

新規キノロン系抗菌薬 NM441 に関する細菌学的評価

吉田卓史・三橋進

エビゾーム研究所*

新規のプロドラッグ型キノロン系抗菌薬 NM441 の活性本体 NM394 に関し、その *in vitro* 抗菌活性を norfloxacin(NFLX), ofloxacin(OFLX), ciprofloxacin(CPFX), tosufloxacin(TFLX) および sparfloxacin(SPFX) と比較検討し、次の結果を得た。

- 1) NM394 はグラム陽性菌からグラム陰性菌にわたる幅広い抗菌スペクトラムを示した。
- 2) NM394 は臨床分離のグラム陽性菌に対し OFLX および CPMX とほぼ同等の抗菌活性を示した。また、グラム陰性菌に対しても CPMX とほぼ同等の活性を示し、一部の腸内細菌科の菌種および *Pseudomonas aeruginosa* に対しては比較薬剤中最も優れた抗菌活性を示した。
- 3) NM394 は多くの臨床分離株に対して MIC 濃度で殺菌的に作用した。
- 4) NM394 の抗菌活性は接種菌量の影響をほとんど受けないが、Mg イオンの存在によりやや低下した。
- 5) NM394 の抗菌活性および殺菌力はヒト血清添加の影響をほとんど受けなかった。
- 6) NM394 を subMIC 濃度含有する培地で継代培養すると、各種細菌の本薬に対する感受性はやや低下した。
- 7) NM394 は *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* および *P. aeruginosa* 由来 DNA gyrase のスーパーコイリング活性を強く阻害した。

Key words: NM441, キノロン系抗菌薬, 抗菌活性, DNA gyrase, MBC

NM441 は、日本新薬株式会社において合成され、同社および明治製菓株式会社によって開発された新規のプロドラッグ型のキノロン系抗菌薬である。本薬は経口投与後キノリンカルボン酸骨格 7 位ピペラジニル基の 4 位のオキシジオキノリルメチル基が離脱し、速やかに活性本体 NM394 に変換される¹⁾。

今回我々は、活性本体 NM394 の *in vitro* 抗菌活性を norfloxacin(NFLX)²⁾, ofloxacin(OFLX)³⁾, ciprofloxacin(CPMX)⁴⁾, tosufloxacin(TFLX)⁵⁾ および sparfloxacin(SPFX)⁶⁾ と比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

NM394 は日本新薬および明治製菓, NFLX は杏林製菓, OFLX は第一製菓, CPMX はバイエル薬品, TFLX は富士化学工業, SPFX は大日本製菓, そして methicillin(DMPPC) および oxacillin(MPIP) は萬有製菓より分与を受けた。

2. 使用菌株

当研究所において保存されている標準菌株および臨床分離株(1984~1991年分離)を使用した。

3. 最小発育阻止濃度の測定

日本化学療法学会標準法^{7,8)} に準じ、寒天平板希釈法にて MIC を測定した。測定には、特に記さない限り Sensitivity disk agar-N(SDA; 日水製薬) および Sensitivity

test broth(STB; 日水製薬)を使用した。なお、streptococci には 5% 馬脱繊維血液(日本生物材料センター)を、*Haemophilus influenzae* には 5% Fildes enrichment(Difco) を添加した SDA を使用した。また、*Neisseria gonorrhoeae* の測定には 1% hemoglobin(Difco) および 1% Iso Vitale X(BBL)を加えた GC agar(Difco)を、嫌気性菌の測定には GAM agar(日水製薬)を用いた。

TFLX については、薬剤が難溶解性のため、25 μ g/ml 以下の濃度における抗菌活性を測定した。よって、それより高度の耐性を示した株は >25 μ g/ml として表示し、累積曲線は 25 μ g/ml の濃度までの結果を示した。

4. 最小殺菌濃度の測定

まず、試験菌株に対する MIC を Mueller-Hinton broth(MHB; Difco) を用いた液体希釈法で測定した。なお、この際の接種菌量は約 5×10^5 CFU/ml になるよう調製した。次に、肉眼的に菌の発育が認められない培養液中の生菌数を測定し、生残菌数が接種菌数の 0.1% 以下になる最小薬剤濃度を MBC とした。

5. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

1) 接種菌量の影響

37°C で一夜培養した菌液を菌量が $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml となるよう調製し、薬剤含有平板に接種して MIC を測定した。

2) Mg イオンの影響

SDA に 5mM の MgCl₂ を添加し、10⁶ CFU/ml の菌液を接種して MIC を測定した。

3) ヒト血清添加の影響

MHB にヒト血清 (Moni-Trol I ; Baxter) を 50% 添加し、96 穴マイクロプレートを用いた微量液体希釈法により MIC を求めた。さらに各ウェル内の生残菌数を測定し、接種菌数の 0.1% 以下となる最小薬剤濃度を MBC とした。

6. 試験管内耐性獲得試験

日本化学療法学会標準法に準じて測定した MIC の結果をもとに、各薬剤の 1/4MIC 濃度に当たる薬剤含有寒天平板より 1 白金耳量の菌をかきとり、約 10⁸ CFU/ml の菌液を調製した。これを 100 倍希釈し再度薬剤含有寒天平板に接種、MIC を測定した。これらの操作を各試験菌株について 11 回継続して行い、subMIC 濃度下での継代による MIC 値の変化を調べた。

7 DNA gyrase 阻害作用

Staphylococcus aureus SA113, *Escherichia coli* KL-16 および *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 より、既報⁹⁻¹¹⁾に従い DNA gyrase を精製した。得られた DNA gyrase を用い、弛緩型 pBR322 plasmid DNA に対するスーパーコイル活性に及ぼす薬剤の 50% 阻害濃度を求めた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

