

Gatifloxacinの細菌学的検討

館田映子・近藤典子・桑原京子・堀賢・平松啓一・横田健*

順天堂大学医学部細菌学教室*

(*現 順天堂大学名誉教授)

Gatifloxacin (GFLX) の各種臨床分離株に対する MIC₉₀ は, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (66株), メチシリン耐性*S. aureus* subsp. *aureus* (MRSA) (47株), 高度耐性MRSA (64株), coagulase-negative staphylococci (CNS) (41株), *Streptococcus pneumoniae* (33株), ペニシリン低感受性*S. pneumoniae* (17株), *Streptococcus pyogenes* (47株), *Enterococcus faecalis* (37株), *Enterococcus faecium* (41株), *Escherichia coli* (43株), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (47株), *Proteus mirabilis* (48株), *Proteus vulgaris* (54株), *Morganella morganii* (49株), *Providencia rettgeri* (45株), *Serratia marcescens* (50株), *Enterobacter cloacae* (50株), *Citrobacter freundii* (48株), *Acinetobacter* spp. (41株), *Pseudomonas aeruginosa* (32株), *Burkholderia cepacia* (33株), *Stenotrophomonas maltophilia* (47株), *Haemophilus influenzae* (54株), および *Bacteroides fragilis* (38株) に対して, それぞれ 3.13, 0.2, 6.25, 0.2, 0.39, 0.39, 0.39, 0.78, 1.56, 0.39, 0.2, 0.39, 0.39, 0.78, 25, 1.56, 0.78, 1.56, 0.39, 6.25, 6.25, 0.78, ≤ 0.013 および 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

GFLX は sparfloxacin と同等の幅広い抗菌スペクトルを有する新規のニューキノロン薬である。特に MRSA やペニシリン低感受性 *S. pneumoniae* を含むグラム陽性菌に対しては, 他のニューキノロン薬に比べて優れた抗菌力を示した。

Norfloxacin (NFLX) 耐性 *S. aureus* subsp. *aureus* および NFLX-ofloxacin (OFLX) 耐性 *S. aureus* subsp. *aureus* の GFLX に対する MIC 値を測定したところ, 本薬剤と NFLX, OFLX との交差耐性は認められなかった。またキノロン感受性 MRSA および NFLX-OFLX 耐性 MRSA の本薬剤に対する耐性変異率 (mutation rate) は低く, GFLX はブドウ球菌に対して耐性化を受けにくいニューキノロン薬と言えよう。

GFLX の CHO-K1, HeLa, IMR-32 細胞に対する細胞増殖抑制作用は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の高濃度で OFLX より強く, OFLX よりは若干細胞毒性の強いニューキノロン薬であることが明らかになった。

Key words : gatifloxacin, 抗菌力, ニューキノロン耐性 MRSA, mutation rates, 細胞毒性

Gatifloxacin (GFLX) は, 杏林製薬株式会社中央研究所で創薬されたニューキノロン系合成抗菌薬である。キノロンカルボン酸の 1 位にシクロプロピル基, 6 位にフッ素, 7 位に 3-メチルピペラジニル基, 8 位にメトキシ基を有する新規化合物である。本薬剤は肺炎球菌をはじめとするグラム陽性菌に対する抗菌力を高め, その抗菌活性は tosufloxacin (TFLX), sparfloxacin (SPFX) に匹敵するといわれている。また嫌気性菌, マイコプラズマ, 抗酸菌にも良好な抗菌力を有し, 従来のニューキノロン薬に比べ抗菌スペクトルが拡大している¹⁻³⁾。本研究

では, GFLX の基礎的検討として, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), およびペニシリン低感受性肺炎球菌を含む各種臨床分離株に対する試験管内抗菌力, キノロン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌力, MRSA における耐性株の出現率および動物細胞に対する増殖抑制作用について検討した。

I. 材料および方法

1. 菌株

本薬剤の抗菌力評価に用いた各種臨床分離株は以下のと

おりである。東京都老人研究所附属病院中央検査室から1981年度に分与されたMRSA 47株、東京大学附属病院臨床検査室より1987年度に分与された高度耐性MRSA 64株、東京総合臨床検査センターから1992~1993年に分与された *Streptococcus pneumoniae* 33株、ペニシリン低感受性 *S. pneumoniae* 17株、および順天堂大学附属病院中央検査室より1981年から1988年の間に分与された *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 66株、coagulase-negative staphylococci (CNS) 41株、*Streptococcus pyogenes* 47株、*Enterococcus faecalis* 37株、*Enterococcus faecium* 41株、*Escherichia coli* 43株、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 47株、*Proteus mirabilis* 48株、*Proteus vulgaris* 54株、*Morganella morganii* 49株、*Providencia rettgeri* 45株、*Serratia marcescens* 50株、*Enterobacter cloacae* 50株、*Citrobacter freundii* 48株、*Acinetobacter* spp. 41株、*Pseudomonas aeruginosa* 32株、*Burkholderia cepacia* 33株、*Stenotrophomonas maltophilia* 47株、*Haemophilus influenzae* 54株、および *Bacteroides fragilis* 38株を用いた。

MRSA NCTC10442株を含む、1961年から1986年の間に世界各国から分離されたMRSA株はDr. J. F. Richardsonおよび生方公子博士から分与された¹⁾。

