

新規キノロン系抗菌薬 NM441 の細菌学的評価

富井 由文・松田 真人・炭村 展子・尾崎 正邦・黄瀬 正博

日本新薬株式会社創薬第二研究所*

新規骨格を有する新しいプロドラッグ型キノロン系合成抗菌薬 NM441 の *in vitro*, *in vivo* の抗菌活性について, norfloxacin, ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX) および tosufloxacin (TFLX) と比較した。

NM441 の活性本体である NM394 はグラム陽性菌とグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを示し, その臨床分離株に対する抗菌力はグラム陽性菌に対しては TFLX に劣るが, OFLX, CPFX とほぼ同等ないし優れ, グラム陰性菌に対しては CPFX, TFLX と同等ないし優れ, OFLX との比較では明らかに優れていた。

NM394 の抗菌力は接種菌量, 培地種類, 血清等の諸因子の影響をほとんど受けず, 酸性側の pH および 2mM の Al^{3+} の存在により抗菌力が減弱したが, その程度は他の比較薬剤と同様であった。

NM394 の作用は殺菌的であり, 比較薬剤と同様にその MIC と MBC はほぼ等しく, 増殖曲線に与える影響では被験菌に対する殺菌効果は OFLX, CPFX より強く, 短時間殺菌効果に優れ, 特にグラム陰性菌に対して 1~2 時間の短時間処理で著明な菌数の減少が認められた。

NM394 は *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* 由来の DNA gyrase 活性を強く阻害した。

NM441 はマウス実験の全身感染モデルにおいて, グラム陽性菌感染では TFLX より劣ったが, streptococci 感染で OFLX, CPFX より優れ, グラム陰性菌感染ではほとんどの菌で比較薬剤中最も低い ED₅₀ 値を示した。

50mg/kg の NM441 をマウスに投与した後の最高血清中濃度は投与後 0.25 時間後の 3.06 μ g/ml であり, 投与後 0.25~4 時間の肺および腎臓内濃度比はそれぞれ 1.3~2.1 および 2.7~5.6 と血清中濃度より高く推移した。

Key words: NM441, NM394, キノロン系抗菌薬, *in vitro* 抗菌力, *in vivo* 抗菌力

NM441 は日本新薬株式会社で合成され, 現在明治製菓株式会社と共同開発中のプロドラッグ型の新規キノロン系抗菌薬である¹⁾。本薬は小腸上部より吸収された後, 速やかに代謝され, オキシジオキソレニルメチル基が脱離した活性本体 NM394 として抗菌活性を示す²⁾。

近年, 数多くのキノロン系抗菌薬が研究, 開発され, norfloxacin (NFLX)³⁾をはじめとして, ofloxacin (OFLX)⁴⁾, ciprofloxacin (CPFX)⁵⁾ や tosufloxacin (TFLX)⁶⁾ 等が優れた抗菌力を示すことが報告され, 種々の感染症に対する治療薬として使用されている。

しかし, キノロン環の 2 位に置換基を有する誘導体についてはほとんど報告されていない⁷⁾。我々は 2 位にイオウを導入した新規誘導体の合成を試み, 1, 2 位をイオウを含む環状構造とした NM394, (\pm)-6-fluoro-1-methyl-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-4H-[1,3]thiazeto[3,2-a]quinoline-3-carboxylic acid がグラム陽性菌および緑膿菌を含むグラム陰性菌に対し, 広範囲かつ強力な抗菌力を示すことを認め⁸⁾。しかし, 本化合物は優れた抗菌力を示すにも拘らずマウスにおける感染防御効果は弱く, 経口吸収が不良であると考えられた。そこで我々は NM394 の吸収を高める検討を行った結果, NM394 のピペラジニル基の 4 位にオキシジオキソ

レニル基を導入したプロドラッグである NM441 を得た。

今回, 我々は NM394 の *in vitro* の抗菌作用および NM441 のマウス実験の全身感染モデルに対する感染防御効果を NFLX, OFLX, CPFX および TFLX と比較検討した。

I. 実験材料と方法

1. 使用薬剤

NM394, NM441 および TFLX は日本新薬株式会社で合成されたものを用い, NFLX (杏林製薬株式会社), OFLX (第一製薬株式会社) ならびに CPFX (バイエル薬品株式会社) は市販製剤より抽出精製して用いた。なお, *in vitro* の試験には NM394 を, *in vivo* の試験には NM441 を用いた。

2. 使用菌株

日本新薬株式会社創薬第二研究所保存の標準株 43 株, 嫌気性菌 10 株および明治製菓株式会社探索研究所保存の *Mycoplasma*, *Ureaplasma* 計 10 株ならびに 1986~1991 年の臨床分離グラム陽性菌 495 株, グラム陰性菌 1,034 株および *Mycoplasma* 24 株を用いた。

Methicillin (DMPPC) 耐性 *Staphylococcus aureus*

* 〒601 京都市南区西大路通八条下ル

(MRSA) は、各施設において MRSA と同定され、分与された菌株を当研究所において DMPPC に対する感受性を再測定し、DMPPC に対する MIC が $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示した株を実験に使用した。

3. 抗菌力測定法

抗菌力の測定は日本化学療法学会標準法（寒天平板希釈法）^{9,10)} に準じて行い、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。増殖用培地には感受性測定用ブイヨン (STB, ニッスイ) を使用し、streptococci には STB に非働化馬血清 (阪大微生物病研究会) を、*Haemophilus influenzae* には Bacto Fildes enrichment (Difco) をそれぞれ 5%, *Pseudomonas aeruginosa* には KNO_3 を 0.4% となるように添加し、 37°C 、20 時間培養した菌液を、STB で約 10^6 CFU/ml となるように希釈し接種菌液とした。

感受性測定用培地としては、感受性測定用寒天培地 (STA, ニッスイ) を使用したが、streptococci にはこれに脱繊維馬血液 (日本生物材料センター) を、*H. influenzae* には Bacto Fildes enrichment をそれぞれ 5% 添加した。*Neisseria gonorrhoeae* の感受性測定および増菌用培地には 5% 馬血液加 Heart infusion agar チョコレート寒天培地を用い、培養は GasPak CO_2 system (BBL) を用いた炭酸ガス培養を行い、*Moraxella catarrhalis* には Mueller Hinton II agar (MHA, BBL) を用いた。

嫌気性菌には増菌用培地として GAM ブイヨン (ニッスイ) を、感受性測定用培地としては GAM 寒天培地 (ニッスイ) を使用し、GasPak を用いて嫌气的条件下で培養した。

菌液の接種はマイクロプランター (佐久間製作所, MIT-P 型) を用いて約 $5\mu\text{l}$ を寒天表面にスポットし、MIC の判定は 37°C で 20 時間培養した後に行った。

なお、*Mycoplasma* は PPLO 寒天培地 (Difco) による寒天希釈法、*Ureaplasma* は T-broth による液体希釈法により抗菌力を測定した。*Mycoplasma pneumoniae* では 37°C 、7 日間、*Mycoplasma hominis* では 37°C 、3 日間、*Ureaplasma urealyticum* では 37°C 、24 時間培養後に判定した。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす諸因子の影響は、接種菌量、培地の種類、培地 pH および金属イオンの影響については寒天平板希釈法により、馬血清添加の影響については日本化学療法学会より示された微量液体希釈法^{11,12)} により検討した。

1) 接種菌量の影響：STA を用い、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 および 10^8 CFU/ml の菌液 $5\mu\text{l}$ を接種した。

2) 培地種類の影響：測定用培地に STA, MHA (Difco), Heart infusion agar (HIA, ニッスイ), Nutrient agar (NA, ニッスイ), Tryptosoya agar (TSA, ニッスイ) および Brain heart infusion agar (BHIA, ニッスイ) の 6 種類を用いた。接種菌液は STB で前培養した

後、Buffered saline with gelatin (BSG)⁹⁾ で約 10^6 CFU/ml となるように調製した。

3) 培地 pH の影響：pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 および 9.0 に調製した STA を用いた。

4) 血清添加の影響：測定用培地として Ca^{2+} および Mg^{2+} の規定量¹²⁾ を無菌的に添加した cation supplemented Mueller Hinton Broth (CSMHB) を使用した。CSMHB に非働化馬血清を 10, 25, 50% となるように、それぞれ添加し、無添加時と MIC を比較した。

5) 金属イオンの影響：それぞれ 0.2mM および 2.0mM の AlCl_3 , FeCl_3 , FeSO_4 , CaCl_2 および MgCl_2 を加えた感性ディスク用培地-N (SDA, ニッスイ) を用いた。