NM394 の標準菌株に対する抗菌活性を他のニューキノロン薬と比較し Table 1 に示した。NM394 は 7 株のグラム陽性菌に対し、TFLX および SPFX より劣るが OFLX および CPFX とほぼ同等の抗菌活性を示した。また、21 株のグラム陰性菌に対しては、CPFX および TFLX と同等の抗菌活性を示した。NM394 の抗菌スペクトラムは CPFX と同様の幅広いものであった。

2. 臨床分離株に対する抗菌活性

各種臨床分離株 (2,606 株) に対する NM394 および対照薬の抗菌活性を Table 2 に示した。184 株の DMPPC 耐性 *S. aureus* (MRSA ; MIC ≥ 12.5 μg/ml) に対する NM394 の MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 1.56 μg/ml および 100 μg/ml であり、MRSA の比較的多くの株が NM394 を含めニューキノロン薬に耐性化していた。NM394 は DMPPC 感受性 *S. aureus* (MSSA), *Staphylococcus epidermidis* および *Enterococcus faecalis* のうち 90% 以上の株に対し、0.78~1.56 μg/ml の濃度でその発育を阻止した。これは OFLX および CPFX とほぼ同等の値であった。また、*Streptococcus pyogenes* に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.39 μg/ml であり、これは TFLX および SPFX に匹敵する低い値であった。

Serratia marcescens を除く腸内細菌科, *H. influenzae*,

Table 1. Antibacterial activity of NM394 against standard strains of bacteria

Organism	MIC (μg/ml)					
	NM394	norfloxacin	ofloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin	sparfloxacin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	0.39	0.39	0.39	0.20	0.05	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.39	0.78	0.20	0.20	0.013	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0.78	3.13	0.39	0.78	0.025	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.20	1.56	0.78	0.20	0.10	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.05	0.10	0.05	0.025	0.013	0.025
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	0.78	3.13	1.56	0.39	0.10	0.20
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	1.56	12.5	3.13	1.56	0.78	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.013	0.05	0.05	0.013	0.013	0.013
<i>Escherichia coli</i> K-12 C600	0.013	0.05	0.10	0.025	0.025	0.025
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0.013	0.05	0.05	0.013	0.013	0.013
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.025	0.10	0.10	0.025	0.025	0.05
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	0.025	0.10	0.20	0.05	0.05	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PC1602	0.013	0.025	0.025	<0.013	<0.013	<0.013
<i>Salmonella typhimurium</i> IID971	0.025	0.05	0.10	0.013	0.025	0.025
<i>Salmonella typhi</i> 901	0.013	0.05	0.05	<0.013	<0.013	<0.013
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	0.013	0.025	0.025	<0.013	<0.013	<0.013
<i>Salmonella schottmuelleri</i> 8006	0.025	0.05	0.10	0.013	0.025	0.025
<i>Salmonella enteritidis</i> G14	0.013	0.025	0.025	<0.013	<0.013	<0.013
<i>Serratia marcescens</i> IAM1184	0.05	0.20	0.39	0.10	0.20	0.78
<i>Morganella morganii</i> IFO3848	0.025	0.05	0.05	0.013	0.10	0.10
<i>Proteus mirabilis</i> IFO3849	0.05	0.10	0.39	0.10	0.20	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.025	0.05	0.05	0.013	0.05	0.10
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	0.013	0.025	0.013	<0.013	<0.013	<0.013
<i>Providencia rettgeri</i> IFO3850	0.025	0.05	0.20	0.025	0.05	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3445	0.39	0.78	1.56	0.39	0.39	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	0.10	0.78	0.78	0.10	0.20	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	0.10	0.39	0.78	0.10	0.20	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	0.39	1.56	3.13	0.39	0.39	1.56

Table 2. Antibacterial activity of NM394 and the other quinolones against clinical isolates

Organism (no. tested)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*		
		range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant) (184)	NM394	0.20 ~ >100	1.56	100
	norfloxacin	0.78 ~ >100	6.25	>100
	ofloxacin	0.20 ~ >100	0.78	50
	ciprofloxacin	0.20 ~ >100	1.56	100
	tosufloxacin	0.025 ~ >25	0.05	12.5
	sparfloxacin	0.025 ~ 25	0.10	12.5
	methicillin	12.5 ~ >100	>100	>100
	oxacillin	0.78 ~ >100	100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-susceptible) (96)	NM394	0.10 ~ 6.25	0.39	0.78
	norfloxacin	0.39 ~ 12.5	1.56	3.13
	ofloxacin	0.20 ~ 1.56	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.10 ~ 3.13	0.39	1.56
	tosufloxacin	0.013 ~ 0.10	0.025	0.05
	sparfloxacin	0.025 ~ 0.20	0.05	0.20
	methicillin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	oxacillin	0.10 ~ 50	0.39	3.13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (66)	NM394	0.20 ~ 1.56	0.39	0.78
	norfloxacin	0.39 ~ 6.25	0.78	1.56
	ofloxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.39
	ciprofloxacin	0.10 ~ 1.56	0.20	0.39
	tosufloxacin	0.025 ~ 0.10	0.05	0.05
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (32)	NM394	0.78 ~ 50	1.56	6.25
	norfloxacin	3.13 ~ 100	12.5	50
	ofloxacin	0.78 ~ 50	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 50	1.56	6.25
	tosufloxacin	0.10 ~ 12.5	0.20	0.39
	sparfloxacin	0.10 ~ 6.25	0.20	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> (91)	NM394	0.10 ~ 1.56	0.20	0.39
	norfloxacin	0.78 ~ 50	1.56	3.13
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	0.78	1.56
	ciprofloxacin	0.20 ~ 3.13	0.39	0.78
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.10	0.20
	sparfloxacin	0.10 ~ 12.5	0.20	0.78
<i>Enterococcus faecalis</i> (99)	NM394	0.39 ~ 6.25	1.56	1.56
	norfloxacin	1.56 ~ 25	3.13	6.25
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.10 ~ 0.39	0.20	0.39
	sparfloxacin	0.20 ~ 0.78	0.39	0.78
<i>Enterococcus faecium</i> (100)	NM394	0.20 ~ 100	1.56	12.5
	norfloxacin	0.39 ~ >100	3.13	50
	ofloxacin	0.78 ~ 100	3.13	25
	ciprofloxacin	0.10 ~ 100	1.56	12.5
	tosufloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	6.25
	sparfloxacin	0.10 ~ 25	0.39	3.13
<i>Escherichia coli</i> (108)	NM394	0.013 ~ 1.56	0.025	0.025
	norfloxacin	0.025 ~ 3.13	0.05	0.10
	ofloxacin	0.025 ~ 12.5	0.10	0.10
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~ 1.56	0.013	0.025
	tosufloxacin	0.013 ~ 3.13	0.025	0.05
	sparfloxacin	0.013 ~ 3.13	0.025	0.05