2. 使用薬剤

GFLXは杏林製薬から分与された原末(1½水和物: Lot No. G155311)を使用した。対照薬剤として、ofloxacin (OFLX: 第一製薬)、norfloxacin (NFLX: 杏林製薬)、ciprofloxacin (CPFX: バイエル薬品)、tosufloxacin (TFLX: 富山化学工業)、sparfloxacin (SPFX: 大日本製薬)、benzyl penicillin (PCG: 明治製薬)、ampicillin (ABPC: 明治製薬)およびcefaclor (CCL: 塩野義製薬)を使用した。

3. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定法

日本化学療法学会法²⁾による平板希釈法で測定した。すなわち被検菌をL-broth中で一夜静置培養し、グラム陽性菌の場合は100倍に、グラム陰性菌の場合は1,000倍に希釈し、これを10⁶CFU/mLの接種菌液とした。ただし、*S. pyogenes*にはHeart Infusion (HI) brothを用い、*H. influenzae*にはHI brothにFildes extract (Oxoid)を5%添加した培地を用い、*B. fragilis*はGAM broth(日本製薬)中で前培養した。また*S. pneumoniae*の接種菌液はヒツジ脱線維血液平板上に増殖した集落をかき取り、HI brothに懸濁し適当に希釈して10⁶CFU/mLになるようにしたものをを用いた。2倍希釈系列にした濃度の薬剤を含むMueller-Hinton agar (Difco)に、接種菌液をマイクロプランター(佐久間製作所)でスポット接種し、37℃一夜培養後の菌増殖の有無からMICを求めた。ただし、*Streptococcus*属の菌は全てHI agarを基礎培地とした血液寒天を、*H. influenzae*はFildes extract加HI agar

で一夜培養し、*B. fragilis*にはGAM agarを使用し、ガスバック法(BBL)で37℃一夜嫌気培養した。

4. キノロン耐性*S. aureus* subsp. *aureus*変異株に対するGFLXの抗菌力

各種キノロン耐性*S. aureus* subsp. *aureus*に対するGFLXの抗菌力を他の同系の薬剤と比較するため行った。使用した菌株は次のとおりである。キノロン感受性MSSAであるMS5952株およびMS5977株。これらを親株として、2MIC濃度のNFLX含有平板上で得られたNFLX耐性変異株、MS5952-N株およびMS5977-N株。さらにこれらのNFLX耐性変異株から、2MIC濃度のOFLX含有平板上で得られたNFLX-OFLX耐性変異株、MS5952-NO株およびMS5977-NO株。キノロン感受性MRSAであるMR5867株およびMR5982株と、同様にこれらから得られたNFLX耐性変異株MR5867-N株とMR5982-N株、およびNFLX-OFLX耐性変異株MR5867-NO株とMR5982-NO株である。なおNFLX-OFLX変異株のgyrA遺伝子にはすべて変異が導入されていた⁶⁾。

MICの測定は化学療法学会標準法による平板希釈法で行った。

5. MRSAにおけるGFLXに対する耐性変異率(mutation rate)の検討

使用した菌株は、上記のキノロン感受性MR5867株、NFLX耐性MR5867-N株、NFLX-OFLX耐性MR5867-NO株である。これらの菌株の1コロニーを5mLのHI brothに接種し、37℃で20時間振盪培養した。これを1mLあたり100コロニー以下になるようにHI brothで10⁶倍希釈した。この希釈菌液1mLを滅菌小試験管10本にそれぞれ分注し、再び37℃で20時間振盪培養した。翌日それぞれの小試験管内の菌液0.3mLを、各菌株のGFLXに対する2MIC濃度の薬剤含有HI agarに塗布し、48時間培養した。平板上に出現したコロニー数を測定し、Luria-Delbruckの公式⁷⁾にしたがってmutation ratesを算出した。

6. 培養動物細胞に対するGFLXの細胞毒性の検討

教室保存のCHO-K1細胞、HeLa細胞、ヒトneuroblastoma IMR-32細胞を10% fetal calf serum加F12培地中で、5% CO₂存在下37℃7日間CORNING culture bottle中で培養した。0.5mM EDTA加0.05% Trypsinで37℃10分間処理し細胞をはがした。遠心でTrypsin溶液を除き、10% fetal calf serum加F12培地中に1×10⁶cells/mLになるように浮遊した。24穴FALCON multi dishの各wellにCHO-K1、HeLa、またはIMR 32細胞を1mLずつ接種した。各wellに1mLの新鮮培地あるいは、0.2~200 μg/mLのGFLXまたはOFLXを含む同培地1mLを添加し、5% CO₂存在下で37℃4日間培養した。各wellの培地を除き、0.5mM EDTA 0.05% Trypsin水溶液中で37℃10分間処理

し細胞を浮遊させた。遠心でTrypsin溶液を除き、3mLのIsotone溶液に再浮遊してCoulter counterで細胞数を自動測定した。薬剤無添加時の細胞数を100とし、薬剤添加時の相対細胞数を求めた⁸⁾。

II. 成 績

1. GFLXの試験管内抗菌力

各種細菌臨床分離株に対するGFLXの試験管内抗菌力をTable 1に示した。

S. aureus subsp. *aureus* 66株に対するGFLXのMIC₉₀は3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と比較的大きいものの、TFLXの2倍、OFLX、SPFXの4倍、CPFEX、NFLXの8倍以上強く、被検薬剤中最も強い抗菌力を示した。

