

新規キノロン系抗菌薬 NM441 の緑膿菌に対する *in vitro* および *in vivo* 有効性評価

吉田 卓史・原 哲郎・宮田 愛子・荒明美奈子・河原條勝己

明治製菓株式会社薬品総合研究所*

新規キノロン系抗菌薬 NM441 について、*in vitro* および *in vivo* における緑膿菌に対する有効性を既存ニューキノロン薬と比較検討し、以下の結果を得た。

1) 臨床分離緑膿菌に対する活性本体 NM394 の抗菌力は ciprofloxacin (CPFX) とほぼ同等であったが、ニューキノロンに対し感受性の低い菌株においては NM394 の抗菌力がやや優っていた。

2) NM394 は液体培地内において、対照薬より低濃度、短時間で緑膿菌に対し殺菌的に作用した。

3) ヒト血清を添加した液体培地内においても、NM394 は対照薬に比較し短時間で殺菌作用を示した。

4) NM394 は強い殺菌力を示したため、2MIC 以上の濃度における postantibiotic effect (PAE) は算出不可能であった。1MIC 濃度における NM394 の PAE は ofloxacin (OFLX) および CPFX よりやや長く、tosufloxacin (TFLX) よりやや短かった。

5) マウスを用いた実験的緑膿菌尿路感染モデル、呼吸器感染モデルおよび熱傷感染モデルに対する NM441 の治療効果は、対照として用いた OFLX, CPFX, TFLX あるいは lomefloxacin (LFLX) より優れていた。

6) Carboxymethyl cellulose (CMC) ポーチ内緑膿菌感染モデルにおけるポーチ内 NM394 濃度は、OFLX より低く、CPFX および TFLX より高かった。また、ポーチ内生菌数は NM441 投与群において最も速やかに減少した。

Key words: NM441, 緑膿菌, 殺菌力, postantibiotic effect, 局所感染治療実験

NM441 は、日本新薬株式会社および明治製菓株式会社で共同開発中の新規キノロン系抗菌薬である。本薬は同系で初のプロドラッグ型薬剤であり、動物体内で速やかに NM394 に変換され抗菌活性を発揮することが明らかとなっている¹⁾。その活性本体 NM394 は、グラム陽性菌からグラム陰性菌にかけて幅広い抗菌スペクトラムを有し、各種臨床分離菌株に対し既存薬 ciprofloxacin (CPFX) と同様の抗菌活性を示すことが報告されているが²⁾、その中で緑膿菌に対しては CPFX よりやや優れた抗菌活性が認められている。我々は NM441 の特に緑膿菌に対する有効性について、*in vitro* および *in vivo* の両面から評価を行い、norfloxacin (NFLX)³⁾、ofloxacin (OFLX)⁴⁾、CPFX⁵⁾、tosufloxacin (TFLX)⁶⁾ あるいは lomefloxacin (LFLX)⁷⁾ と比較した。なお、本検討において *in vitro* では活性本体 NM394 を、*in vivo* では NM441 を用いた。

I 実験材料および方法

1 使用薬剤

NM394 および NM441 は日本新薬株式会社で合成された原薬を、NFLX および CPFX は購入品 (Sigma chemical) および製剤からの抽出品を、OFLX, TFLX および LFLX は製剤からの抽出品を使用した。

2 使用菌株

1992 年に全国の医療機関で分離され、明治製菓株式会社薬品総合研究所に保存されている緑膿菌を使用した。

3 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会標準法⁸⁾ に準じ、Sensitivity disk agar-N (SDA; 日水製薬) を用いた寒天平板希釈法により測定した。

TFLX については、薬剤の溶解度のため、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 増殖曲線に及ぼす影響

1) 液体培地中殺菌曲線

一夜培養した *Pseudomonas aeruginosa* PRC-32 の菌液を新鮮な Sensitivity test broth (STB; 日水製薬) に接種し、37°C、2 時間振盪培養した。その後、各薬剤を最終濃度が 1/4~4MIC になるよう添加し、経時的に一部を採取して生菌数を測定した。なお、各サンプル 50 μ l 中の生菌数を測定した結果、5 コロニー以上の生育が認められた場合のみデータとして採用した。

2) ヒト血清加培地中殺菌曲線

ヒト非働化血清 (Irvine Scientific) を 20% 添加した STB を用い、1) と同様に生菌数を測定した。なお、試験菌株は *P. aeruginosa* PRC-25 を用い、薬剤濃度は 1/2~4MIC になるよう調製した。