5. 最小殺菌濃度 (MBC) の測定

微量液体希釈法により MIC を求め、MIC 判定後、各ウエルより培養液 $1\mu\text{l}$ を、薬物を含まない Brain heart infusion broth (BHIB, ニッスイ) を分注した 96 穴 U 底マイクロプレートに接種し、 37°C で 20 時間培養した後、菌の発育が認められない最小薬物濃度を MBC とした。

6. 増殖曲線に及ぼす影響

STB で 37°C 、20 時間前培養した菌液を同培地で希釈した後、 37°C で振盪培養し、対数増殖期の約 10^6 CFU/ml となった時点で、最終濃度が $1/4$, $1/2$, 1, 2 MIC となるよう各薬剤溶液を添加し、さらに振盪培養を続け、薬物添加直後、1, 2 および 4 時間目に菌液を分取して生菌数を測定した。

7. DNA gyrase に対する阻害活性

DNA gyrase は *Escherichia coli* K-12 株および *P. aeruginosa* PAO 1 株より Sato ら¹³⁾、Inoue ら¹⁴⁾ の方法に従って精製した。DNA gyrase の阻害活性は以下のように測定した。DNA gyrase の subunit A, B, 各濃度の薬剤および relaxed pBR322 を 30°C で 1 時間反応後、0.8% agarose gel 電気泳動を行い、ethidium bromide で染色した。Gel を UV 照射下 (Transilluminator, フナコシ) に写真撮影し、そのネガをデンストメータ (CS-930, Shimadzu) により分析して 50% 阻害濃度を求めた。

8. マウス実験の全身感染モデルに対する感染防御試験

各薬剤はいずれも 0.5% hydroxypropyl cellulose-SL (HPC-SL, 日本ソーダ) 液に懸濁化し、NM441 の投与量は NM394 換算量とした。

動物は Slc: ddY (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウス、4 週齢、体重 $18\sim 23\text{g}$ を 1 群 10 匹で使用した。感染菌のうち、streptococci は 5% 馬血清加 BHIB で培養した後、遠心洗浄して nutrient broth に懸濁化した。*Klebsiella pneumoniae* B-54 および *P. aeruginosa* は BHIB で培養し、同様に遠心した後、生理食塩水に懸濁化した。また、他の菌株は BHIA で培養した後、表面に発育した菌を生理食塩水に懸濁化した。

Streptococci を除く他の菌株は、それぞれの毒力に応

じて生理食塩水で希釈し、10% mucin (Bacto mucin bacteriological, Difco) と等量混合し接種用菌液とした。感染は接種用菌液をマウス当り 0.5ml 腹腔内接種することにより行った。各薬剤は菌接種1時間後に1回マウス用経口ゾンデを用いて経口投与した。また、control 群には薬物を含まない 0.5% HPC-SL 液を同様に経口投与した。効果の判定は感染7日後に行い、50%のマウスを生存せしめる投与量 (ED₅₀) およびその 95%信頼限界を Probit 法により算出し、感染防御効果の指標とした。

9. マウスにおける体内動態

絶食したマウス (Slc: ddY, 5 週齢, 雄性, 体重 22~24g) に NM441 を投与し、0.25, 0.5, 1, 2 および 4 時間後にそれぞれ 1 群 5 匹としてエーテル麻酔下に眼窩採血し、血清中 NM394 濃度を *E. coli* Kp 株を検定菌とする agar well 法により測定した。同時に肺および腎臓を摘出し、同様に NM394 濃度を測定した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

NM394 のグラム陽性菌に対する抗菌力は TFLX には及ばないものの CPFX とほぼ同等で、OFLX の 1~8 倍, NFLX の 2~16 倍優れていた (Table 1)。

グラム陰性菌に対する NM394 の抗菌力は *Burkholderia* および *Stenotrophomonas* 以外では CPFX とほぼ同等, TFLX の 1~4 倍, NFLX, OFLX の 2~8 倍の抗菌活性を示し, *P. aeruginosa* 以外のブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌を除いて 0.20 μ g/ml 以下の濃度で発育を阻止した (Table 2)。

嫌気性菌に対しても CPFX とほぼ同等の抗菌力を示し, グラム陽性嫌気性菌には MIC 0.78 μ g/ml 以下の優れた抗菌活性が認められた。また, NFLX と比較するとすべての嫌気性菌で 4~16 倍の抗菌力を示したが,

OFLX との比較ではグラム陽性嫌気性菌には 1~8 倍の抗菌活性が認められたものの, グラム陰性嫌気性菌に対しては劣る傾向であった (Table 3)。

NM394 の *Mycoplasma* に対する抗菌力は NFLX より優れ, OFLX および CPFX と同等ないしやや弱く, *Ureaplasma* に対する抗菌力は NFLX, OFLX, CPFX および TFLX より優れていた (Table 4)。

2. 臨床分離株の感受性分布

各種臨床分離株に対する NM394, NFLX, OFLX, CPFX および TFLX のグラム陽性菌に対する抗菌力を Table 5 に, グラム陰性菌に対する抗菌力を Table 6-1 および 6-2 に示した。

1) グラム陽性菌

グラム陽性菌全体で NM394 の抗菌力は概ね NFLX より優れていた。NM394 の *S. aureus* に対する MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml であり, その抗菌力は OFLX および TFLX に劣るが, CPFX と同等, MRSA に対する MIC₉₀ は 100 μ g/ml となり, MRSA の各薬剤に対する感受性は低かった。*Staphylococcus epidermidis* に対しては 0.39 μ g/ml で, その抗菌力は TFLX に劣り, OFLX, CPFX と同等であった。

Streptococcus pyogenes に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.78 μ g/ml であり, その抗菌力は TFLX に劣り, CPFX と同等で, OFLX より優れ, *Streptococcus pneumoniae* に対しては 1.56 μ g/ml で, TFLX より劣り, CPFX と同等, OFLX より優れた抗菌力を示した。

Enterococcus faecalis に対する MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml で, その抗菌力は OFLX, CPFX および TFLX より優れていた。*Enterococcus faecium* に対する MIC₉₀ は 1.56 μ g/ml で, その抗菌力は TFLX に劣り, OFLX, CPFX より優れていた。*Enterococcus avium* に対する MIC₉₀

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

Organism	MIC (μ g/ml)				
	NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0.05	0.20	0.20	0.10	0.025
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.39	1.56	0.39	0.20	0.025
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.10	0.20	0.20	0.10	0.0125
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.39	0.78	0.39	0.39	0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO 12993	0.39	1.56	0.39	0.39	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	0.10	1.56	0.78	0.39	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook*	0.20	1.56	0.39	0.20	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203*	0.20	0.78	0.78	0.39	0.10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type I*	0.39	1.56	0.78	0.39	0.05
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type II*	0.20	0.78	0.78	0.20	0.05
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type III*	0.20	0.78	0.78	0.20	0.025
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.78	3.13	1.56	0.78	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO 12970	0.78	3.13	1.56	0.78	0.20
<i>Enterococcus faecium</i> IFO 13138	1.56	6.25	3.13	1.56	0.39
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.78	6.25	1.56	1.56	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.05	0.20	0.05	0.025	0.0125

Medium: sensitivity test agar, *: Supplemented with 5% defibrinated horse blood

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

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.012	0.05	0.10	0.012	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	≤ 0.006	0.025	0.025	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.012	0.10	0.10	0.012	0.025
<i>Escherichia coli</i> Kp	≤ 0.006	0.025	0.05	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.012	0.05	0.05	≤ 0.006	0.012
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.05	0.10	0.10	0.05	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3512	≤ 0.006	0.025	0.05	≤ 0.006	0.025
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.025	0.20	0.20	0.05	0.05
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.05	0.39	0.20	0.10	0.05
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.05	0.20	0.39	0.10	0.20
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2	0.012	0.05	0.05	0.012	0.025
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	0.025	0.10	0.20	0.05	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	≤ 0.006	0.025	0.025	≤ 0.006	≤ 0.006
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.012	0.05	0.025	0.012	0.025
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3851	0.012	0.05	0.05	0.012	0.10
<i>Morganella morganii</i> IFO 3848	≤ 0.006	0.025	0.025	≤ 0.006	0.025
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	≤ 0.006	0.05	0.05	≤ 0.006	0.012
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	≤ 0.006	0.025	0.05	≤ 0.006	0.012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	0.10	0.39	0.78	0.10	0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.20	1.56	1.56	0.39	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	0.20	1.56	1.56	0.39	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1	0.10	0.39	0.78	0.10	0.20
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	1.56	6.25	1.56	0.78	0.78
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	0.39	1.56	0.20	0.20	0.025
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	1.56	6.25	1.56	0.78	1.56
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 54	0.012	0.10	0.10	0.012	0.025
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211*	0.012	0.05	0.025	≤ 0.006	≤ 0.006