1981年に分離されたMRSA 47株に対するGFLXのMIC₉₀は0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でSPFXと同等で、TFLXの2倍、OFLXの8倍、CPFEX、NFLXより16~64倍以上強い優れた抗菌力を示した。

1987年に分離された高度耐性MRSA 64株に対しても、GFLXのMIC₉₀は6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXと同等だが、SPFXの2倍、OFLXの4倍、NFLXやCPFEXの16倍以上強い抗菌力を示した。

CNS41株に対してはGFLXはTFLX、SPFXと同等の優れた抗菌力を示し、そのMIC₉₀は0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、CPFEXの2倍、OFLXの8倍、NFLXの16倍強い抗菌力を持つことが明らかになった。

S. pneumoniae 33株に対するGFLXのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、TFLX、SPFXと同等で、CPFEXの4倍、OFLXの8倍、NFLXの32倍強い抗菌力を示した。ペニシリン低感受性*S. pneumoniae* 17株に対しても、GFLXのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXとSPFXと同等だが、OFLXやCPFEXより4倍、NFLXより16倍強い抗菌力を示した。

S. pyogenes 47株に対してはGFLXのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXやSPFXと同等で、CPFEXより2倍、OFLXより4倍、NFLXより8倍強い抗菌力を示した。

E. faecalis 37株に対しては、GFLXのMIC₉₀は0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLX、SPFXと同等で、CPFEXより2倍、OFLXより4倍、NFLXより8倍優れていた。

E. faecium 41株に対してはGFLXのMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でSPFXより2倍劣ったが、TFLXより2倍、CPFEX、OFLX、NFLXより4倍優れた抗菌力だった。

E. coli 43株に対しては、GFLXのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でCPFEX、TFLX、SPFXのそれと同等で、OFLX、NFLXより2倍強い抗菌力を示した。

K. pneumoniae subsp. *pneumoniae* 47株に対しては、GFLXのMIC₉₀は0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXと同等で、SPFXやCPFEXより2倍、OFLX、NFLXより8倍強い抗菌力を示した。

P. mirabilis 48株に対しては、GFLXのMIC₉₀は0.39

$\mu\text{g}/\text{mL}$ で、OFLXやTFLXのそれと同等で、SPFXより2倍強い抗菌力を示したが、CPFEXより4倍、NFLXより2倍劣る成績だった。

P. vulgaris 54株に対しては、GFLXのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLX、OFLXと同等で、SPFXより2倍強い抗菌力だが、CPFEX、NFLXより4倍劣る成績だった。

M. morgani 49株に対してはGFLXのMIC₉₀は0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、OFLX、TFLXより2倍、SPFXより4倍強い抗菌力を示したが、CPFEXより4倍、NFLXより2倍劣る成績だった。

P. rettgeri 45株に対しては、GFLXのMIC₉₀は25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で被検薬剤中最も強い抗菌力を示し、他剤より2倍から4倍以上強い抗菌力を示した。

S. marcescens 50株に対してはGFLXのMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でCPFEX、TFLX、SPFXと同程度で、OFLXの4倍、NFLXの8倍強い抗菌力を示した。

E. cloacae 50株に対しては、GFLXは被検薬剤中最も優れた抗菌力を示し、そのMIC₉₀は0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、TFLXやSPFXより2倍強く、CPFEXより4倍、OFLXより8倍、NFLXより16倍強い優れた成績だった。

C. freundii 48株に対しては、GFLXのMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXやSPFXと同等で、CPFEXやOFLXより2倍、NFLXより4倍強い抗菌力だった。

Acinetobacter spp. 41株に対するGFLXのMIC₉₀は0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXやSPFXと同等で、OFLXやCPFEXより4倍、NFLXより32倍強い優れた抗菌力を示した。

P. aeruginosa 32株に対しては、GFLXのMIC₉₀は6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でSPFXより2倍、CPFEXやTFLXより4倍、OFLX、NFLXより8倍以上強い抗菌力を示した。

B. cepacia 33株に対してはGFLXのMIC₉₀は6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でOFLXと同等でNFLXより2倍強いが、CPFEX、TFLXより2倍、SPFXより4倍劣る抗菌力だった。

S. maltophilia 47株に対してはGFLXのMIC₉₀は0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でSPFXよりは2倍劣るが、TFLXと同等でOFLX、NFLX、CPFEXよりは4倍から16倍強い抗菌力を示した。

H. influenzae 54株に対するGFLXの抗菌力はCPFEXやTFLXと同様に強く、そのMIC₉₀は ≤ 0.013 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、SPFX、OFLX、NFLXより2倍から4倍強い抗菌力だった。

B. fragilis 38株に対しては、GFLXのMIC₉₀は1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でTFLXと同等の優れた抗菌力を示し、SPFXの2倍、OFLXの4倍、CPFEXの8倍、NFLXの32倍強い抗菌力だった。

2. 世界各国から分離されたMRSA株に対するGFLXの抗菌力

1961年から1986年の間に世界19カ国から分離されたMRSA 30株に対するGFLXの抗菌力を他のニューキノロン薬と比較検討した。各菌株のそれぞれの薬剤に対す