5. Postantibiotic effect (PAE) の測定

各種濃度の薬剤を含有した液体培地にて 35°C、1 時間

振盪培養した *P. aeruginosa* PRC-32 の菌液を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、薬剤を含有しない培地に懸濁、 37°C にて培養し、経時的に生菌数を測定した。PAE は、薬剤除去後の菌数が $1\log_{10}$ 増殖する時間と、薬剤を作用させない菌が $1\log_{10}$ 増殖する時間の差により表した。

6. 実験的局所感染モデルに対する治療効果

1) マウス尿路感染モデル

マウスは ICR 系 4 週齢の雌 (日本チャールスリバー) を使用した。また、OFLX 感受性菌として、尿路由来 *P. aeruginosa* PRC-236 (OFLX の MIC : $1.56\mu\text{g/ml}$) を、OFLX 耐性菌として同由来の *P. aeruginosa* PRC-234 (OFLX の MIC : $25\mu\text{g/ml}$) を使用した。大森ら⁹⁾ の方法に準じ、1 群 5 ~ 6 匹のマウスに、*P. aeruginosa* PRC-236 株は 2.5×10^6 CFU/mouse を、*P. aeruginosa* PRC-234 株は 5.3×10^5 CFU/mouse を経尿道的に感染させ、感染翌日より 1 日 2 回 3 日間、各薬剤を経口投与した。なお、薬剤はすべての *in vivo* の検討において 0.5% Hydroxypropyl cellulose-SL (HPC-SL; 日本曹達) に懸濁したものを使用し、尿路感染モデル治療実験における薬剤投与量は *P. aeruginosa* PRC-236 で 25 および 5mg/kg 、*P. aeruginosa* PRC-234 で 150mg/kg とした。感染 4 日後、マウスの両腎を無菌的に摘出し、生理食塩水を加えホモジナイズして生菌数を測定した。

2) マウス呼吸器感染モデル

マウスは ICR 系 5 週齢の雄を使用し、1 群 6 ~ 7 匹とした。Cash ら¹⁰⁾ の方法に準じ、喀痰由来の *P. aeruginosa* PRC-256 を混入させた寒天ビーズを作製し、経気道的にビーズ浮遊液 $15\mu\text{l}$ を接種、感染 3 日後より 1 日 2 回 3 日間、各薬剤 30mg/kg (NM441 のみ 10mg/kg 投与群も設定) を経口投与した。なお、本モデルにおける感染菌量は 1.3×10^6 CFU/mouse であった。感染 6 日後、マウスの肺を無菌的に摘出し、生菌数を測定した。

3) マウス熱傷感染モデル

マウスは ICR 系 4 週齢の雄を使用し、1 群 5 匹とした。まず、麻酔下でマウス背部を脱毛後、エタノールを燃焼させることにより熱傷を作製した。次に、菌数を調整した熱傷二次感染創由来の *P. aeruginosa* PRC-208 の菌液を 3.3×10^5 CFU/mouse になるよう熱傷部皮下に接種し、感染を惹起させた。感染 6 時間後、100 および 20mg/kg の各薬剤を 1 回経口投与し、翌日熱傷部皮膚を切り出してホモジナイズ、生菌数を測定した。

4) ラット CMC ポーチ内感染モデル

ラットは SD 系 5 週齢の雄を購入、1 週間の予備飼育後、1 群 4 匹として使用した。安食ら¹¹⁾ の方法に準じ、*P. aeruginosa* PRC-208 を混入させた 1.5% Carboxymethyl cellulose (CMC) の生理食塩水懸濁液をラットの背部に注入してポーチを作製、 50mg/kg の各薬剤を投与した後、経時的にポーチ内の生菌数を測定した。本モデルにおける感染菌量は 4.0×10^6 CFU/rat であった。ま

た、同サンプル中の薬剤濃度も生菌数と同時に測定した。薬剤濃度は *Escherichia coli* Kp を検定菌としたバイオアッセイ (穿孔法) により測定した。検定用平板は Mycin assay agar (ミクニ化学産業) を用いて作製し、直径 6mm の孔をあけ、各サンプル $40\mu\text{l}$ ずつを注入した。検量線用の薬剤溶液は 1.5% CMC の生理食塩水懸濁液を用いて調製した。