Medium: sensitivity test agar, *: supplemented with 5% Fildes enrichment

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

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin
<i>Peptostreptococcus magnus</i> GAI 0644	0.20	1.56	1.56	0.39	0.20
<i>Peptostreptococcus micros</i> GAI 5540	0.78	3.13	0.78	0.78	0.10
<i>Eubacterium limosum</i> GAI 5456	0.78	3.13	1.56	0.78	0.39
<i>Propionibacterium acnes</i> GAI 5419	0.78	12.5	3.13	1.56	1.56
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	6.25	25	1.56	6.25	0.39
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI 0675	3.13	50	1.56	6.25	0.20
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> GAI 5596	0.78	6.25	1.56	1.56	0.78
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GAI 0659	25	100	6.25	12.5	0.39
<i>Bacteroides vulgatus</i> GAI 0673	12.5	100	1.56	12.5	0.39
<i>Fusobacterium nucleatum</i> GAI 4809	3.13	25	3.13	3.13	0.78

Medium: GAM agar

Table 4. Antibacterial activities of NM394, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin against *Mycoplasma* and *Ureaplasma*

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH	1.56	6.25	1.56	0.78	0.39
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mac	1.56	6.25	1.56	0.78	0.78
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH-P24	1.56	3.13	1.56	0.78	0.39
<i>Mycoplasma hominis</i> type 1 M-001	1	8	0.5	1	0.0625
<i>Mycoplasma hominis</i> type 1 M-002	1	2	0.5	0.5	0.125
<i>Mycoplasma hominis</i> type 1 M-003	2	16	1	2	0.125
<i>Ureaplasma urealyticum</i> T2*	1.56	12.5	3.13	3.13	0.10
<i>Ureaplasma urealyticum</i> T3*	3.13	12.5	1.56	3.13	>25
<i>Ureaplasma urealyticum</i> T8*	1.56	12.5	3.13	>25	12.5

Medium: PPLO agar, *: T-broth

Table 5. Antibacterial activities of NM394, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin against gram-positive bacteria

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Staphylococcus aureus</i> (95)	NM394	0.10 ~ 6.25	0.78	1.56
	norfloxacin	0.39 ~ 50	1.56	6.25
	ofloxacin	0.20 ~ 3.13	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.10 ~ 6.25	0.39	1.56
	tosufloxacin	0.012 ~ 1.56	0.05	0.10
methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (84)	NM394	0.20 ~ >100	3.13	100
	norfloxacin	0.20 ~ >100	6.25	>100
	ofloxacin	0.20 ~ >100	1.56	25
	ciprofloxacin	0.10 ~ >100	3.13	100
	tosufloxacin	0.012 ~ >25	0.10	>25
	methicillin	6.25 ~ >100	>100	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (46)	NM394	0.10 ~ 3.13	0.20	0.39
	norfloxacin	0.20 ~ 12.5	0.39	0.78
	ofloxacin	0.20 ~ 6.25	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.05 ~ 3.13	0.20	0.39
	tosufloxacin	0.012 ~ 1.56	0.025	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> (57)	NM394	0.10 ~ 1.56	0.39	0.78
	norfloxacin	0.78 ~ 25	1.56	3.13
	ofloxacin	0.39 ~ 3.13	1.56	1.56
	ciprofloxacin	0.20 ~ 3.13	0.39	0.78
	tosufloxacin	0.025 ~ 0.78	0.10	0.20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (60)	NM394	0.20 ~ 6.25	0.78	1.56
	norfloxacin	0.78 ~ 25	3.13	12.5
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.20 ~ 3.13	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.025 ~ 0.39	0.10	0.39
<i>Streptococcus agalactiae</i> (27)	NM394	0.20 ~ 3.13	0.78	1.56
	norfloxacin	1.56 ~ 12.5	3.13	12.5
	ofloxacin	0.78 ~ 12.5	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 12.5	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.10 ~ >25	0.10	0.39
<i>Enterococcus faecalis</i> (74)	NM394	0.39 ~ 100	0.78	1.56
	norfloxacin	1.56 ~ 100	3.13	6.25
	ofloxacin	0.78 ~ 100	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.39 ~ 50	0.78	3.13
	tosufloxacin	0.10 ~ >25	0.39	6.25
<i>Enterococcus faecium</i> (26)	NM394	0.20 ~ 1.56	0.78	1.56
	norfloxacin	0.78 ~ 25	3.13	12.5
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	3.13	3.13
	ciprofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.78	3.13
	tosufloxacin	0.05 ~ 6.25	0.39	0.78
<i>Enterococcus avium</i> (26)	NM394	0.20 ~ 3.13	0.78	3.13
	norfloxacin	0.78 ~ 12.5	1.56	6.25
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	3.13	6.25
	ciprofloxacin	0.20 ~ 25	0.78	12.5
	tosufloxacin	0.05 ~ 3.13	0.20	1.56

は $3.13\mu\text{g/ml}$ で、その抗菌力は TFLX に劣り、OFLX、CPFX より優れていた。

2) グラム陰性菌

E. coli に対する NM394 の MIC₉₀ は $0.025\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力は CPFX、TFLX と同等で、OFLX より優れていた。

Citrobacter freundii に対する NM394 の MIC₉₀ は $0.20\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力は OFLX、CPFX、TFLX より優れていた。

K. pneumoniae に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.05

$\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力は TFLX と同等で、OFLX、CPFX より優れていた。

Enterobacter aerogenes および *Enterobacter cloacae* に対する NM394 の MIC₉₀ はそれぞれ $0.025\mu\text{g/ml}$ および $0.39\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力は比較薬剤中最も優れていた。

Proteus mirabilis に対する NM394 の MIC₉₀ は $50\mu\text{g/ml}$ であり、 $>100\mu\text{g/ml}$ の低感受性株が存在した。各薬剤についても同様の傾向であった。

Indole positive *Proteus* spp. に対する NM394 の

Table 6-1. Antibacterial activities of NM394, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin against gram-negative bacteria

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
<i>Escherichia coli</i> (103)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.78	0.025	0.025
	norfloxacin	0.012 \sim	12.5	0.05	0.10
	ofloxacin	0.012 \sim	6.25	0.05	0.10
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	3.13	0.025	0.025
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim$	12.5	0.025	0.025
<i>Citrobacter freundii</i> (55)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	1.56	0.012	0.20
	norfloxacin	0.025 \sim	12.5	0.05	0.78
	ofloxacin	0.05 \sim	12.5	0.10	1.56
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	6.25	0.025	0.39
	tosufloxacin	0.012 \sim	>25	0.05	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (80)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.20	0.012	0.05
	norfloxacin	0.05 \sim	0.78	0.10	0.20
	ofloxacin	0.05 \sim	1.56	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.012 \sim	0.20	0.025	0.10
	tosufloxacin	0.012 \sim	0.20	0.025	0.05
<i>Enterobacter aerogenes</i> (28)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.05	0.012	0.025
	norfloxacin	0.05 \sim	0.78	0.10	0.20
	ofloxacin	0.05 \sim	0.39	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.012 \sim	0.39	0.05	0.10
	tosufloxacin	0.012 \sim	0.10	0.025	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> (79)	NM394	0.012 \sim	6.25	0.025	0.39
	norfloxacin	0.025 \sim	50	0.20	1.56
	ofloxacin	0.025 \sim	25	0.10	1.56
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	12.5	0.025	0.78
	tosufloxacin	0.025 \sim	>25	0.05	0.78
<i>Proteus mirabilis</i> (63)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	>100	0.025	50
	norfloxacin	0.025 \sim	>100	0.05	>100
	ofloxacin	0.05 \sim	>100	0.10	12.5
	ciprofloxacin	0.012 \sim	>100	0.025	50
	tosufloxacin	0.05 \sim	>25	0.10	>25
indole positive <i>Proteus</i> spp. (82)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.39	0.025	0.20
	norfloxacin	0.025 \sim	3.13	0.05	0.20
	ofloxacin	0.025 \sim	6.25	0.10	0.39
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	1.56	0.025	0.10
	tosufloxacin	0.025 \sim	3.13	0.05	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> (41) <i>Morganella morganii</i> (24) <i>Providencia rettgeri</i> (17)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	25	0.10	6.25
	norfloxacin	0.025 \sim	100	0.39	25
	ofloxacin	0.05 \sim	100	0.39	12.5
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	25	0.20	6.25
	tosufloxacin	0.012 \sim	>25	0.39	6.25
<i>Serratia marcescens</i> (184)	NM394	0.012 \sim	25	0.20	1.56
	norfloxacin	0.10 \sim	>100	0.78	3.13
	ofloxacin	0.10 \sim	>100	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.025 \sim	50	0.20	1.56
	tosufloxacin	0.012 \sim	>25	0.39	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (179)	NM394	1.56 \sim	12.5	3.13	6.25
	norfloxacin	6.25 \sim	50	12.5	25
	ofloxacin	0.39 \sim	6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 \sim	6.25	1.56	3.13
	tosufloxacin	0.05 \sim	1.56	0.39	0.78
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (26)	NM394	0.025 \sim	25	0.39	1.56
	norfloxacin	0.39 \sim	100	3.13	12.5
	ofloxacin	0.10 \sim	3.13	0.20	0.78
	ciprofloxacin	0.05 \sim	6.25	0.20	1.56
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.39	0.025	0.20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (31)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.05	0.012	0.025
	norfloxacin	0.025 \sim	0.20	0.05	0.10
	ofloxacin	0.012 \sim	0.20	0.025	0.05
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.025	≤ 0.006	0.012
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.10	≤ 0.006	0.012
<i>Haemophilus influenzae</i> (70)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.05	0.012	0.025
	norfloxacin	0.025 \sim	0.20	0.05	0.10
	ofloxacin	0.012 \sim	0.20	0.025	0.05
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.025	≤ 0.006	0.012
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.10	≤ 0.006	0.012