Table 1-1. Comparative activity of gatifloxacin and other agents against various clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		range	50 %	90 %
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (66)	gatifloxacin	0.05 ~ 6.25	0.2	3.13
	ofloxacin	0.2 ~ 50	0.78	12.5
	norfloxacin	0.78 ~ > 100	3.13	100
	ciprofloxacin	0.2 ~ 100	0.78	25
	tosufloxacin	0.025 ~ > 100	0.1	6.25
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	0.1	12.5
MRSA (47) (isolated in 1981)	gatifloxacin	0.05 ~ 0.39	0.1	0.2
	ofloxacin	0.05 ~ 1.56	0.78	1.56
	norfloxacin	0.39 ~ 25	3.13	12.5
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	3.13
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.39	0.05	0.39
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.2	0.1	0.2
MRSA (64) (high-level resistant) (isolated in 1987)	gatifloxacin	0.05 ~ 6.25	3.13	6.25
	ofloxacin	0.39 ~ 50	6.25	25
	norfloxacin	0.78 ~ > 100	> 100	> 100
	ciprofloxacin	0.2 ~ > 100	25	> 100
	tosufloxacin	0.025 ~ 12.5	3.13	6.25
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	6.25	12.5
CNS (41)	gatifloxacin	0.05 ~ 0.39	0.1	0.2
	ofloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	norfloxacin	0.1 ~ 3.13	1.56	3.13
	ciprofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.39	0.39
	tosufloxacin	\leq 0.013 ~ 1.56	0.1	0.2
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.39	0.1	0.2
<i>S. pneumoniae</i> (33)	gatifloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13
	norfloxacin	1.56 ~ 12.5	6.25	12.5
	ciprofloxacin	0.39 ~ 3.13	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.39	0.39	0.39
<i>S. pneumoniae</i> (17) (penicillin-insensitive isolates)	gatifloxacin	0.2 ~ 0.39	0.39	0.39
	ofloxacin	1.56	1.56	1.56
	norfloxacin	3.13 ~ 12.5	6.25	6.25
	ciprofloxacin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	tosufloxacin	0.2 ~ 0.39	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.2 ~ 0.39	0.39	0.39
	benzylpenicillin	0.39 ~ 6.25	3.13	6.25
	ampicillin	0.78 ~ 12.5	3.13	12.5
cefaclor	25 ~ > 100	100	> 100	
<i>S. pyogenes</i> (47)	gatifloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.39
	ofloxacin	0.2 ~ 3.13	1.56	1.56
	norfloxacin	0.39 ~ 6.25	3.13	3.13
	ciprofloxacin	0.2 ~ 1.56	0.78	0.78
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.39
<i>E. faecalis</i> (37)	gatifloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	3.13	3.13
	norfloxacin	1.56 ~ 25	3.13	6.25
	ciprofloxacin	0.39 ~ 1.56	1.56	1.56
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.78
<i>E. faecium</i> (41)	gatifloxacin	0.2 ~ 3.13	0.78	1.56
	ofloxacin	1.56 ~ 12.5	6.25	6.25
	norfloxacin	1.56 ~ 25	6.25	6.25
	ciprofloxacin	0.2 ~ 12.5	3.13	6.25
	tosufloxacin	0.39 ~ 6.25	3.13	3.13
	sparfloxacin	0.1 ~ 6.25	0.39	0.78

CNS: Coagulase-negative staphylococci

Table 1-2. Comparative activity of gatifloxacin and other agents against various clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		range	50 %	90 %
<i>E. coli</i> (43)	gatifloxacin	0.1 ~ 0.39	0.2	0.39
	ofloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.78
	norfloxacin	0.2 ~ 0.78	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.2	0.39
	tosufloxacin	0.1 ~ 0.78	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.1 ~ 0.78	0.39	0.39
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (47)	gatifloxacin	0.025 ~ 1.56	0.05	0.2
	ofloxacin	0.05 ~ 12.5	0.1	1.56
	norfloxacin	0.05 ~ 25	0.1	1.56
	ciprofloxacin	0.025 ~ 6.25	0.1	0.39
	tosufloxacin	0.025 ~ 1.56	0.05	0.2
	sparfloxacin	≤ 0.013 ~ 6.25	0.05	0.39
<i>P. mirabilis</i> (48)	gatifloxacin	≤ 0.013 ~ 0.78	0.2	0.39
	ofloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39
	norfloxacin	0.025 ~ 0.78	0.1	0.2
	ciprofloxacin	0.025 ~ 0.39	0.05	0.1
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.78
<i>P. vulgaris</i> (54)	gatifloxacin	0.05 ~ 1.56	0.2	0.39
	ofloxacin	0.05 ~ 0.39	0.1	0.39
	norfloxacin	0.025 ~ 0.2	0.05	0.1
	ciprofloxacin	≤ 0.013 ~ 0.1	0.025	0.1
	tosufloxacin	0.05 ~ 0.78	0.2	0.39
	sparfloxacin	0.05 ~ 6.25	0.2	0.78
<i>M. morgani</i> (49)	gatifloxacin	0.05 ~ 3.13	0.1	0.78
	ofloxacin	0.05 ~ 6.25	0.1	1.56
	norfloxacin	0.025 ~ 1.56	0.05	0.39
	ciprofloxacin	≤ 0.013 ~ 1.56	0.025	0.2
	tosufloxacin	0.1 ~ 6.25	0.2	1.56
	sparfloxacin	0.1 ~ 6.25	0.2	3.13
<i>P. rettgeri</i> (45)	gatifloxacin	0.05 ~ 25	1.56	25
	ofloxacin	0.1 ~ > 100	6.25	100
	norfloxacin	0.05 ~ > 100	12.5	> 100
	ciprofloxacin	≤ 0.013 ~ 50	3.13	50
	tosufloxacin	0.05 ~ > 100	6.25	> 100
	sparfloxacin	0.1 ~ 100	6.25	50
<i>S. marcescens</i> (50)	gatifloxacin	0.025 ~ 3.13	0.39	1.56
	ofloxacin	0.1 ~ 12.5	0.39	6.25
	norfloxacin	0.1 ~ 50	0.2	12.5
	ciprofloxacin	0.025 ~ 12.5	0.1	1.56
	tosufloxacin	0.05 ~ 6.25	0.39	1.56
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	1.56
<i>E. cloacae</i> (50)	gatifloxacin	≤ 0.013 ~ 3.13	0.1	0.78
	ofloxacin	0.05 ~ 25	0.39	6.25
	norfloxacin	0.05 ~ 25	0.39	12.5
	ciprofloxacin	≤ 0.013 ~ 12.5	0.1	3.13
	tosufloxacin	0.025 ~ 25	0.2	1.56
	sparfloxacin	0.025 ~ 25	0.1	1.56
<i>C. freundii</i> (48)	gatifloxacin	0.025 ~ 12.5	0.2	1.56
	ofloxacin	0.1 ~ 12.5	0.39	3.13
	norfloxacin	0.2 ~ 12.5	0.39	6.25
	ciprofloxacin	0.025 ~ 6.25	0.2	3.13
	tosufloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	1.56
	sparfloxacin	0.05 ~ 12.5	0.39	1.56