II. 実験結果

1 臨床分離緑膿菌に対する抗菌活性

臨床分離緑膿菌 200 株に対する活性本体 NM394 および対照ニューキノロン薬の抗菌活性を Fig. 1 に累積曲線で示した。また、NM394 と CPMX、および NM394 と TFLX の間の感受性相関図を Fig. 2 に示した。これらの株に対する NM394 の MIC₅₀ および MIC₉₀ は、それぞれ 0.39 および $25\mu\text{g/ml}$ であった。NM394 の抗菌活性は NFLX、OFLX および LFLX より優れ、CPFX および TFLX とほぼ同等であった。しかし、ニューキノロン薬に対し感受性の低い菌株では相関図上でわずかに差が認められ、NM394 の抗菌活性が CPMX および TFLX のそれよりやや優れていた。

2. 増殖曲線に及ぼす影響

1) 液体培地中殺菌力

P. aeruginosa PRC-32 に対する STB 中での各薬剤の殺菌力を Fig. 3 に示した。NM394 の $1/4$ および $1/2$ MIC 濃度では、2 あるいは 4 時間後までに著しい菌数の減少が認められたが、その後再増殖した。1MIC 以上の濃度では、より短時間で菌数は 10^2 CFU/ml 以下まで減少した。対照の OFLX、CPFX および TFLX では、1MIC 濃度で著しい菌数の減少が認められたが、 $1/2$ MIC 濃度における減少は緩やかであった。

2) ヒト血清添加培地中殺菌力

ヒト非働化血清を 20% 添加した STB 中での *P. aeruginosa* PRC-25 に対する各薬剤の殺菌力を Fig. 4 に示

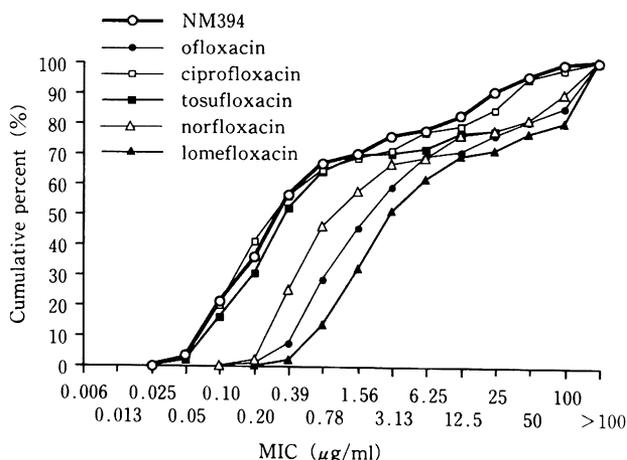


Fig. 1. Sensitivity distribution of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (200 strains) agar dilution method

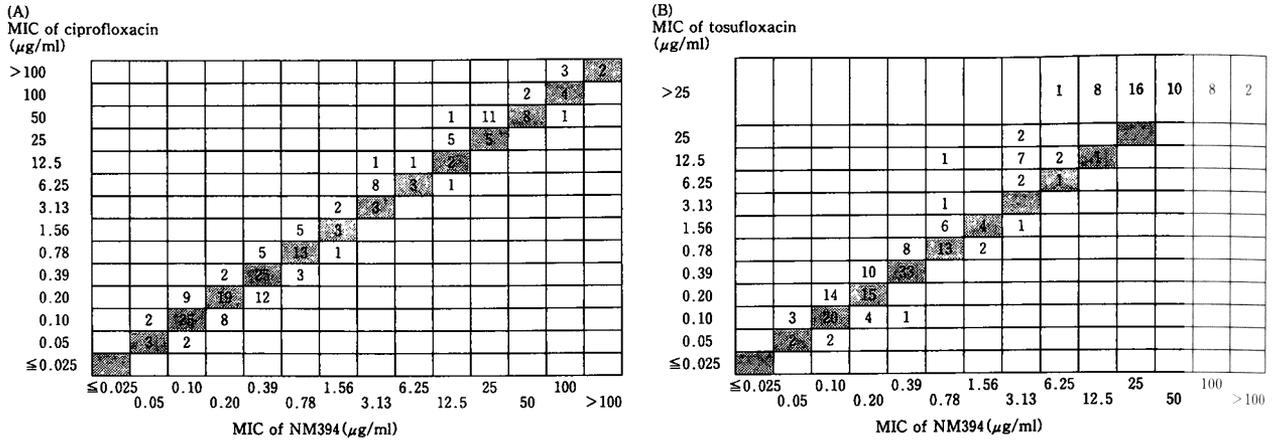


Fig. 2. Correlation between MICs of NM394 and ciprofloxacin(A) and MICs of NM394 and tosufloxacin(B) against 200 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