* 50% and 90% MICs for 50 and 90% of strains tested, respectively

Table 2. continued

Organism (no. tested)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$) *			
		range		50%	90%
<i>Citrobacter freundii</i> (95)	NM394	0.013~	0.78	0.05	0.39
	norfloxacin	0.025~	3.13	0.10	0.78
	ofloxacin	0.05 ~	6.25	0.20	1.56
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	1.56	0.025	0.20
	tosufloxacin	0.013~	3.13	0.05	0.78
	sparfloxacin	0.025~	6.25	0.10	1.56
<i>Enterobacter cloacae</i> (105)	NM394	0.013~	3.13	0.025	0.10
	norfloxacin	0.025~	25	0.10	0.78
	ofloxacin	0.025~	12.5	0.10	0.78
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	3.13	0.025	0.10
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~	3.13	0.025	0.20
	sparfloxacin	≤ 0.006 ~	3.13	0.05	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (127)	NM394	0.013~	0.78	0.025	0.05
	norfloxacin	0.025~	6.25	0.10	0.39
	ofloxacin	0.05 ~	3.13	0.10	0.20
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.78	0.025	0.05
	tosufloxacin	0.013~	0.78	0.025	0.10
	sparfloxacin	0.013~	0.78	0.05	0.10
<i>Klebsiella oxytoca</i> (104)	NM394	0.013~	0.05	0.025	0.025
	norfloxacin	0.025~	0.39	0.10	0.10
	ofloxacin	0.025~	0.39	0.10	0.10
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.05	0.013	0.025
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~	0.10	0.025	0.025
	sparfloxacin	0.013~	0.20	0.05	0.10
<i>Salmonella</i> spp. (103)	NM394	0.025~	0.10	0.05	0.10
	norfloxacin	0.05 ~	0.20	0.10	0.20
	ofloxacin	0.05 ~	0.20	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.013~	0.025	0.025	0.025
	tosufloxacin	0.013~	0.05	0.025	0.05
	sparfloxacin	≤ 0.006 ~	0.05	0.05	0.05
<i>Shigella</i> spp. (108)	NM394	0.013~	0.10	0.013	0.025
	norfloxacin	0.025~	0.39	0.05	0.05
	ofloxacin	0.025~	0.78	0.05	0.10
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.20	0.013	0.013
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~	0.20	0.013	0.013
	sparfloxacin	≤ 0.006 ~	0.39	0.013	0.025
<i>Proteus mirabilis</i> (100)	NM394	0.013~	0.20	0.025	0.025
	norfloxacin	0.05 ~	0.78	0.05	0.10
	ofloxacin	0.05 ~	0.78	0.10	0.20
	ciprofloxacin	0.013~	0.20	0.025	0.05
	tosufloxacin	0.05 ~	0.39	0.10	0.10
	sparfloxacin	0.05 ~	1.56	0.20	0.20
<i>Proteus vulgaris</i> (94)	NM394	0.025~	0.20	0.025	0.10
	norfloxacin	0.025~	0.39	0.05	0.10
	ofloxacin	0.05 ~	1.56	0.10	0.39
	ciprofloxacin	0.013~	0.39	0.025	0.10
	tosufloxacin	0.025~	1.56	0.05	0.39
	sparfloxacin	0.10 ~	3.13	0.20	0.78
<i>Morganella morganii</i> (70)	NM394	0.013~	12.5	0.025	0.025
	norfloxacin	0.025~	50	0.05	0.05
	ofloxacin	0.05 ~	25	0.10	0.20
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	12.5	0.013	0.025
	tosufloxacin	0.013~	12.5	0.05	0.10
	sparfloxacin	0.05 ~	25	0.10	0.20