Table 6-2. Antibacterial activities of NM394, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin against gram-negative bacteria and *Mycoplasma*

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₉₀
<i>Moraxella catarrhalis</i> (34)	NM394	$\leq 0.025 \sim 0.10$	0.10	0.05	0.10
	norfloxacin	0.10 \sim 0.20	0.20	0.20	0.20
	ofloxacin	0.05 \sim 0.10	0.10	0.10	0.10
	ciprofloxacin	$\leq 0.025 \sim 0.05$	0.05	≤ 0.025	0.05
	tosufloxacin	≤ 0.025		≤ 0.025	≤ 0.025
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (20)	NM394	$\leq 0.006 \sim 0.025$	0.025	0.012	0.025
	norfloxacin	0.025 \sim 0.10	0.10	0.05	0.10
	ofloxacin	0.012 \sim 0.10	0.10	0.05	0.05
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.012$	0.012	≤ 0.006	0.012
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim 0.025$	0.025	0.025	0.025
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (24)	NM394	1.56 \sim 3.13	3.13	1.56	1.56
	norfloxacin	3.13 \sim 6.25	6.25	6.25	6.25
	ofloxacin	0.39 \sim 1.56	1.56	0.78	0.78
	ciprofloxacin	0.39 \sim 0.78	0.78	0.78	0.78
	tosufloxacin	0.20 \sim 0.78	0.78	0.39	0.78

MIC₉₀は0.20 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はCPFXに劣るが、OFLX, TFLXより優れていた。

*Serratia marcescens*に対するNM394のMIC₉₀は6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はOFLXより優れ、CPFX, TFLXと同等であった。

*P. aeruginosa*に対するNM394のMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はCPFXと同等で、OFLX, TFLXより優れていた。

NM394の抗菌力は*P. aeruginosa*以外の非発酵菌(*Stenotrophomonas maltophilia*および*Acinetobacter calcoaceticus*)に対してOFLX, CPFX, TFLXより劣る傾向にあった。

*H. influenzae*に対するNM394のMIC₉₀は0.025 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はCPFX, TFLXより劣るが、OFLXより優れていた。

*M. catarrhalis*に対するNM394のMIC₉₀は0.10 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はOFLXと同等で、CPFX, TFLXより劣っていた。

*N. gonorrhoeae*に対するNM394のMIC₉₀は0.025 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はTFLXと同等で、CPFXより劣り、OFLXより優れていた。

*M. pneumoniae*に対するNM394のMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力はOFLX, CPFX, TFLXより劣っていた。

NM394の抗菌力は今回検討したすべてのグラム陰性菌に対してNFLXより優れていた。

3. 諸因子の影響

1) 接種菌量の影響: NM394の*P. aeruginosa* IFO 3445に対する抗菌力は 10^4 CFU/mlから 10^8 CFU/mlへと接種菌量の増加に伴い1/8に低下したが、他の菌種では接種菌量が増大しても抗菌力に大きな変化は認められず、また、その他の薬剤も同様であった (Table 7)。

2) 培地種類の影響: NM394およびその他の薬剤の抗菌力は測定培地による影響はほとんど認められなかった (Table 8)。

3) 培地pHの影響: NM394の抗菌力はグラム陽性菌に対し酸性側で低下が認められたが、その影響は他の薬剤より少なかった。グラム陰性菌に対しては各薬剤とも酸性側での抗菌力の低下が認められた (Table 9)。

4) 血清添加の影響: 各薬物ともに血清添加の影響はほとんど認められなかった (Table 10)。

5) 金属イオンの影響: NM394の抗菌力は金属イオンによる影響をほとんど受けなかったが、2mMのAl³⁺により1/8~1/256と大幅に抗菌力が低下した。その他の薬剤についても類似した結果が得られた (Table 11)。

4. 最小殺菌濃度(MBC)

NM394の各被験菌に対するMICとMBCはほぼ等しく、その他の薬剤と同様にこれらの菌に対して殺菌的に作用することが認められた (Table 12)。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

1) *S. aureus* FDA 209P JC-1に対して、NM394は1 MIC以上で殺菌的に作用し、OFLX, CPFXは殺菌作用を得るためには2 MIC以上を必要とした (Fig. 1)。

2) *E. coli* NIHJ JC-2に対するNM394の殺菌作用はCPFXとほぼ同等であったが、その殺菌作用は薬物添加直後から認められ、CPFXより速やかに殺菌作用を示した (Fig. 2)。

3) *S. marcescens* T-55に対して、NM394は1/4 MICでは静菌的な作用を示し、1/2 MIC以上では殺菌作用を示した。同様の作用がOFLX, CPFXでも認められた (Fig. 3)。

4) *P. aeruginosa* E-2に対してはNM394が1/4 MICでも殺菌作用を示したのに対し、OFLXは1 MIC以上で、CPFXは1/2 MIC以上で殺菌作用を示し、NM394

Table 7. Effect of inoculum size on antibacterial activity of NM394, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin

Organism	Inoculum size ¹⁾ (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	10 ⁴	0.05	0.20	0.39	0.10
	10 ⁵	0.05	0.20	0.39	0.10
	10 ⁶	0.10	0.20	0.39	0.10
	10 ⁷	0.10	0.39	0.39	0.20
	10 ⁸	0.10	0.39	0.78	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10 ⁴	0.39	1.56	1.56	0.39
	10 ⁵	0.39	1.56	1.56	0.39
	10 ⁶	0.39	1.56	1.56	0.39
	10 ⁷	0.78	3.13	1.56	0.39
	10 ⁸	1.56	3.13	3.13	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	10 ⁴	0.012	0.05	0.10	0.012
	10 ⁵	0.012	0.05	0.10	0.012
	10 ⁶	0.012	0.10	0.10	0.012
	10 ⁷	0.012	0.10	0.20	0.025
	10 ⁸	0.012	0.20	0.20	0.025
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	10 ⁴	0.05	0.10	0.39	0.10
	10 ⁵	0.05	0.20	0.39	0.10
	10 ⁶	0.05	0.20	0.39	0.10
	10 ⁷	0.05	0.20	0.39	0.10
	10 ⁸	0.05	0.39	0.78	0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	10 ⁴	0.05	0.20	0.39	0.05
	10 ⁵	0.10	0.39	0.78	0.10
	10 ⁶	0.10	0.39	0.78	0.20
	10 ⁷	0.39	1.56	3.13	0.20
	10 ⁸	0.39	1.56	3.13	0.39

Medium: sensitivity test agar, ¹⁾: 5 μl was inoculated.