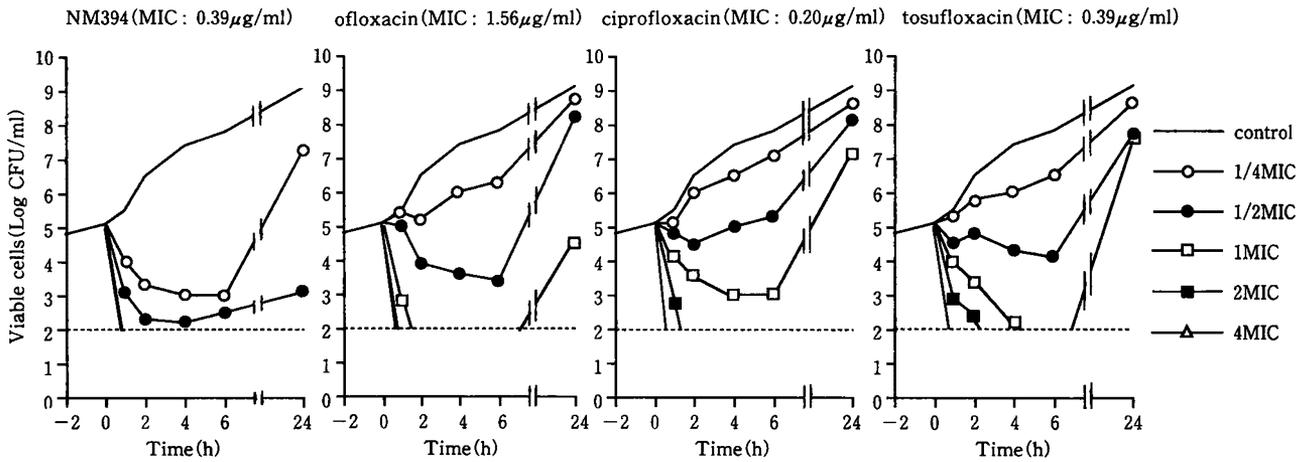


Fig. 3. Bactericidal activity of NM394 and the other quinolones against *Pseudomonas aeruginosa* PRC-32

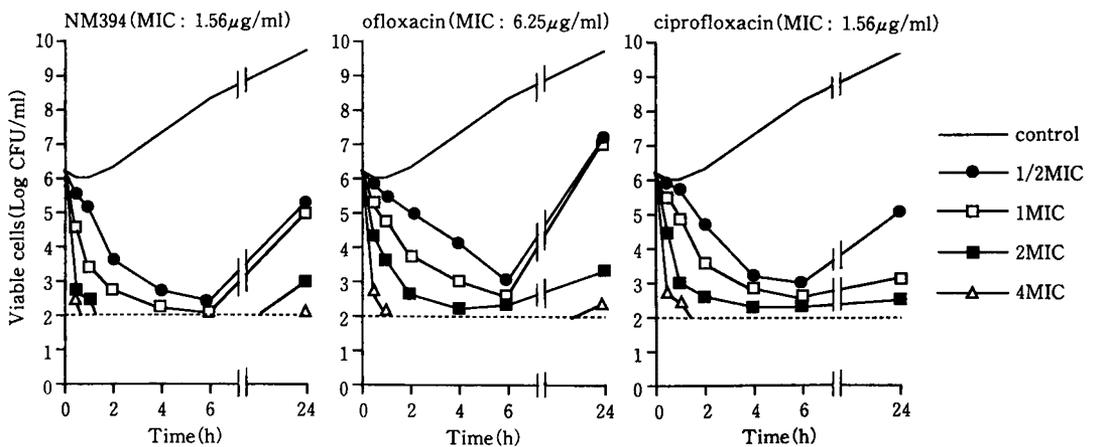


Fig. 4. Bactericidal activity of NM394 and the other quinolones against *Pseudomonas aeruginosa* PRC-25 in STB supplemented with 20% human serum

した。いずれの薬剤においても、1/2MIC および 1MIC 濃度で生菌数を 3～4 log 減少させたが、薬剤間で比較すると、菌数の減少は NM394 で最も速やかであった。NM394 は 2MIC あるいは 4MIC 濃度においても、OFLX および CFPX より速やかに菌数を減少させた。