* 50% and 90%, MICs for 50 and 90% of strains tested, respectively

Table 2. continued

Organism (no. tested)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*			
		range		50%	90%
<i>Providencia rettgeri</i> (35)	NM394	0.013~	1.56	0.05	0.78
	norfloxacin	0.05 ~	3.13	0.10	3.13
	ofloxacin	0.05 ~	6.25	0.39	6.25
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	3.13	0.05	0.78
	tosufloxacin	0.013~	1.56	0.10	0.78
	sparfloxacin	0.025~	6.25	0.20	3.13
<i>Providencia stuartii</i> (74)	NM394	0.025~	0.78	0.39	0.39
	norfloxacin	0.05 ~	3.13	0.78	1.56
	ofloxacin	0.05 ~	1.56	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.013~	0.78	0.10	0.39
	tosufloxacin	0.013~	0.39	0.10	0.20
	sparfloxacin	0.013~	0.39	0.20	0.39
<i>Serratia marcescens</i> (105)	NM394	0.025~	25	0.78	12.5
	norfloxacin	0.05 ~	100	3.13	50
	ofloxacin	0.10 ~	50	1.56	25
	ciprofloxacin	0.025~	25	0.78	6.25
	tosufloxacin	0.025~	25	0.78	6.25
	sparfloxacin	0.05 ~	25	0.78	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC to norfloxacin $\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$) (203)	NM394	0.05 ~	3.13	0.20	0.78
	norfloxacin	0.20 ~	6.25	0.78	3.13
	ofloxacin	0.39 ~	25	1.56	6.25
	ciprofloxacin	0.05 ~	6.25	0.20	1.56
	tosufloxacin	0.05 ~	12.5	0.39	1.56
	sparfloxacin	0.20 ~	25	1.56	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC to norfloxacin $> 6.25 \mu\text{g/ml}$) (162)	NM394	1.56 ~	>100	25	50
	norfloxacin	12.5 ~	>100	100	>100
	ofloxacin	3.13 ~	>100	100	>100
	ciprofloxacin	1.56 ~	>100	50	>100
	tosufloxacin	0.39 ~	>25	>25	>25
	sparfloxacin	1.56 ~	>100	100	>100
<i>Burkholderia cepacia</i> (44)	NM394	3.13 ~	>100	12.5	25
	norfloxacin	6.25 ~	>100	25	50
	ofloxacin	6.25 ~	>100	12.5	25
	ciprofloxacin	1.56 ~	>100	6.25	25
	tosufloxacin	0.78 ~	>25	6.25	12.5
	sparfloxacin	0.78 ~	100	12.5	25
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (48)	NM394	1.56 ~	25	6.25	12.5
	norfloxacin	6.25 ~	50	12.5	25
	ofloxacin	0.78 ~	12.5	3.13	6.25
	ciprofloxacin	0.39 ~	12.5	3.13	6.25
	tosufloxacin	0.10 ~	3.13	0.39	0.78
	sparfloxacin	0.05 ~	3.13	0.39	1.56
<i>Acinetobacter</i> spp. (35)	NM394	0.20 ~	6.25	0.78	3.13
	norfloxacin	0.78 ~	25	3.13	6.25
	ofloxacin	0.20 ~	1.56	0.20	0.78
	ciprofloxacin	0.05 ~	3.13	0.20	0.78
	tosufloxacin	0.013~	0.20	0.025	0.10
	sparfloxacin	0.013~	0.10	0.025	0.05
<i>Haemophilus influenzae</i> (65)	NM394	0.013~	0.05	0.025	0.05
	norfloxacin	0.025~	0.10	0.05	0.05
	ofloxacin	0.025~	0.10	0.025	0.05
	ciprofloxacin	≤ 0.006 ~	0.025	0.013	0.013
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~	0.013	≤ 0.006	≤ 0.006
	sparfloxacin	≤ 0.006 ~	0.10	0.013	0.013

* 50% and 90%, MICs for 50 and 90% of strains tested, respectively

Table 2. continued

Organism (no. tested)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*			
		range		50%	90%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (47)	NM394	$\leq 0.006 \sim$	0.39	0.013	0.10
	norfloxacin	$\leq 0.006 \sim$	1.56	0.025	0.39
	ofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.39	≤ 0.006	0.05
	ciprofloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.05	≤ 0.006	0.025
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.10	≤ 0.006	0.013
	sparfloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.10	≤ 0.006	0.013
<i>Moraxella catarrhalis</i> (41)	NM394	0.05 ~	0.78	0.10	0.78
	norfloxacin	0.05 ~	1.56	0.39	0.78
	ofloxacin	0.05 ~	0.78	0.10	0.39
	ciprofloxacin	0.025 ~	0.39	0.05	0.39
	tosufloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.10	0.025	0.05
	sparfloxacin	$\leq 0.006 \sim$	0.20	0.025	0.20
<i>Bacteroides fragilis</i> (32)	NM394	3.13 ~	>100	12.5	50
	norfloxacin	25 ~	>100	50	>100
	ofloxacin	1.56 ~	50	3.13	12.5
	ciprofloxacin	3.13 ~	>100	12.5	50
	tosufloxacin	0.39 ~	6.25	0.39	1.56
	sparfloxacin	0.78 ~	6.25	1.56	3.13
<i>Clostridium perfringens</i> (16)	NM394	0.39 ~	25	0.39	1.56
	norfloxacin	1.56 ~	>100	1.56	12.5
	ofloxacin	0.78 ~	3.13	0.78	3.13
	ciprofloxacin	0.39 ~	25	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.10 ~	0.78	0.20	0.39
	sparfloxacin	0.05 ~	1.56	0.39	1.56
<i>Clostridium difficile</i> (17)	NM394	12.5 ~	12.5	12.5	12.5
	norfloxacin	50 ~	100	50	100
	ofloxacin	6.25 ~	12.5	6.25	12.5
	ciprofloxacin	6.25 ~	12.5	6.25	12.5
	tosufloxacin	1.56 ~	1.56	1.56	1.56
	sparfloxacin	3.13 ~	6.25	6.25	6.25

* 50% and 90%, MICs for 50 and 90% of strains tested, respectively

N. gonorrhoeae および *Moraxella catarrhalis* に対する NM394 の MIC₉₀ はいずれも 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、優れた抗菌活性を示していた。*P. aeruginosa* については、NFLX に対する感受性で菌株を 2 群に分けて示した。また、Fig. 1 にそれらの菌株に対する MIC 累積曲線を、さらに Fig. 2 には OFLX, CPFX および TFLX に対する感受性と、NM394 に対する感受性との間の相関図を示した。ニューキノロン薬感受性 *P. aeruginosa* (NFLX の MIC₉₀ ; $\leq 6.25\mu\text{g/ml}$) に対する NM394 の MIC₉₀ は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であり、比較薬剤中最も優れた値であった。ニューキノロン薬耐性 *P. aeruginosa* (NFLX の MIC₉₀ ; $> 6.25\mu\text{g/ml}$) 162 株は対照薬と同様に NM394 に対しても耐性化していたが、その MIC₅₀ および MIC₉₀ はそれぞれ 25 および 50 $\mu\text{g/ml}$ であり、比較薬剤中最も優れた値であった。