Table 8. Effect of various medium on antibacterial activity of NM394, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin

Organism	Medium	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	MHA	0.025	0.10	0.20	0.10
	STA	0.05	0.20	0.20	0.10
	HIA	0.05	0.20	0.20	0.05
	NA	0.05	0.20	0.20	0.10
	TSA	0.10	0.20	0.39	0.10
	BHIA	0.05	0.20	0.39	0.10
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MHA	0.78	6.25	1.56	1.56
	STA	0.78	6.25	1.56	1.56
	HIA	0.78	6.25	1.56	0.78
	NA	0.78	6.25	1.56	0.78
	TSA	0.78	3.13	1.56	0.78
	BHIA	0.78	3.13	1.56	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	MHA	0.012	0.05	0.10	0.012
	STA	0.012	0.05	0.10	0.025
	HIA	0.012	0.20	0.10	0.025
	NA	0.025	0.10	0.10	0.025
	TSA	0.025	0.10	0.20	0.012
	BHIA	0.025	0.20	0.10	0.05
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	MHA	0.10	0.20	0.39	0.10
	STA	0.025	0.20	0.39	0.10
	HIA	0.05	0.20	0.39	0.10
	NA	0.10	0.39	0.78	0.20
	TSA	0.025	0.39	0.39	0.20
	BHIA	0.10	0.39	0.78	0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	MHA	0.10	0.78	0.78	0.20
	STA	0.10	0.39	0.78	0.10
	HIA	0.10	0.39	1.56	0.10
	NA	0.20	0.78	0.78	0.20
	TSA	0.05	0.39	1.56	0.10
	BHIA	0.10	0.78	0.78	0.20

Medium MHA : mueller hinton agar, STA : sensitivity test agar, HIA : heart infusion agar
 NA : nutrient agar, TSA : trypto-soya agar, BHIA : brain heart infusion agar
 Inoculum size : 10⁶ cells/ml

Table 9. Effect of medium pH on antibacterial activity of NM394, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin

Organism	Medium pH	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	5	0.10	0.78	1.56	0.39
	6	0.05	0.20	0.78	0.10
	7	0.05	0.20	0.20	0.10
	8	0.05	0.20	0.39	0.10
	9	0.05	0.20	0.39	0.10
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	5	1.56	12.5	12.5	6.25
	6	0.78	3.13	1.56	0.78
	7	0.39	1.56	0.78	0.39
	8	0.39	0.78	0.78	0.39
	9	0.39	0.78	1.56	0.20
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	5	1.56	6.25	6.25	1.56
	6	0.10	0.78	0.78	0.10
	7	0.012	0.05	0.10	0.025
	8	0.012	0.025	0.10	0.012
	9	0.012	0.05	0.20	≤ 0.006
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	5	12.5	50	50	25
	6	0.78	3.13	3.13	1.56
	7	0.10	0.39	0.39	0.20
	8	0.05	0.10	0.39	0.10
	9	0.05	0.10	0.78	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	5	3.13	25	12.5	6.25
	6	0.39	3.13	3.13	0.78
	7	0.10	0.20	0.78	0.10
	8	0.10	0.20	0.78	0.10
	9	0.05	0.20	1.56	0.10

Medium : sensitivity test agar

Inoculum size : 10^8 cells/ml

Table 10. Effect of horse serum on antibacterial activity of NM394, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin

Organism	Horse serum (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0	0.05	0.20	0.39	0.10
	10	0.05	0.20	0.39	0.10
	25	0.05	0.20	0.39	0.10
	50	0.10	0.39	0.78	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0.78	1.56	1.56	0.78
	10	0.78	1.56	1.56	0.39
	25	0.39	0.78	1.56	0.39
	50	0.39	1.56	3.13	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0	0.012	0.05	0.10	0.006
	10	0.006	0.05	0.025	0.006
	25	0.006	0.025	0.10	0.006
	50	0.006	0.025	0.025	0.006
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0	0.025	0.20	0.39	0.10
	10	0.025	0.10	0.20	0.05
	25	0.025	0.05	0.20	0.025
	50	0.025	0.10	0.39	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	0	0.10	1.56	1.56	0.39
	10	0.10	0.78	0.78	0.10
	25	0.10	0.39	1.56	0.10
	50	0.10	0.78	1.56	0.20

MICs were determined by the microdilution method.

Medium : cation supplemented mueller hinton broth

Inoculum size : 10^8 cells/ml

Table 11. Influence of multivalent metal ions on antibacterial activity of NM394, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin

Organism	Cations added	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	none	0.05	0.20	0.39	0.10
	AlCl ₃ 0.2mM	0.05	0.20	0.39	0.10
	AlCl ₃ 2.0mM	0.39	1.56	3.13	1.56
	FeCl ₃ 0.2mM	0.05	0.20	0.39	0.10
	FeCl ₃ 2.0mM	0.10	0.39	0.39	0.20
	FeSO ₄ 0.2mM	0.05	0.20	0.39	0.10
	FeSO ₄ 2.0mM	0.10	0.39	0.39	0.20
	MgCl ₂ 0.2mM	0.05	0.20	0.39	0.10
	MgCl ₂ 2.0mM	0.10	0.39	0.39	0.20
	CaCl ₂ 0.2mM	0.05	0.20	0.20	0.10
	CaCl ₂ 2.0mM	0.05	0.20	0.20	0.10
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	none	0.39	1.56	0.78	0.39
	AlCl ₃ 0.2mM	0.39	3.13	1.56	0.39
	AlCl ₃ 2.0mM	3.13	25	6.25	6.25
	FeCl ₃ 0.2mM	0.78	6.25	1.56	0.39
	FeCl ₃ 2.0mM	1.56	6.25	1.56	0.78
	FeSO ₄ 0.2mM	0.78	6.25	1.56	0.78
	FeSO ₄ 2.0mM	0.78	3.13	1.56	0.78
	MgCl ₂ 0.2mM	0.39	3.13	1.56	0.39
	MgCl ₂ 2.0mM	0.78	3.13	1.56	0.78
	CaCl ₂ 0.2mM	0.39	1.56	0.78	0.39
	CaCl ₂ 2.0mM	0.39	1.56	1.56	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	none	0.012	0.10	0.10	0.025
	AlCl ₃ 0.2mM	0.012	0.10	0.20	0.025
	AlCl ₃ 2.0mM	0.78	3.13	0.78	0.78
	FeCl ₃ 0.2mM	0.012	0.10	0.10	0.012
	FeCl ₃ 2.0mM	0.05	0.39	0.20	0.05
	FeSO ₄ 0.2mM	0.012	0.10	0.10	0.012
	FeSO ₄ 2.0mM	0.025	0.20	0.20	0.05
	MgCl ₂ 0.2mM	0.012	0.20	0.10	0.025
	MgCl ₂ 2.0mM	0.025	0.20	0.20	0.025
	CaCl ₂ 0.2mM	0.025	0.10	0.10	0.025
	CaCl ₂ 2.0mM	0.025	0.10	0.10	0.025
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO 13535	none	0.025	0.39	0.20	0.05
	AlCl ₃ 0.2mM	0.10	0.20	0.20	0.05
	AlCl ₃ 2.0mM	3.13	12.5	1.56	6.25
	FeCl ₃ 0.2mM	0.025	0.20	0.20	0.05
	FeCl ₃ 2.0mM	0.10	0.78	0.39	0.10
	FeSO ₄ 0.2mM	0.025	0.39	0.20	0.025
	FeSO ₄ 2.0mM	0.10	0.78	0.39	0.10
	MgCl ₂ 0.2mM	0.05	0.20	0.20	0.05
	MgCl ₂ 2.0mM	0.05	0.78	0.39	0.05
	CaCl ₂ 0.2mM	0.05	0.20	0.20	0.10
	CaCl ₂ 2.0mM	0.05	0.39	0.20	0.10
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	none	0.05	0.39	0.78	0.20
	AlCl ₃ 0.2mM	0.10	0.39	0.78	0.20
	AlCl ₃ 2.0mM	6.25	25	25	6.25
	FeCl ₃ 0.2mM	0.10	0.39	0.78	0.20
	FeCl ₃ 2.0mM	0.20	1.56	1.56	0.78
	FeSO ₄ 0.2mM	0.10	0.39	0.78	0.20
	FeSO ₄ 2.0mM	0.20	0.78	0.78	0.39
	MgCl ₂ 0.2mM	0.05	0.39	0.78	0.39
	MgCl ₂ 2.0mM	0.10	0.78	0.78	0.39
	CaCl ₂ 0.2mM	0.05	0.20	0.39	0.20
	CaCl ₂ 2.0mM	0.10	0.39	0.39	0.20

Medium: sensitivity-disk agar N

Inoculum size: 10⁶ cells/ml

Table 11. Continued

Organism	Cations added	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin
<i>Morganella morganii</i> IFO 3848	none	0.025	0.39	0.20	0.05
	AlCl ₃ 0.2mM	0.10	0.20	0.20	0.05
	AlCl ₃ 2.0mM	6.25	12.5	1.56	0.78
	FeCl ₃ 0.2mM	0.05	0.20	0.20	0.05
	FeCl ₃ 2.0mM	0.20	0.78	0.39	0.20
	FeSO ₄ 0.2mM	0.05	0.20	0.20	0.05
	FeSO ₄ 2.0mM	0.05	0.39	0.39	0.05
	MgCl ₂ 0.2mM	0.025	0.39	0.20	0.20
	MgCl ₂ 2.0mM	0.05	0.39	0.39	0.20
	CaCl ₂ 0.2mM	0.05	0.39	0.20	0.10
	CaCl ₂ 2.0mM	0.10	0.78	0.39	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	none	0.05	0.78	0.78	0.20
	AlCl ₃ 0.2mM	0.10	1.56	0.78	0.20
	AlCl ₃ 2.0mM	3.13	12.5	3.13	1.56
	FeCl ₃ 0.2mM	0.10	0.78	0.78	0.20
	FeCl ₃ 2.0mM	0.39	3.13	3.13	0.39
	FeSO ₄ 0.2mM	0.10	1.56	1.56	0.20
	FeSO ₄ 2.0mM	0.20	1.56	1.56	0.39
	MgCl ₂ 0.2mM	0.10	0.78	0.78	0.20
	MgCl ₂ 2.0mM	0.10	1.56	0.78	0.20
	CaCl ₂ 0.2mM	0.20	1.56	1.56	0.20
	CaCl ₂ 2.0mM	0.20	1.56	1.56	0.39