るMIC値をTable 2に示した。各ニューキノロン薬のMIC₉₀値は、GFLXが0.2, OFLXが1.56, NFLXが12.5 SPFXが0.2, CPFXが3.13, TFLXが0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ だった。GFLXはSPFXやTFLXと同等で、OFLXより8倍、CPFXより16倍、NFLXより64倍強い抗菌力を示した。

3. キノロン耐性*S. aureus*に対するGFLXの抗菌力

Table 3に、キノロン感受性MSSA 2株 (MS5952,

MS5977) とキノロン感受性MRSA 2株 (MR5867, MR5982), およびそれらから得られたNFLX耐性株, さらにそれらから得られたNFLX-OFLX耐性株に対する、各ニューキノロン薬のMIC値を示した。NFLX耐性株に対するGFLXのMIC値は0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、SPFXと同程度に低い値を示し、TFLXよりも2~4倍、CPFXよりも16倍も優れた抗菌力を示した。NFLX-OFLX耐性株

Table 1-3. Comparative activity of gatifloxacin and other agents against various clinical isolates

Organism (No. of strains)	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		range	50 %	90 %
<i>Acinetobacter</i> spp. (41)	gatifloxacin	$\leq 0.013 \sim 12.5$	0.1	0.39
	ofloxacin	0.1 \sim 50	0.2	1.56
	norfloxacin	0.1 \sim > 100	1.56	12.5
	ciprofloxacin	0.05 \sim 50	0.2	1.56
	tosufloxacin	$\leq 0.013 \sim 12.5$	0.1	0.39
	sparfloxacin	$\leq 0.013 \sim 25$	0.025	0.39
<i>P. aeruginosa</i> (32)	gatifloxacin	$\leq 0.013 \sim$ > 100	3.13	6.25
	ofloxacin	0.39 \sim > 100	1.56	100
	norfloxacin	0.39 \sim > 100	1.56	50
	ciprofloxacin	0.05 \sim > 100	0.39	25
	tosufloxacin	0.1 \sim > 100	0.39	25
	sparfloxacin	0.39 \sim > 100	3.13	12.5
<i>B. cepacia</i> (33)	gatifloxacin	0.78 \sim 12.5	6.25	6.25
	ofloxacin	3.13 \sim 12.5	6.25	6.25
	norfloxacin	3.13 \sim 25	12.5	12.5
	ciprofloxacin	1.56 \sim 3.13	1.56	3.13
	tosufloxacin	0.39 \sim 6.25	3.13	3.13
	sparfloxacin	0.39 \sim 1.56	1.56	1.56
<i>S. maltophilia</i> (47)	gatifloxacin	0.1 \sim 6.25	0.39	0.78
	ofloxacin	0.2 \sim 3.13	1.56	3.13
	norfloxacin	0.78 \sim 25	6.25	12.5
	ciprofloxacin	0.2 \sim 25	1.56	6.25
	tosufloxacin	0.05 \sim 1.56	0.39	0.78
	sparfloxacin	$\leq 0.013 \sim$ 0.78	0.2	0.39
<i>H. influenzae</i> (54)	gatifloxacin	≤ 0.013	≤ 0.013	≤ 0.013
	ofloxacin	$\leq 0.013 \sim$ 0.05	0.025	0.05
	norfloxacin	0.025 \sim 0.05	0.05	0.05
	ciprofloxacin	≤ 0.013	≤ 0.013	≤ 0.013
	tosufloxacin	≤ 0.013	≤ 0.013	≤ 0.013
	sparfloxacin	$\leq 0.013 \sim$ 0.025	≤ 0.013	0.025
<i>B. fragilis</i> (38)	gatifloxacin	0.39 \sim 6.25	0.39	1.56
	ofloxacin	1.56 \sim 12.5	3.13	6.25
	norfloxacin	12.5 \sim 100	25	50
	ciprofloxacin	3.13 \sim 25	6.25	12.5
	tosufloxacin	0.39 \sim 12.5	0.78	1.56
	sparfloxacin	0.78 \sim 12.5	1.56	3.13