嫌気性菌に対する NM394 の抗菌活性は菌株によりやや異なるが、概ね OFLX および CPFX とほぼ同等であった。

多くの臨床分離株について、NM394 および対照ニューキノロン薬の抗菌活性を測定した結果、本薬の抗

菌活性はグラム陽性菌で OFLX および CPFX とほぼ同等、グラム陰性菌で CPFX とほぼ同等であった。

3. MIC と MBC

臨床分離株を用い液体培養法により測定した MIC および MBC を CPFX, TFLX および SPFX と比較し、Table 3 に示した。10 株の *S. aureus* に対する NM394 の MBC₉₀ は MIC₉₀ と同じ 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であったが、対照薬ではいずれの場合も MBC₉₀ が 1 管以上上昇していた。*E. coli* および *S. marcescens* では、NM394 を含めすべての薬剤において MIC₉₀ と MBC₉₀ が等しかった。また、13 株の *P. aeruginosa* に対する NM394 の MBC₉₀ は対照薬の場合と同様に MIC₉₀ に比較し 1 管上昇していた。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

NM394 および対照薬の抗菌力に及ぼす接種菌量、Mg イオンならびにヒト血清添加の影響について調べた結果を Table 4 および Table 5 に示した。10⁶~10⁸ CFU/ml に調製した菌液を接種した場合、測定した 9 株に対する NM394 および CPFX の MIC にはほとんど変化がみられなかった。また、5mM の MgCl₂ を培地に添加すると、

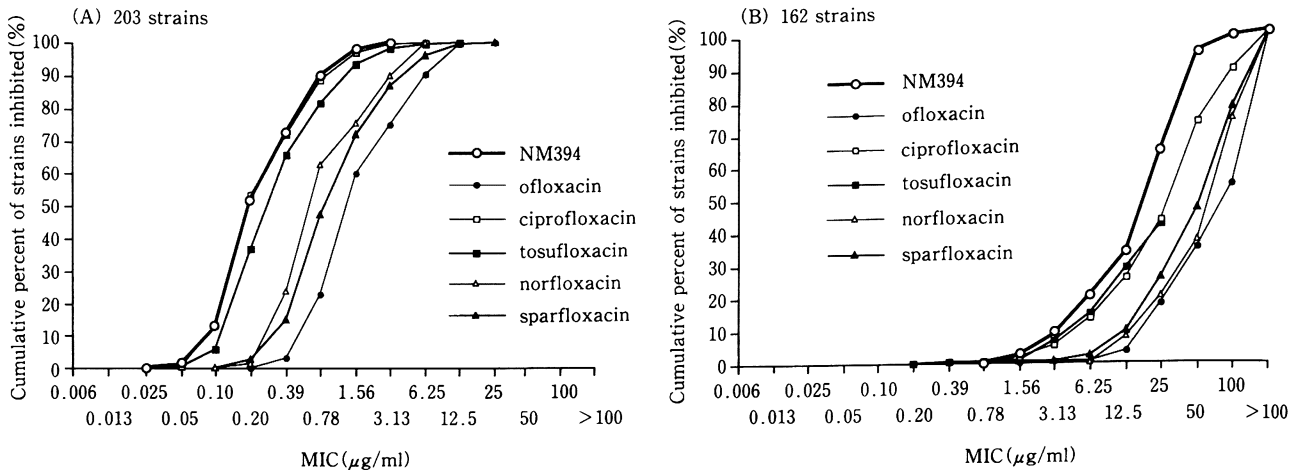


Fig. 1. Sensitivity distribution of clinical isolates of norfloxacin-susceptible (A: MIC ≤ 6.25 μg/ml) and -resistant (B: MIC > 6.25 μg/ml) *Pseudomonas aeruginosa*