3. PAE

P. aeruginosa PRC-32 における PAE(h) 測定結果を Fig. 5 に示した。NM394 は、2MIC および 4MIC 濃度で薬剤作用時間中に検出限界以下まで生菌数を減少させたため、PAE は算出不可能であった。対照薬では TFLX の PAE が比較的長く、2MIC および 4MIC 濃度で約 3 時間

であった。1MIC 濃度における NM394 の PAE は約 1 時間であり、OFLX および CFPX よりやや長く、TFLX よりやや短かった。

4 局所感染モデルに対する治療効果

Fig. 6～10 の NM441 の MIC は、すべてその活性本体 NM394 を用いて測定した結果を示した。

1) マウス尿路感染モデル

OFLX 感受性 *P. aeruginosa* PRC-236 および OFLX 耐性 *P. aeruginosa* PRC-234 を用いた、マウス尿路感染モデルに対する治療実験の成績を Fig. 6 および Fig. 7 に示した。OFLX 感受性菌 (OFLX の MIC : 1.56 μg/

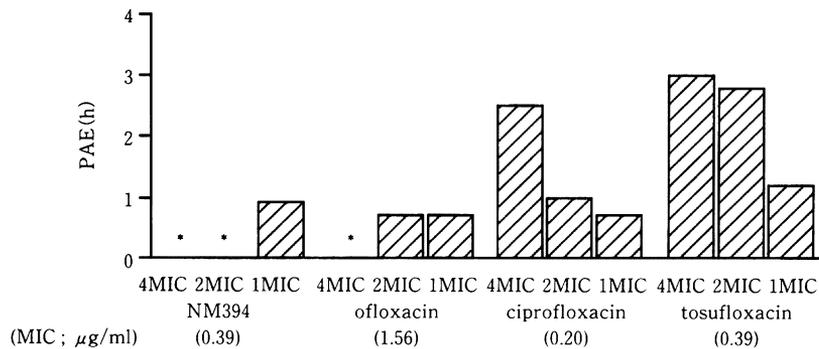


Fig. 5. Postantibiotic effect (PAE) of NM394 and the other quinolones against *Pseudomonas aeruginosa* PRC-32
Time of incubation with compounds: 1h
* · Time of PAE was not calculated because the number of bacteria was decreased less than the limit of detection.

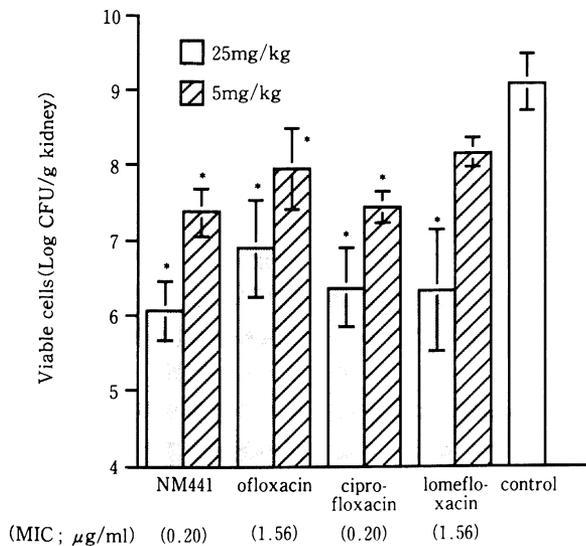


Fig. 6. Therapeutic effect of NM441 against experimental urinary tract infections with ofloxacin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in mice
Strain: *Pseudomonas aeruginosa* PRC-236
Challenge dose: 2.5×10^6 CFU/mouse
mean \pm SD
*: $p < 0.05$ vs control

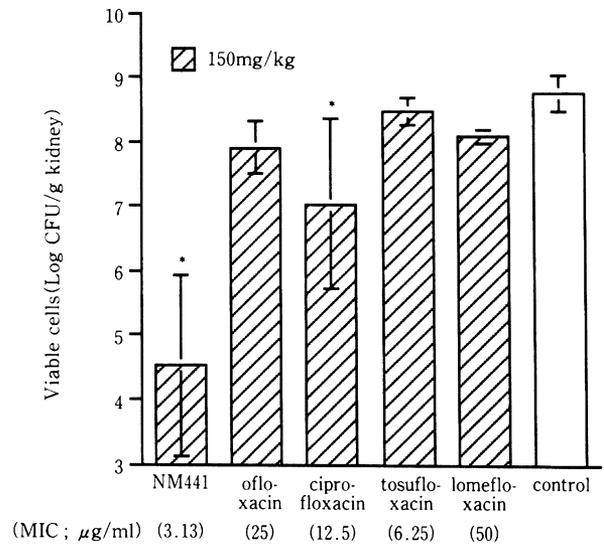


Fig. 7. Therapeutic effect of NM441 against experimental urinary tract infections with ofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in mice
Strain: *Pseudomonas aeruginosa* PRC-234
Challenge dose: 5.3×10^6 CFU/mouse
mean \pm SD
*: $p < 0.05$ vs control