Medium: sensitivity-disk agar N

Inoculum size: 10⁶ cells/ml

Table 12. Bactericidal activity of NM394, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin

Organism	NM394		norfloxacin		ofloxacin		ciprofloxacin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0.05	0.05	0.10	0.20	0.20	0.39	0.10	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.10	0.10	0.39	0.39	0.20	0.20	0.10	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> OWPB 320***	0.78	0.78	1.56	3.13	0.39	0.39	0.78	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.003	0.003	0.025	0.025	0.025	0.025	0.003	0.003
<i>Escherichia coli</i> KC-14	0.006	0.006	0.025	0.025	0.025	0.05	0.003	0.012
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.025	0.025	0.20	0.20	0.39	0.39	0.10	0.10
<i>Serratia marcescens</i> T-55	0.05	0.05	0.20	0.39	0.78	0.78	0.20	0.20
<i>Serratia marcescens</i> 4009*	0.10	0.10	3.13	6.25	0.78	0.78	0.20	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	0.10	0.10	0.39	0.78	1.56	1.56	0.10	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	0.10	0.20	0.78	1.56	1.56	3.13	0.20	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> OWPB 1629*	0.78	0.78	3.13	3.13	6.25	6.25	0.78	0.78

(Microdilution method)

* clinical isolate, *** methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

は対照薬剤と比較して最も強い殺菌作用を示した (Fig. 4)。

6. DNA gyrase 阻害活性

Table 13 に示すように、NM394 の *E. coli* の DNA gyrase に対する阻害活性 (IC₅₀) は 0.84 $\mu\text{g/ml}$ であり、CPFX (0.69 $\mu\text{g/ml}$) とほぼ同等であり、OFLX (2.25 $\mu\text{g/ml}$)、NFLX (1.65 $\mu\text{g/ml}$) および TFLX (1.07 $\mu\text{g/ml}$) よりやや強かった。*P. aeruginosa* の DNA gyrase に対する NM394、NFLX、OFLX、CPFX および TFLX の阻害活性はそれぞれ 0.81、1.56、1.23、0.69 および 0.75 $\mu\text{g/ml}$ であり、NM394 の阻害活性は CPFX および TFLX とほぼ同等で、NFLX および OFLX よりやや強かった。

7. マウス実験的全身感染モデルに対する感染防御効果

グラム陽性菌感染に対して NM441 は TFLX には及ばないものの、*S. aureus* Smith に対して OFLX と同等であった以外は *S. pyogenes*、*S. pneumoniae* 感染に対してその他の比較薬剤より優れていた。グラム陰性菌感染の場合、*Enterobacteriaceae* の各菌種に対して NM441 の ED₅₀ 値は 0.981~1.150mg/kg であり、*E. coli* 以外は比較薬剤中最も優れ、*P. aeruginosa* 感染においても優れた治療効果を示し、その ED₅₀ 値は比較薬剤中最も低かった (Table 14)。

8. マウス体内動態

NM441 投与後の NM394 最高血清中濃度は 0.25 時

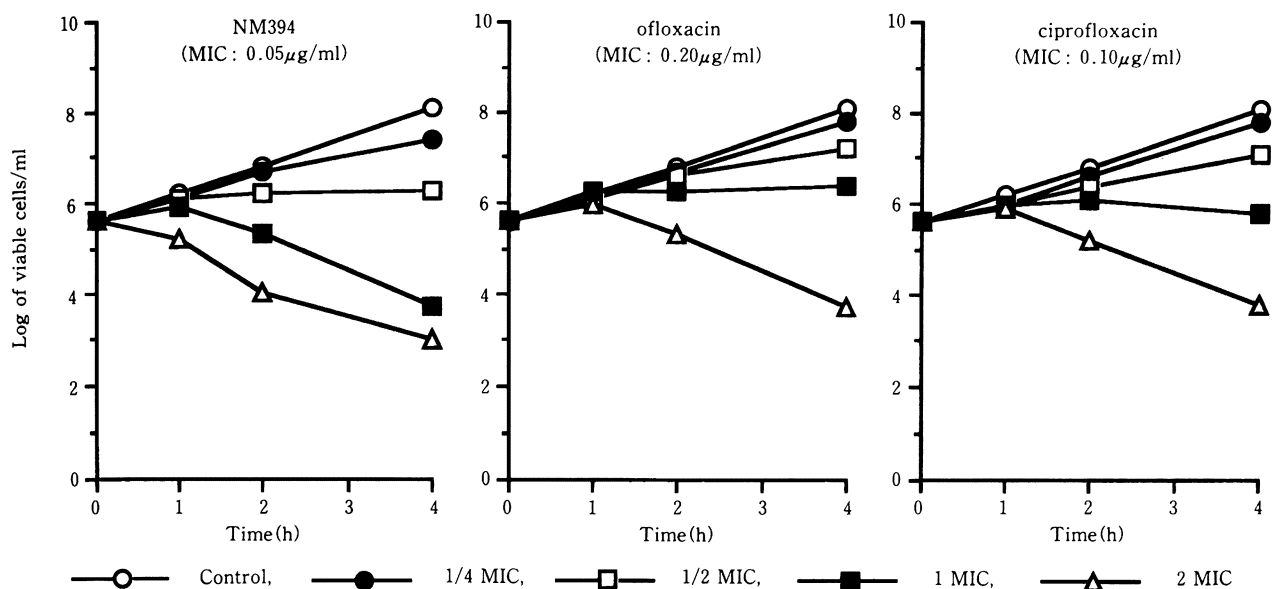


Fig. 1. Bactericidal activity of NM394, ofloxacin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* FDA 209P JC-1

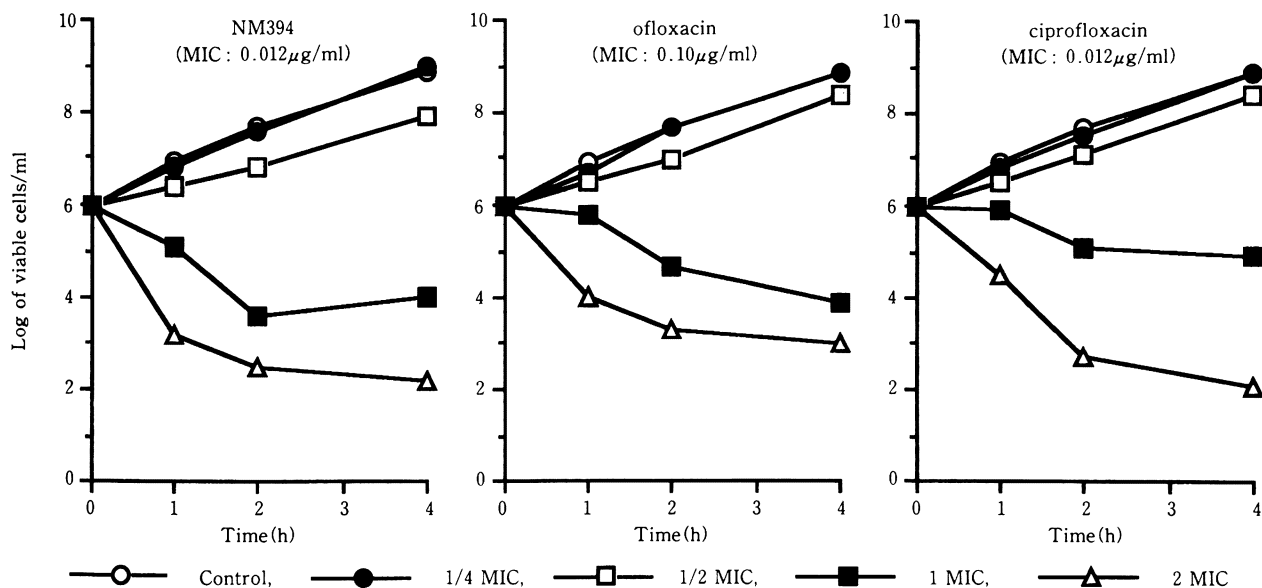


Fig. 2. Bactericidal activity of NM394, ofloxacin and ciprofloxacin against *Escherichia coli* NIHJ JC-2

間の $3.06 \pm 1.16 \mu\text{g/ml}$ であり、その時の肺内および腎臓内濃度はそれぞれ 4.26 ± 1.49 および $11.44 \pm 3.63 \mu\text{g/g}$ であった。