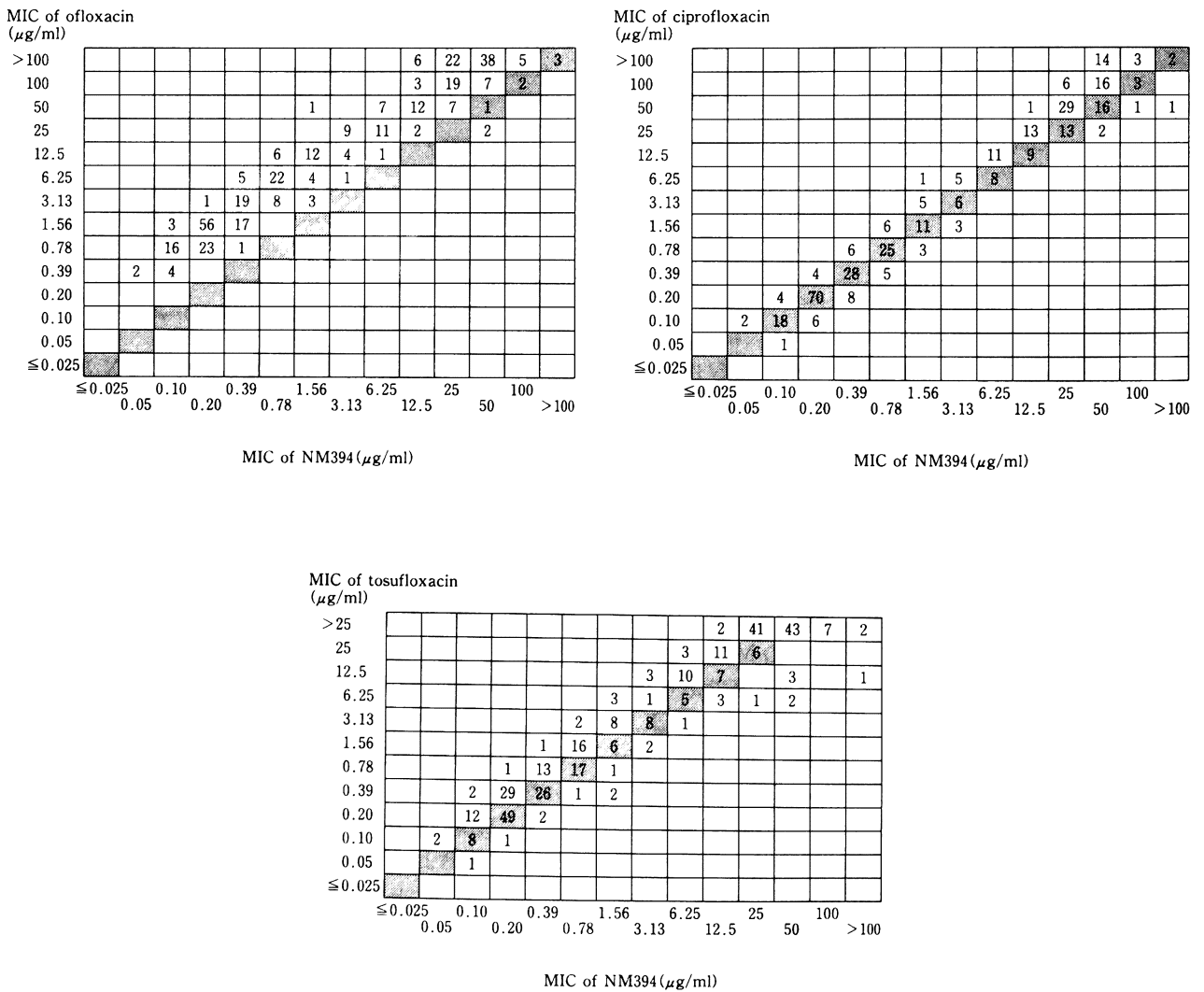


Fig. 2. Correlogram of MICs against 365 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Table 3. Bactericidal activity of NM394 and the other quinolones against clinical isolates

Organism (no. tested)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		MBC ($\mu\text{g/ml}$)	
		range	90%*	range	90%*
<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	NM394	0.39 ~ 3.13	0.78	0.39 ~ 3.13	0.78
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	0.39 ~ 6.25	1.56
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.10	0.10	0.05 ~ 0.20	0.20
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.20	0.10	0.10 ~ 0.39	0.39
<i>Escherichia coli</i> (10)	NM394	0.013~ 0.05	0.025	0.013~ 0.05	0.025
	ciprofloxacin	0.013~ 0.05	0.025	0.013~ 0.05	0.025
	tosufloxacin	≤ 0.006 ~ 0.05	0.05	≤ 0.006 ~ 0.05	0.05
	sparfloxacin	≤ 0.006 ~ 0.05	0.05	0.013~ 0.05	0.05
<i>Serratia marcescens</i> (11)	NM394	0.10 ~ 1.56	1.56	0.10 ~ 1.56	1.56
	ciprofloxacin	0.20 ~ 6.25	6.25	0.20 ~ 6.25	6.25
	tosufloxacin	0.20 ~ 3.13	3.13	0.39 ~ 3.13	3.13
	sparfloxacin	0.78 ~25	6.25	1.56 ~25	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (13)	NM394	0.10 ~ 0.78	0.39	0.39 ~ 0.78	0.78
	ciprofloxacin	0.39 ~ 0.78	0.78	0.78 ~ 1.56	1.56
	tosufloxacin	0.10 ~ 0.78	0.78	0.39 ~ 1.56	1.56
	sparfloxacin	0.78 ~ 3.13	3.13	1.56 ~ 6.25	6.25

Range of the initial inoculum sizes against *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens* and *P. aeruginosa* were $5.0 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^6$, $5.1 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^6$, $8.9 \times 10^5 \sim 4.4 \times 10^6$ and $6.7 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^6$ CFU/ml, respectively.

* 90%, MICs or MBCs for 90% of strains tested.

Table 4. Effect of inoculum size and magnesium ion on the antibacterial activity of NM394 and ciprofloxacin

Organism	MIC of NM394 ($\mu\text{g/ml}$)				MIC of ciprofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)			
	10 ⁶ *	10 ⁷ *	10 ⁸ *	5mM MgCl ₂	10 ⁶ *	10 ⁷ *	10 ⁸ *	5mM MgCl ₂
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.20	0.20	0.20	0.78	0.10	0.20	0.20	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.20	0.20	0.39	0.78	0.39	0.39	0.78	0.78
<i>Escherichia coli</i> ML4707	0.013	0.013	0.025	0.10	0.013	0.013	0.013	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GN6445	0.013	0.025	0.025	0.05	0.025	0.025	0.025	0.05
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.05	0.05	0.05	0.20	0.05	0.05	0.05	0.10
<i>Citrobacter freundii</i> GN16927	0.025	0.025	0.025	0.10	0.025	0.05	0.05	0.05
<i>Serratia marcescens</i> GN7577	0.78	0.78	1.56	3.13	1.56	3.13	3.13	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	0.013	0.013	0.025	0.05	0.013	0.025	0.025	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	0.20	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39	0.78	0.78

agar dilution method, *: inoculum size(CFU/ml)

Table 5. Effect of human serum on the antibacterial and bactericidal activity of NM394 and the other quinolones

Organism	Human serum (%)	NM394		ofloxacin		ciprofloxacin		sparfloxacin	
		MIC*	MBC**	MIC*	MBC**	MIC*	MBC**	MIC*	MBC**
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0	0.10	0.20	0.20	0.39	0.05	0.05	0.05	0.05
	50	0.20	0.20	0.39	0.39	0.20	0.20	0.05	0.10
<i>Escherichia coli</i> ML4707	0	0.006	0.006	0.025	0.05	0.006	0.006	0.006	0.013
	50	0.013	0.013	0.025	0.025	0.013	0.013	0.013	0.013
<i>Serratia marcescens</i> GN7577	0	0.20	0.20	1.56	3.13	0.78	1.56	0.78	3.13
	50	0.20	0.20	1.56	1.56	0.39	0.39	1.56	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	0	0.20	0.20	1.56	3.13	0.20	0.39	0.78	1.56
	50	0.10	0.39	0.78	3.13	0.10	0.39	0.39	1.56