に対する GFLX の MIC 値は 0.78 \sim 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、 TFLX の 2 倍 (MIC 値は 1.56 \sim 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 SPFX の 4 倍 (MIC 値は 3.13 \sim 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 CPFX の 16 倍 (MIC 値は 12.5 \sim 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と最も強い抗菌力を示した。以上のことから、 NFLX および OFLX 耐性菌は既存のニューキノロン薬のなかでも GFLX に対し交差しにくいことが示唆された。

4. MRSA における GFLX に対する耐性変異率 (mutation rate) の検討

Table 4 に、それぞれの被検菌株から 2MIC 濃度の GFLX で選択したときに出現した耐性変異株の平均コロニー数 (Average per culture tubes)、およびそれらから算出した耐性変異率 (mutation rates) を示した。キノロン感受性 MR5867 株からは、2MIC 濃度の GFLX (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で選択したとき、耐性変異株は出現し難く、mutation rate は 0.28×10^{-9} であった。NFLX 耐性 MR5867-N 株 (NFLX に対する MIC は 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) からは、2MIC 濃度の GFLX (0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で選択したとき、平均して 20.7 コロニーの耐性株が 1 本の試験管あた

り出現したことになり、mutation rate は 3.66×10^{-9} であった。NFLX-OFLX 耐性株 MR5867-NO 株 (NFLX に対する MIC は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、OFLX に対する MIC は 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) からは、2MIC 濃度の GFLX (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で選択したとき、平均して 1.0 コロニーの耐性株が 1 本の試験管から出現したことになり、mutation rate は 0.47×10^{-9} であった。以上の結果から、GFLX は、キノロン感受性 MRSA および NFLX-OFLX 耐性 MRSA 株からの耐性菌出現率は低く、本薬剤は黄色ブドウ球菌に対して耐性化を受けにくいニューキノロン薬であることが示唆された。

5. 培養動物細胞に対する GFLX の細胞毒性の検討

GFLX の細胞毒性を検討する目的で HeLa、IMR-32、CHO-K1 細胞に対する増殖抑制作用を OFLX のそれと比較した。Fig. 1-a に示すとおり HeLa 細胞に対しては、GFLX は OFLX と同様に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで増殖にほとんど影響を与えないが、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の存在下で細胞数が約 50 % 以下に減少した。Fig. 1-b に示すように、

Table 2. *In vitro* activity of gatifloxacin and other new quinolones against MRSA strains isolated from various countries

Strain	Country	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
		methicillin	gatifloxacin	ofloxacin	norfloxacin	sparfloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin
NCTC10442	U.K.	800	0.2	0.39	1.56	0.05	0.39	0.1
61/5896	U.K.	200	0.1	0.39	3.13	0.05	0.39	0.05
61/6219	U.K.	25	0.1	0.39	1.56	0.05	0.39	0.1
64/4176	U.K.	50	0.1	0.2	1.56	0.05	0.39	0.1
64/3846	U.K.	12.5	0.1	0.2	1.56	0.05	0.39	0.05
86/560	U.K.	100	0.1	0.39	1.56	0.05	0.39	0.05
86/961	U.K.	25	0.1	0.2	3.13	0.05	0.39	0.05
86/2652	U.K.	200	0.1	0.39	1.56	0.025	0.39	0.1
86/4372	U.K.	1600	0.2	0.39	1.56	0.1	0.78	0.1
86/9302	U.K.	200	0.1	0.39	1.56	0.05	0.39	0.1
85/1340	Yugoslavia	400	0.2	0.39	1.56	0.1	0.39	0.1
85/1762	Hungary	1600	0.2	0.39	3.13	0.1	0.78	0.1
85/2082	New Zealand	400	0.2	0.39	3.13	0.1	0.78	0.1
85/2111	Norway	800	0.2	0.39	3.13	0.1	0.78	0.1
85/3566	Holland	400	0.1	0.39	3.13	0.05	0.39	0.1
85/5495	Saudi Arabia	200	0.2	0.39	1.56	0.05	0.39	0.1
84/9580	South Africa	400	0.1	0.2	0.78	0.025	0.39	0.05
85/1774	Italy	100	0.1	0.39	3.13	0.05	0.39	0.05
85/1836	W. Germany	800	0.1	0.39	1.56	0.025	0.39	0.05
85/2147	Hong Kong	1600	0.2	0.39	3.13	0.1	0.78	0.1
85/3619	Austria	1600	0.1	0.39	1.56	0.025	0.39	0.1
85/3907	E. Germany	1600	0.2	0.39	3.13	0.1	0.78	0.1
85/4231	Canada	1600	0.2	0.39	1.56	0.1	0.78	0.1
86/4670	Canada	100	0.1	0.39	1.56	0.05	0.39	0.1
85/4547	Israel	400	0.2	0.39	0.78	0.1	0.39	0.1
85/5328	Portugal	100	0.1	0.39	0.78	0.05	0.39	0.05
85/2232	U.S.A.	400	0.2	0.39	3.13	0.1	0.78	0.1
85/2235	U.S.A.	400	3.13	25	> 100	6.25	25	6.25
85/1940	France	100	0.2	0.39	1.56	0.1	0.39	0.1
82/N315	Japan	1.56	0.1	0.39	3.13	0.05	0.39	0.05