NM441 投与後 0.25~4 時間における血清中 NM394 濃度に対する各組織の濃度比は、肺では 1.3~2.1 倍、腎臓では 2.7~5.6 倍であり、良好な組織移行性が確認された (Fig. 5)。

III. 考 察

NM441 およびその活性本体である NM394 は分子内にキノロン環の 1, 2 位をイオウを含む環状構造とした

thiazeto-quinoline 構造を有する新しいタイプの 3 環性キノロン系抗菌薬である。

NM394 は研究所保存の標準的なグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを示した。臨床分離のグラム陽性菌に対する NM394 の抗菌力は TFLX より劣るものの、OFLX および CPMX とほぼ同等であった。一方、本薬のグラム陰性菌に対する抗菌力は OFLX と比較し同等ないし 8 倍優れた抗菌力を示し、CPFX や TFLX とならびキノロン系抗菌薬の中で最も強い部類に位置するものと考えられる。NM394 の抗菌

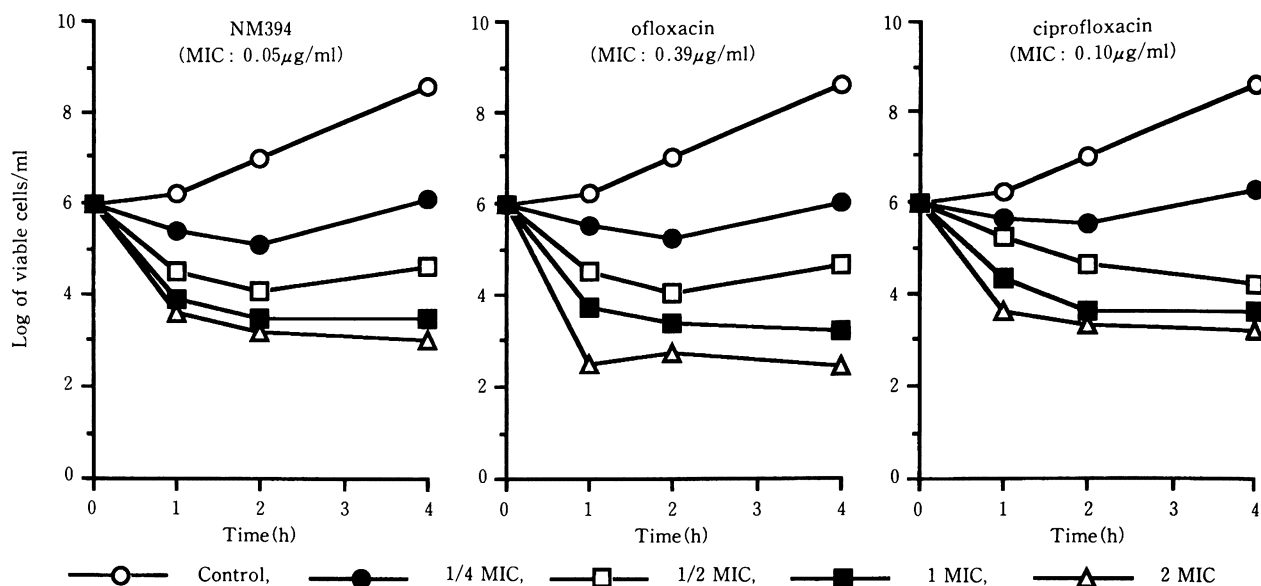


Fig. 3. Bactericidal activity of NM394, ofloxacin and ciprofloxacin against *Serratia marcescens* T-55

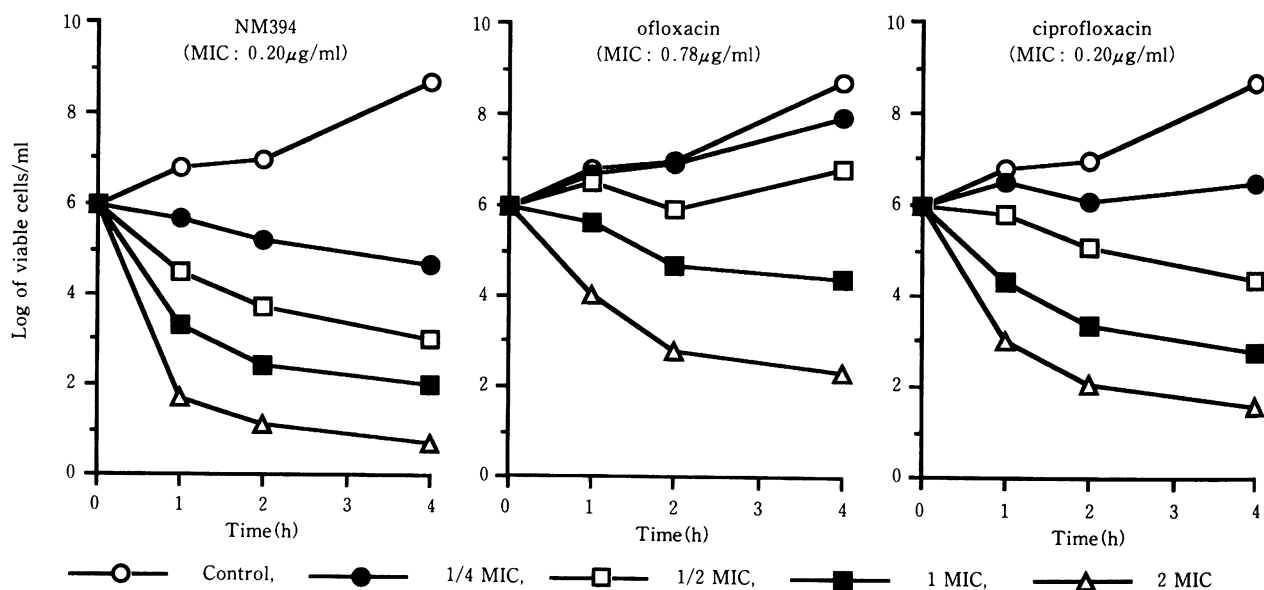


Fig. 4. Bactericidal activity of NM394, ofloxacin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* E-2

Table 13. Inhibition of supercoiling activity of *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 DNA gyrase by NM394, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and tosofloxacin

Drug	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
NM394	0.84	0.012	0.81	0.10
norfloxacin	1.65	0.10	1.56	0.39
ofloxacin	2.25	0.10	1.23	0.78
ciprofloxacin	0.69	0.012	0.69	0.10
tosofloxacin	1.07	0.025	0.75	0.20

Table 14. Protective effects of NM441, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and tosufloxacin against systemic infections in mice

Organism	Challenge dose (CFU/mouse)	Mucin	Drug*	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/kg)	95% confidence limits
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	3.50 × 10 ⁶ [56 × LD ₅₀]	+	NM441	0.10**	4.623	3.331 ~ 7.555
			norfloxacin	0.10	15.01	10.15 ~ 22.77
			ofloxacin	0.10	4.785	3.354 ~ 6.383
			ciprofloxacin	0.20	8.396	6.761 ~ 11.44
			tosufloxacin	0.012	0.521	0.345 ~ 0.848
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	1.02 × 10 ² [76 × LD ₅₀]	-	NM441	0.20**	15.87	10.67 ~ 20.62
			norfloxacin	1.56	>400	-
			ofloxacin	0.78	38.60	31.35 ~ 47.10
			ciprofloxacin	0.39	100.4	81.09 ~ 133.3
			tosufloxacin	0.20	8.111	5.741 ~ 9.915
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type I	1.50 × 10 ³ [750 × LD ₅₀]	-	NM441	0.20**	174.2	115.1 ~ 347.2
			norfloxacin	1.56	>400	-
			ofloxacin	0.78	279.4	179.2 ~ 692.5
			ciprofloxacin	0.39	214.3	155.4 ~ 328.3
			tosufloxacin	0.10	67.16	36.83 ~ 279.5
<i>Escherichia coli</i> N-ST 0110	2.98 × 10 ⁵ [6057 × LD ₅₀]	+	NM441	0.025**	1.150	0.812 ~ 1.642
			norfloxacin	0.10	5.301	3.790 ~ 7.647
			ofloxacin	0.20	1.584	1.211 ~ 2.083
			ciprofloxacin	0.025	0.700	0.498 ~ 0.979
			tosufloxacin	0.025	0.436	0.303 ~ 0.606
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-54	2.38 × 10 ³ [710 × LD ₅₀]	+	NM441	0.006**	1.036	0.753 ~ 1.430
			norfloxacin	0.025	7.611	5.822 ~ 10.00
			ofloxacin	0.05	1.830	1.289 ~ 2.710
			ciprofloxacin	0.012	1.300	0.996 ~ 1.691
			tosufloxacin	0.05	1.595	1.247 ~ 2.039
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	2.63 × 10 ⁶ [22 × LD ₅₀]	+	NM441	0.012**	0.993	0.696 ~ 1.394
			norfloxacin	0.025	4.236	2.729 ~ 6.194
			ofloxacin	0.20	2.701	2.044 ~ 3.556
			ciprofloxacin	0.05	1.659	1.231 ~ 2.252
			tosufloxacin	0.20	2.311	1.657 ~ 3.213
<i>Serratia marcescens</i> T-55	1.42 × 10 ⁶ [90 × LD ₅₀]	+	NM441	0.05**	0.981	0.604 ~ 1.483
			norfloxacin	0.10	5.241	3.155 ~ 8.225
			ofloxacin	0.39	1.875	1.363 ~ 2.558
			ciprofloxacin	0.10	1.154	0.725 ~ 1.561
			tosufloxacin	0.39	2.261	1.452 ~ 3.336
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N-ST 98	3.38 × 10 ⁵ [178 × LD ₅₀]	+	NM441	0.10**	6.594	3.908 ~ 8.681
			norfloxacin	0.20	55.70	45.14 ~ 76.38
			ofloxacin	0.78	21.82	18.17 ~ 26.18
			ciprofloxacin	0.20	9.163	6.510 ~ 11.45
			tosufloxacin	0.20	7.235	3.936 ~ 9.153