*: $\mu\text{g/ml}$, micro broth dilution method

** : $\mu\text{g/ml}$, the concentration produced $\geq 99.9\%$ reduction in CFU

無添加で 10^6 CFU/ml の菌液を接種した場合と比較し、NM394 の MIC はほとんどの菌株で約 2 管上昇した。データは示していないが、CPFX 以外のニューキノロン薬においても、5mM の $MgCl_2$ の添加により MIC が 1 ~ 2 管上昇した。ヒト血清を培地に 50% 添加した場合、NM394 の試験菌株に対する MIC および MBC は無添加の場合とほとんど変わらなかった。対照に用いた薬剤では、*S. aureus* において CPFX の MIC および MBC が血清の添加により 2 管上昇した。また、*P. aeruginosa* では、血清を添加した場合すべての薬剤の MBC が MIC より 2 管上昇した。

5 試験管内における耐性獲得

subMIC 濃度の薬剤を含有する培地で継代した際の各種細菌のニューキノロン感受性の変化を Fig. 3 に示し

た。*S. aureus* では、NM394 の MIC は 11 回の継代により 2 管上昇し、OFLX および TFLX でも 4 回の継代でそれぞれ 2 および 3 管上昇した。NFLX および CPFX においては試験期間中 MIC に変化がなかった。*E. coli* においてはほとんどの薬剤で MIC の変動はわずかであったが、TFLX を含む培地で継代した場合、最終的に MIC が 3 管上昇した。*P. aeruginosa* の場合、CPFX の MIC は継代により 4 管上昇し、NM394 を含めたその他の薬剤では 2 管の上昇が認められた。

6. DNA gyrase 阻害活性

S. aureus, *E. coli* および *P. aeruginosa* より精製した DNA gyrase のスーパーコイル活性に対する各ニューキノロン薬の 50% 阻害濃度を Table 6 に示した。NM394 におけるそれら DNA gyrase に対する 50% 阻

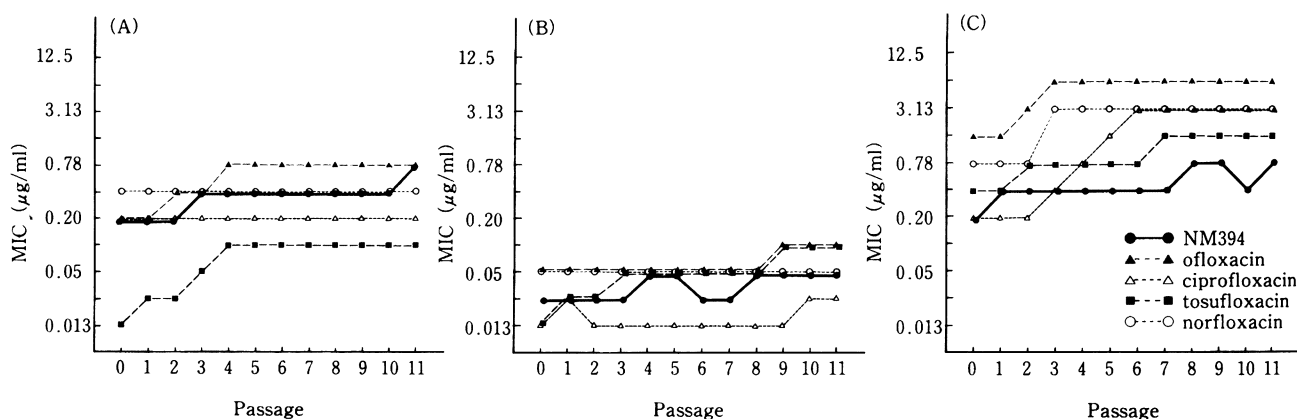


Fig. 3. Effect of passage on the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* Smith (A), *Escherichia coli* ML4707 (B) and *Pseudomonas aeruginosa* GN11189 (C)

Table 6. Inhibitory activity of NM394 against DNA gyrase supercoiling activity

Organism	Compound	MIC* ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ** ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> SA113	NM394	0.39	18.0
	norfloxacin	0.78	75.0
	ofloxacin	0.39	38.5
	ciprofloxacin	0.39	26.5
	tosufloxacin	0.025	15.5
	sparfloxacin	0.05	15.0
<i>Escherichia coli</i> KL-16	NM394	0.013	0.41
	norfloxacin	0.05	0.96
	ofloxacin	0.05	1.09
	ciprofloxacin	0.013	0.24
	tosufloxacin	0.025	0.55
	sparfloxacin	0.013	0.35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NM394	0.20	2.05
	norfloxacin	0.78	4.03
	ofloxacin	0.78	4.17
	ciprofloxacin	0.20	1.82
	tosufloxacin	0.20	2.21
	sparfloxacin	0.78	2.16

* agar dilution method

** IC₅₀, 50% inhibitory concentration

害濃度は、それぞれ 18.0, 0.41 および 2.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、いずれの菌株においても概ね CPFX, TFLX および SPFX と同等であった。また、NFLX および OFLX の 50% 阻害濃度と比較すると、NM394 の値はいずれの菌株においてもそれらより低かった。

III. 考 察

NFLX の合成を発端に始まった我が国におけるニューキノロン薬の開発は、現在までに 9 薬剤が上市される程めざましい発展を遂げている。一般にニューキノロン薬ではキノロンカルボン酸骨格の 1, 7, 5 および 8 位を修飾した化合物について検討される場合が多いが、新規ニューキノロン薬 NM441 は基本骨格の 1 位と 2 位を S 原子を介して環状にし、またプロドラッグ型というユニークな性質を有している。今回我々は、NM441 の活性本体 NM394 について、*in vitro* 抗菌活性を既存薬剤と比較検討した。