Table 3. Antibacterial activity of gatifloxacin against quinolone-sensitive and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* subclones

Strains	gatifloxacin	ofloxacin	norfloxacin	sparfloxacin	ciprofloxacin	tosufloxacin
MS5952	0.1	0.39	0.78	0.1	0.39	0.05
MS5952-N	0.2	1.56	12.5	0.2	3.13	0.39
MS5952-NO	0.78	6.25	25	3.13	12.5	6.25
MS5977	0.1	0.39	0.78	0.1	0.39	0.05
MS5977-N	0.2	1.56	12.5	0.1	3.13	0.39
MS5977-NO	3.13	12.5	50	12.5	25	1.56
MR5867	0.1	0.39	1.56	0.05	0.39	0.05
MR5867-N	0.2	1.56	12.5	0.2	3.13	0.39
MR5867-NO	3.13	12.5	100	12.5	25	1.56
MR5982	0.1	0.39	1.56	0.1	0.78	0.05
MR5982-N	0.2	1.56	25	0.2	3.13	0.78
MR5982-NO	3.13	12.5	> 100	12.5	25	6.25

- N: norfloxacin-resistant

- NO: norfloxacin- and ofloxacin-resistant

IMR-32細胞に対してはGFLXは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で細胞数が50%以下に減少し、OFLXより細胞増殖抑制作用は強かった。CHO-K1細胞では、Fig. 1-cに示したようにGFLXは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度までは増殖にほとんど影響を与えないが、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で細胞数が50%以下に減少した。以上の結果から、GFLXは高濃度でOFLXより強い細胞増殖抑制作用を示した。

Ⅲ. 考 察

GFLXはグラム陽性菌からグラム陰性菌まで幅広く優れた抗菌力を示し、その抗菌スペクトルはSPFXのそれに匹敵した。また、特にMRSAやペニシリン低感受性*S. pneumoniae*を含むグラム陽性菌に対しては、GFLXは既存のニューキノロン薬より優れた抗菌力を示した。

GFLXは、NFLX耐性*S. aureus* subsp. *aureus*に対して

Table 4. Mutation rates in the emergence of subclones which are spontaneously resistant to gatifloxacin from MRSA strains¹⁾

Strain	Drug concentration for selection ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Number of culture tubes (C)	Average per culture tube ²⁾ (r)	Variance ³⁾ (var)	Bacteria per culture tube (Nt)	Mutation rate ⁴⁾ (a)
MR5867	0.2 (2MIC)	10	< 0.3	—	1.0×10^9	$< 0.28 \times 10^{-9}$
MR5867 - N ⁵⁾	0.39 (2MIC)	10	20.7	259	1.39×10^9	3.66×10^{-9}
MR5867 - NO ⁶⁾	6.25 (2MIC)	10	1.0	3.2	1.21×10^9	0.47×10^{-9}

1) Mutation rates were calculated according to the Luria-Delbruck's formula.

2) The mean number of resistant mutants which emerged from each culture tube.

3) Variance was calculated according to the formula: $\text{var} = rNtCa / \ln(NtCa)$.

4) Mutation rate was obtained from the formula: $r = aNt \ln(NtCa)$.

5) -N: norfloxacin-resistant

6) -NO: norfloxacin- and ofloxacin-resistant

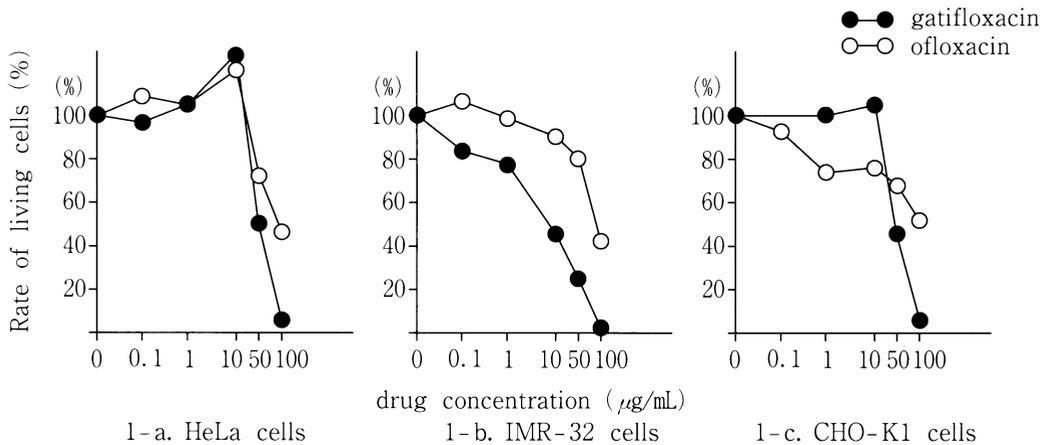


Fig. 1. Influence of gatifloxacin and ofloxacin on the growth of mammalian cells.