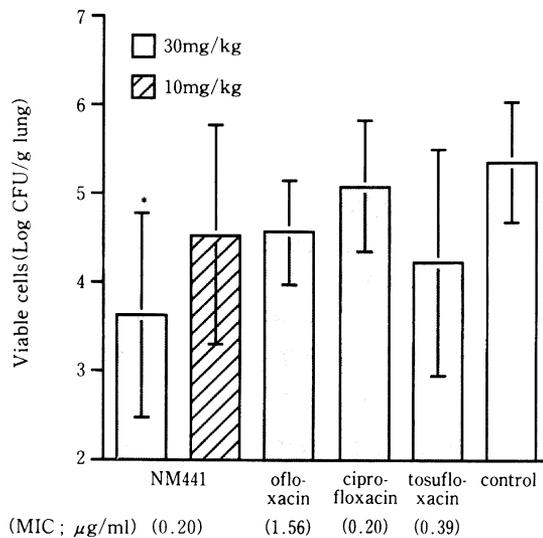


Fig. 8. Therapeutic effect of NM441 against experimental respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in agar beads
Strain: *Pseudomonas aeruginosa* PRC-256
Challenge dose: 1.3×10^6 CFU/mouse
mean \pm SD
*: $p < 0.05$ vs control

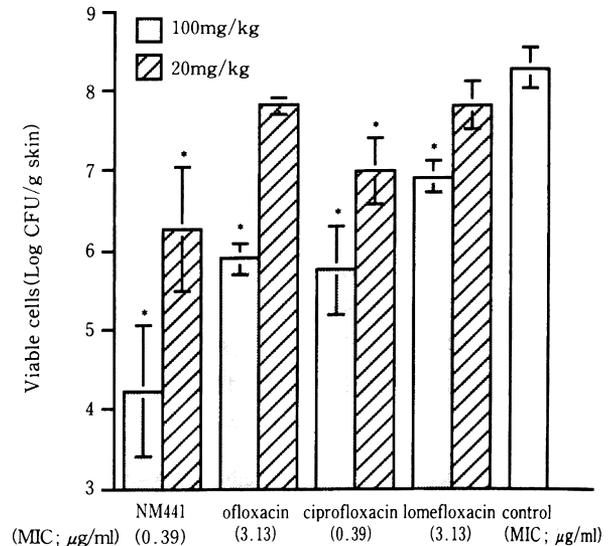


Fig. 9. Therapeutic effect of NM441 against experimental cutaneous infections with *Pseudomonas aeruginosa* in burnt mice
Strain: *Pseudomonas aeruginosa* PRC-208
Challenge dose: 3.3×10^5 CFU/mouse
mean \pm SD
*: $p < 0.05$ vs control

ml) では、薬剤投与群のほとんどで無処置群との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。NM441 投与群の腎臓内生菌数は 25mg/kg および 5mg/kg のいずれの投与量においても、使用薬剤中最も少なかった。

OFLX 耐性菌 (OFLX の MIC: $25 \mu\text{g/ml}$) では、明らかな治療効果が認められたのは NM441 および CPFLEX 投与群のみであった。さらに NM441 投与群の腎臓内生菌数は CPFLEX 投与群のそれより 2~3 log 少なく、対照 4 薬剤の腎臓内生菌数との間にも有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

2) マウス呼吸器感染モデル

P. aeruginosa PRC-256 を用いたマウス呼吸器感染モデルに対する治療実験の結果は Fig. 8 に示した。各薬剤 30mg/kg 投与群において、肺内生菌数は無処置群に比較し減少したが、無処置群との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められたのは NM441 投与群のみであった。また NM441 投与群では、10mg/kg の投与量においても、OFLX 30mg/kg 投与群の場合とほぼ等しい肺内生菌数の減少が認められた。