各種臨床分離株に対する NM441 の活性本体 NM394 の抗菌活性を測定した結果、本薬はグラム陽性菌に対し概ね OFLX と同等の抗菌活性を示した。また、腸内細菌を中心としたグラム陰性菌に対しては概ね CPFX と同等の抗菌活性を示し、同系の薬剤の中では最も優れた活性を示す部類に属していた。そして、ニューキノロン薬の作用機作である DNA gyrase 阻害活性を調べたところ、NM394 は比較的低濃度でスーパーコイル活性を阻害し、本薬の優れた抗菌力とその強い酵素阻害活性を基に生じていることが明らかとなった。また、ニューキノロン薬の特徴である強い殺菌力を NM394 も有し、種々の因子がその抗菌活性に与える影響および *in vitro* における耐性獲得については他のニューキノロン薬と同様の性質を有していた。

近年、初期のニューキノロン薬に比べグラム陽性菌に対する抗菌力を高めた薬剤が発売されている^{5,6)}。しかし、いずれの薬剤も緑膿菌感染症に対する臨床効果は十分満足できるものとはいえない。今回の検討の結果、NM441 の活性本体 NM394 はグラム陽性菌からグラム陰性菌にわたるブロードな抗菌活性に加え、特に緑膿菌において既存薬剤中最も抗菌活性が優れているといわれる CPFX および TFLX と同等以上の抗菌活性を示した (Table 2 および Fig. 1)。

Fig. 1 の累積曲線を見ると、NFLX に 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の MIC を示した株 (A) では、NM394 の曲線は CPFX のそれとほぼ完全に重なり、それらは同等の抗菌活性であった。しかし、NFLX に 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の MIC を示した株 (B) では、耐性度が高くなるに従い NM394 の抗菌活性が優れるようになった。この現象は感受性相関図上にもはっきりと現れていた。また、Fig. 1 において対照薬に注目すると、NFLX に 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の MIC を示した株では、CPFX の抗菌活性は TFLX より、NFLX の抗菌活性は SPFX よりそれぞれ優れているが、NFLX

の MIC が 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の株では、それらは同等かまたは逆転していた。つまり、NM394 と同様の現象が TFLX および SPFX でも認められた。緑膿菌におけるニューキノロン薬耐性機構は DNA gyrase の薬剤感受性の低下あるいは薬剤の菌体膜透過性の低下であるといわれている^{11,12)}。よって、耐性菌において NM394 の抗菌活性が CPFX のそれより優れていた理由として、本薬がそれら耐性変化の影響を受けにくいことが考えられた。より有用なニューキノロン薬を開発していく上でも、その詳細について今後検討していく必要があるといえよう。

NM441 がヒトに経口投与され活性本体 NM394 に変換された後の体内動態は、CPFX および TFLX より優れていることが既に報告されている¹³⁻¹⁵⁾。以上のことより、本薬は既存薬では十分な臨床効果の得られない緑膿菌感染症を含め、種々の原因菌によって引き起こされる感染症に対し、優れた効果が期待できる薬剤となるであろう。

文 献

- 1) 名出頼男, 副島林造: 第 42 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。NM441, 名古屋, 1994
- 2) Ito A, 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
- 3) 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
- 4) Wise R, Andrews J M, Edwards L J: *In vitro* activity of Bay o 9867, a new quinolone derivative, compared with those of other antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 559~564, 1983
- 5) 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
- 6) Kojima T, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* activity of AT-4140 against clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1980~1988, 1989
- 7) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 8) 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
- 9) Nakanishi N, Yoshida S, Wakebe H, Inoue M, Yamaguchi T, Mitsuhashi S: Mechanisms of clinical resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2562~2567, 1991
- 10) 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

- 11) Inoue Y, Sato K, Fujii T, Hirai K, Inoue M, Iyobe S, Mitsuhashi S: Some properties of subunits of DNA gyrase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and its nalidixic acid-resistant mutant. *J Bacteriol* 169: 2322~2325, 1987
- 12) Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 582~586, 1987
- 13) 中島光好, 植松俊彦, 小菅和仁: NM441 の臨床第 I 相試験。日化療会誌 44(S-1): 180~206, 1996
- 14) 小林宏行, 志村政文: Bay o 9867 (ciprofloxacin) の臨床第一相試験。Chemotherapy 33: 140~170, 1985
- 15) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆, 保田 隆, 渡辺泰雄, 田井 賢: T-3262 の臨床第一相試験。Chemotherapy 36: 158~180, 1988

In vitro antibacterial activity of NM394, active form of NM441, a new quinolone

Takuji Yoshida and Susumu Mitsuhashi

Episome Institute

2220 Kogure, Fujimi-mura, Seta-gun, Gunma 371-01, Japan

The *in vitro* antibacterial activity of NM394, the active form of the prodrug NM441, was compared with that of norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), tosufloxacin (TFLX) and sparfloxacin (SPFX). The results may be summarized as follows:

1) NM394 demonstrated broad-spectrum antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria.

2) The activity of NM394 against gram-positive clinical isolates was comparable to that of OFLX and CPFX. Against gram-negative isolates, NM394 showed antibacterial activity equal to that of CPFX, but showed the greatest activity for all compounds tested against a part of strains *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

3) NM394 showed bactericidal action at the MIC against a variety of clinical isolates.

4) The activity of NM394 was unaffected by inoculum size, but slightly decreased in the presence of magnesium ions.

5) The antibacterial and bactericidal activity of NM394 was unaffected by human serum.

6) The susceptibilities of bacteria to NM394 were slightly decreased by passage in the presence of a subMIC concentration of NM394.

7) NM394 strongly inhibited the supercoiling activities of DNA gyrase purified from *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*.