SPFXと同程度の強い抗菌力を示し、また *gyrA* に変異が導入されている NFLX-OFLX 耐性 *S. aureus* subsp. *aureus* に対しても、被検薬剤中最も優れた抗菌力を示した。したがって本薬剤は NFLX や OFLX との交差耐性を受けにくいことが示唆された。また GFLX に対する、キノロン感受性 MRSA および NFLX-OFLX 耐性 MRSA 株の耐性変異率は低く、本薬剤は黄色ブドウ球菌に対して耐性化を受けにくいニューキノロン薬であることが示唆された。

GFLX の動物培養細胞に対する細胞毒性を、CHO-K1, HeLa, IMR-32 細胞に対する増殖阻止作用として OFLX と比較したところ、CHO-K1, HeLa 細胞に対する本薬剤の MIC₅₀ 値は約 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、IMR-32 細胞に対しては約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ だった。このことより GFLX は、既存のニューキノロン薬の中でも最も細胞増殖抑制作用の弱いとされる OFLX よりは、高濃度で細胞毒性が強いことが示唆された。

文 献

1) Hosaka M, Yasue T, Fukuda H, et al.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AM-

1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2108~2117, 1992

2) Tomioka H, Saito H, Sato K: Comparative antimycobacterial activities of the newly synthesized quinolone AM-1155, sparfloxacin, and ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1259~1263, 1993

3) 第43回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム. AM-1155, 東京, 1995

4) Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson J F, et al.: Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1219~1226, 1993

5) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981

6) Hori S, Oshita Y, Utui Y, et al.: Sequential acquisition of norfloxacin and ofloxacin resistance by methicillin-resistant and

- susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 2278~2284, 1993
- 7) Luria S E, Delbruck M: Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28: 491~511, 1943
- 8) 横田 健, 鈴木映子, 新井京子, 他: T-3262の試験管内抗菌力, 血清蛋白の影響, 細胞増殖抑制作用(細胞毒性), およびマウス培養マクロファージとの協力的殺菌作用。Chemotherapy 36 (S-9): 19~29, 1988

In vitro antibacterial activity of gatifloxacin

Eiko Tateda, Noriko Kondo, Kyoko Kuwahara,
Satoshi Hori, Keiichi Hiramatsu, and Takeshi Yokota[‡]

Department of bacteriology, School of Medicine,
Juntendo University

([‡] Present: Honorary Professor, Juntendo University)
2-1-1 Hongou, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

The MIC values of the newly synthesized quinolone antibiotic gatifloxacin (GFLX) (Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo) were determined with various bacterial species, and were compared with five other 4-quinolone antibiotics – ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, tosufloxacin, and sparfloxacin. MIC₅₀ values ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of GFLX against various species or groups of bacteria (number of isolates in parentheses) were as follows: 3.13, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (66); 0.2, methicillin-resistant *S. aureus* subsp. *aureus* (MRSA) (47, isolated in 1981); 6.25, MRSA (64, isolated in 1987); 0.2, coagulase-negative staphylococci (41); 0.39, *Streptococcus pneumoniae* (33); 0.39, penicillin-insensitive *S. pneumoniae* (17); 0.39, *Streptococcus pyogenes* (47); 0.78, *Enterococcus faecalis* (37); 1.56, *Enterococcus faecium* (41); 0.39, *Escherichia coli* (43); 0.2, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (47); 0.39, *Proteus mirabilis* (48); 0.39, *Proteus vulgaris* (54); 0.78, *Morganella morganii* (49); 25, *Providencia rettgeri* (47); 1.56, *Serratia marcescens* (50); 0.78, *Enterobacter cloacae* (50); 1.56, *Citrobacter freundii* (48); 0.39, *Acinetobacter* spp. (41); 6.25, *Pseudomonas aeruginosa* (32); 6.25, *Burkholderia cepacia* (33); 0.78, *Stenotrophomonas maltophilia* (47); ≤ 0.013 , *Haemophilus influenzae* (54); 1.56, *Bacteroides fragilis* (38). GFLX had an antibacterial spectrum similar to sparfloxacin, and had a better activity than the other 4-quinolones, especially against Gram-positive bacteria, including MRSA and penicillin-insensitive *S. pneumoniae*. *In vitro* activity against 30 MRSA strains isolated from 19 different countries during the period 1961 to 1986 was compared with that of five other 4-quinolones. MIC₅₀ of GFLX to MRSA from the various countries was 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2~16-fold less than OFLX, NFLX, and CPMX, and 2-fold greater than SPFX and TFLX. To test the degree of cross-resistance to GFLX, we obtained isogenic sets of NFLX-resistant, and NFLX-OFLX resistant mutants from susceptible *S. aureus* strains. GFLX showed strong activity (MIC, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against the NFLX-resistant mutants and also fairly good activity (MIC, 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against NFLX-OFLX-resistant mutants which harbored a mutation of the *gyrA* gene. Therefore, mutants resistant to NFLX and NFLX-OFLX showed incomplete cross-resistance to GFLX. GFLX selected the spontaneous resistant subclones from quinolone-susceptible and NFLX-OFLX-resistant MRSA at a low mutation rate. The selective toxicity of GFLX was determined by measuring growth inhibitory concentrations of this agent in cultured mammalian cells. At concentrations higher than 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GFLX manifested cytostatic activity to mammalian cells which was relatively stronger than that of OFLX.