3) マウス熱傷感染モデル

P. aeruginosa PRC-208 を用いたマウス熱傷感染モデルに対する治療実験の結果は Fig. 9 に示した。NM441 投与群は使用薬剤中最も優れた治療効果を示した。100 mg/kg を投与した場合、NM441 群では無処置群に比べ皮膚内生菌数が 4 log 減少した。また、20mg/kg を投与した場合には、OFLX および LFLX 群でほとんど生菌数の減少が認められなかったのに対し、NM441 群では 2

log の減少が認められた。

4) ラット CMC ポーチ内感染モデル

ラット CMC ポーチ内感染モデルに対する治療実験の結果および同モデルにおけるポーチ内薬剤移行性を、それぞれ Fig. 10(A) および (B) に示した。なお、実験には熱傷感染モデルの作製と同様に *P. aeruginosa* PRC-208 を使用した。ポーチ内生菌数は各薬剤投与群とも投与後 2 時間目より速やかに減少した。NM441 投与群におけるポーチ内生菌数は使用薬剤の中で最も速やかに減少し、投与後 4 時間以後では CPFLEX のそれに比べ有意 ($p < 0.05$) に少なかった。

ポーチ内薬剤濃度は実験に使用したすべての薬剤で投与後 2 時間までにピークに達し、以後経時的に低下した。NM441 を投与した場合のポーチ内 NM394 濃度は OFLX のそれより低い、CPFLEX および TFLX と比較すると各測定時点においてそれらより約 2 倍高かった。

III. 考 察

緑膿菌感染症は基礎疾患をもつ患者や免疫力の低下した患者に多く発症する難治性の感染症であり、以前からより優れた治療薬の開発が望まれている。本感染症の治療には、注射薬としてアミノグリコシド薬やカルバペネム薬などが多く使用されている。一方、経口薬としては優れた抗緑膿菌活性を有するニューキノロン薬が各科領域で広く用いられ、緑膿菌による慢性気道感染症の外来治療を可能とするなど、その有用性は高い。しかし、その臨床効果は必ずしも十分満足できるまでに至っていない。

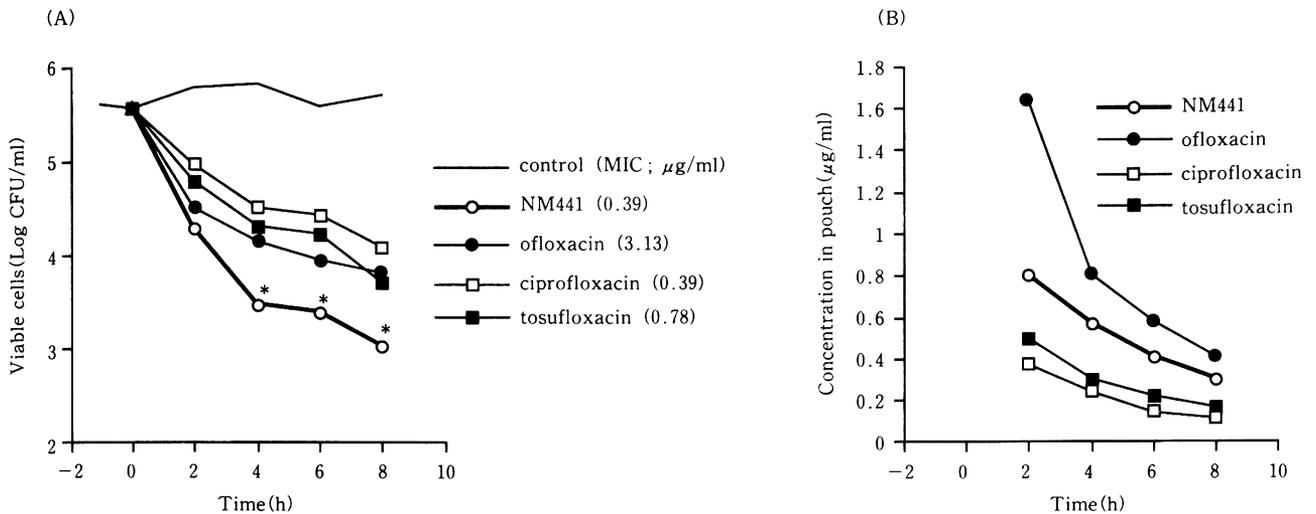


Fig. 10. Therapeutic effect(A) and rocal concentration(B) of NM441 against experimental infections with *Pseudomonas aeruginosa* in carboxymethyl cellulose pouch in rat
 Strain: *Pseudomonas aeruginosa* PRC-208
 Challenge dose: 4.0×10^6 CFU/rat
 * $p < 0.05$ vs ciprofloxacin