*: Drugs were administered orally 1 h after infection. **: MIC of NM394

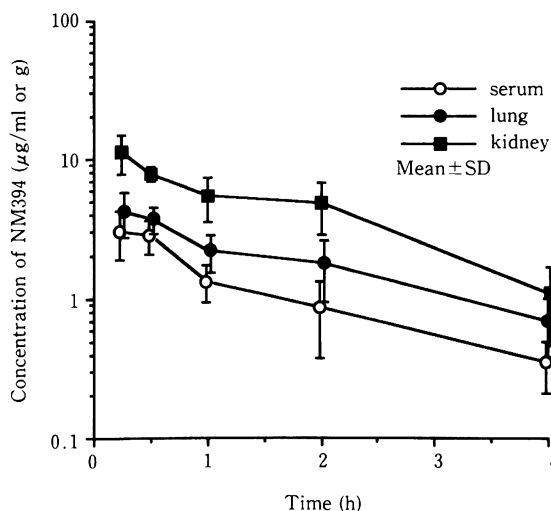


Fig. 5. Serum and tissue level of NM394 after oral administration of NM441 at a dose equivalent to 50mg of NM394/kg in mice.

力は接種菌量、培地種類および血清等の諸因子の影響をほとんど受けなかったが、酸性側の pH および 2mM の Al^{3+} の存在により抗菌力が減弱した。しかし、その程度は他の比較薬と同程度であった。抗菌薬の殺菌作用は MIC と MBC との差、および殺菌曲線により議論される場合が多い。NM394 の被検菌株に対する MIC と MBC はほぼ等しく、比較薬と同様に殺菌的な作用を示すと考えられる。*S. aureus* FDA 209P JC-1, *E. coli* KC-14, *S. marcescens* T-55 および *P. aeruginosa* E-2 に対する短時間殺菌作用は OFLX, CPFX より強く、MIC 以上の濃度を作用させることにより、短時間処理で顕著に菌数を減少させた。特に *P. aeruginosa* E-2 に対して NM394 は 1/2 MIC では 2 時間、MIC 以上では 1 時間の作用で生菌数を 1/100 以下に減少させ、*P. aeruginosa* に対する本薬の強い殺菌作用が確認された。NM394 の *E. coli* および *P. aeruginosa* の DNA gyrase 阻害活性は極めて強く、CPFX とほぼ同等であった。また、DNA gyrase 阻害活性と MIC はよく相関しており、他の同系薬剤と同様に、本薬の抗菌作用は DNA gyrase 阻害に基づくものと考えられる。以上の結果より、NM394 の特長として、強い DNA gyrase 阻害活性に基づく *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌群に対する優れた抗菌作用、特に強い殺菌作用を有することがあげられる。また、これらの特性は NM394 の thiazeto-quinoline 構造によるものと推察され、構造活性相関の面からも極めて興味深い。

しかしながら、NM394 を経口投与すると感染防御効果はほとんど認められず、腸管からの吸収不良が示唆されたため、これを改善すべくプロドラッグ NM441 が合成された。NM441 のマウス実験的全身感染モデルに対する感染防御作用を検討したところ、グラム陽性菌感染に対しては TFLX より劣ったものの、streptococci 感染に対して OFLX ならびに CPFX より優れていた。一方、グラム陰性菌感染ではほとんどの菌で比較薬剤中、最も低い ED_{50} 値を示した。また我々は、NM441 が呼吸器感染モデルにおいて OFLX および CPFX と同等以上の治療効果を示し、尿路感染モデルでは特に *P. aeruginosa* 感染に対し優れた治療効果を示すことを既に報告している¹⁾。このように NM441 が種々の感染モデル、特にグラム陰性菌感染モデルに対して他剤に勝るとも劣らない成績を示した要因として、活性本体である NM394 の *in vitro* 抗菌力、特に強い殺菌作用が生体内でも十分に反映している可能性が示唆された。

NM441 経口投与後の体内動態を検討したところ、本薬は経口投与後速やかに吸収され、主に血中、そして肝臓中で活性本体である NM394 へと代謝され^{2,8)}、肺および腎では血清中の 2~5 倍以上の濃度に達し、良好な組織移行性を示すことが確認された。

以上の結果から、NM441 は経口投与後、速やかに吸

収され、血中では NM394 として良好な組織移行性を示し、種々の菌株による全身および局所感染に対して NM394 の優れた抗菌力および殺菌力を反映した高い有効性を示すものと考えられる。このように *in vitro* および *in vivo* において優れた抗菌作用を有する NM441 は、臨床においても種々の感染症に対する優れた治療薬となることが期待される。

文 献

- 1) Ozaki M, et al: *In vivo* evaluation of NM441, a new thiazeto-quinoline derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2496~2499, 1991
- 2) Morino A, Okuyama Y, Momota K, Ohyabu M, Ushimaru K: Pharmacokinetics of NM441, a new quinolone, in laboratory animals. 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, 1992, abstr. 220
- 3) Ito S, Hirai K, Inoue M, Koga H, Suzue S, Irikura T, Mitsuhashi S: *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 103~108, 1980
- 4) Sato K, Matsuura Y, Inoue M, Une T, Osada Y, Ogawa H, Mitsuhashi S: *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 548~553, 1982
- 5) Wise R, Andrews J M, Edwards L J: *In vitro* activity of Bay o 9867, a new quinolone derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 559~564, 1983
- 6) Fujimaki K, Noumi T, Saikawa I, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-3262, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 827~833, 1988
- 7) Chu D T W, Fernandes P B: Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 131~135, 1989
- 8) Ozaki M, et al: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2490~2495, 1991
- 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: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 27: 559~560, 1979
- 11) 日本化学療法学会: 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法) - 日本化学療法学会標準法 - . *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 12) 日本化学療法学会: 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: 184~189, 1993
- 13) 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
- 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 Bacteriology* 169: 2322~2325, 1987

In vitro and *in vivo* antibacterial activities of a new quinolone, NM441

Yoshifumi Tomii, Masato Matsuda, Nobuko Sumimura, Masakuni Ozaki and Masahiro Kise
Discovery Research Laboratories II, Nippon Shinyaku Co., Ltd.
Nishiohji Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of NM441, a new prodrug type of quinolone derivative was compared with that of norfloxacin, ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX) and tosufloxacin (TFLX).

NM394, an active form of NM441, had broad spectrum of activity against gram-positive and gram-negative bacteria. The antibacterial activities of NM394 against gram-positive clinical isolates were inferior to those of TFLX but almost equal to or superior to those of OFLX and CPFX. Against gram-negative isolates, the activities of NM394 were equal to or superior to those of CPFX and TFLX and were clearly superior to those of OFLX.

The activity of NM394 was not affected by inoculum size, type of medium and horse serum, but decreased in acidic pH and in the presence of Al^{3+} .

NM394 showed bactericidal effect against various bacteria more potent than that of OFLX and CPFX. The bactericidal effect was more apparent against gram-negative bacteria that viable cells were markedly reduced within 1~2h.

NM441 was less active than TFLX against systemic infections in mice with gram-positive bacteria, but was more effective than OFLX and CPFX against infections with streptococci. The ED_{50} s of NM441 against gram-negative bacteria were lowest among the drugs tested.

After oral administration of 50mg/kg of NM441, the maximum serum concentration of NM394 in mice was 3.06 μ g/ml and the concentration ratios in lung and kidney were 1.3 and 5.6, respectively.