- 8) Chu D T W, Fernandes B T: Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 33: 131~135, 1989
- 9) Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone resistant strain of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 30: 777~780, 1986
- 10) Hirai K, Aoyama H, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 29: 535~538, 1986

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of NM441

Takeshi Nishino, Yoshifumi Tomii, Kazuo Shibata,
Mako Kawai, Noriko Shiotsuki and Masako Otsuki
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

NM441 is a prodrug of a 6-fluoroquinolone antibacterial agent. When NM441 was administered orally, it was readily absorbed and metabolized to its active form, NM394. The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of NM441 were compared with those of ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), enoxacin (ENX) and tosufloxacin (TFLX). NM394 had a broad antimicrobial spectrum against gram-positive and gram-negative bacteria. The antibacterial activity of NM394 against clinical isolates of gram-positive and gram-negative bacteria was equal to or one-half that of CPFX. NM394 was as active as OFLX against gram-positive bacteria, and was 2 to 8 times more active against gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*. The activity of NM394 was not influenced by the type of medium, inoculum size or addition of serum. The MICs of NM394 against *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* at pH 5.5 were reduced 4 to 16 times in comparison with those at pH7.0. The bactericidal activity of NM394 against *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Serratia marcescens* and *P. aeruginosa* was superior to those of CPFX, OFLX and TFLX. NM394 was accumulated to higher concentrations than OFLX and CPFX in *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. In the morphological examination by the phase-contrast microscope, NM394 induced the formation of filamentous cell and lysis of *E. coli* and *S. marcescens*, and induced the formation of spherical cell and lysis of *P. aeruginosa*. The protective effect of NM441 against systemic infection caused by gram-positive and gram-negative organism in mice was superior to those of CPFX, OFLX and ENX.