今回我々は、*in vitro*において既存ニューキノロン薬よりやや優れた抗緑膿菌活性を示すと報告されている²⁾ NM441に関し、*in vitro*および*in vivo*における緑膿菌についての細菌学的評価を行い、臨床での有効性を推測した。

200株の臨床分離緑膿菌に対する抗菌活性を測定した結果、活性本体NM394の抗菌力はCPFXおよびTFLXのそれとほぼ等しかった。しかし、NM394、CPFXおよびTFLXに対し $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以上のMICを示す株では、NM394の抗菌力がCPFXおよびTFLXよりやや優れる傾向が認められた。これは既報²⁾と同様の結果であった。次に、培地内およびヒト血清添加培地内におけるNM394の殺菌力を調べた結果、いずれの試験においても対照薬より低濃度、短時間で強い殺菌作用が認められ、その影響で本薬のPAEは算出不可能となる場合があった。また、マウスを用いた尿路感染モデル、呼吸器感染モデルおよび熱傷感染モデルに対し、NM441は対照薬より優れた治療効果を示した。この*in vivo*効果は、前述した対照薬と同等あるいはそれ以上の緑膿菌に対する抗菌力、ならびに強い殺菌力が反映された結果であると考えられた。さらに、ラットCMCポーチ内感染治療実験においては、感染局所における本薬の殺菌力と薬剤移行性の関連が示され、強い殺菌力を呈するに足る薬剤量が組織へ移行していることが確認された。

NM441をヒトに経口投与した場合、活性本体NM394の C_{max} 、 $T_{1/2}$ およびAUCはいずれもTFLXのそれらより高値であり、またCPFXと比較すると C_{max} で同等、 $T_{1/2}$ およびAUCはCPFXの値を上回っていた¹²⁻¹⁴⁾。今回の検討におけるNM441の細菌学的有効性さらにヒ

トにおける体内動態を考慮すると、本薬が緑膿菌感染症の治療に際し優れた臨床効果を期待できる薬剤であるといえよう。

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) Yoshida T, Mitsuhashi S: Antibacterial activity of NM394, the active form of prodrug NM441, a new quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 793~800, 1993
- 3) 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
- 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 antibacterial 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) Hirose T, Okezaki E, Kato H, Ito Y, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* and *in vivo* activity of NY-198, a new difluorinated quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 854~859, 1987
- 8) 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
- 9) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島瑳智子: 各種グラム陰性桿菌による実験的尿路感染症に関する基礎的研

- 究。Chemotherapy 30 : 1237~1250, 1982
- 10) Cash H A, Woods D E, Mccullough B, Johanson W G Jr, Bass J A : A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Am Rev Respir Dis 119 : 453~459, 1979
- 11) 安食洋子, 川田晴美, 飯島政子, 安田 紘, 岩田正之 : ラット carboxymethyl cellulose ポーチ系による新実験的感染症モデルの作成。Chemotherapy 38 : 552~559, 1990
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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 and *in vivo* antibacterial activity of NM441,
a new quinolone, against *Pseudomonas aeruginosa*

Takuji Yoshida, Tetsuro Hara, Aiko Miyata,
Minako Araake and Katsumi Kawaharaja
Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.
760 Morooka, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of NM441 against *Pseudomonas aeruginosa* was compared with that of the other quinolones. The results obtained may be summarized as follows :

1) The antibacterial activity of NM394 against clinical isolates of *P. aeruginosa* was equal to that of ciprofloxacin (CPFX). However, against quinolone-resistant strains, the activity of NM394 was slightly higher than CPFX.

2) NM394 showed bactericidal effect against *P. aeruginosa* at lower concentrations and more rapidly than the other quinolones.

3) NM394 also showed more rapid bactericidal effect than the other quinolones in medium containing human serum.

4) Postantibiotic effect (PAE) was not able to be calculated due to a strong bactericidal effect at concentrations higher than 2MIC of NM394. At a concentration of 1 MIC, PAE of NM394 was longer than ofloxacin (OFLX) and CPFX but shorter than tosufloxacin (TFLX).

5) NM441 showed greater therapeutic effects than OFLX, CPFX, TFLX and lomefloxacin (LFLX) against experimental urinary and respiratory tract infections in mice, and cutaneous infection in burnt mice.

6) On the subcutaneous pouch infection with *P. aeruginosa* in rats, the concentration of NM394 in pouch was lower than OFLX and higher than the other. NM441 showed the most rapid reduction of viable counts in pouch.