

原 著

ニューキノロン系薬剤“Y-26611”の *in vitro*
並びに *in vivo* 抗マイコバクテリア活性

富岡 治明 ・ 佐藤 勝昌 ・ 斎藤 肇

島根医科大学微生物・免疫学教室

池田 敬史

吉富製薬株式会社中央研究所

受付 平成3年11月28日

ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF A NEWLY SYNTHESIZED
FLUOROQUINOLONE, Y-26611

Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO, Hajime SAITO*
and Yoshifumi IKEDA

(Received for publication November 28, 1991)

Y-26611, a newly developed fluoroquinolone having a morpholine moiety at the 7 position was examined for *in vitro* antimycobacterial activity by the agar dilution method using 7H11 medium. The MIC₉₀ values of Y-26611 were as follows: *Mycobacterium tuberculosis* (25 strains), 0.4 µg/ml; *M. kansasii* (19 strains), 6.25 µg/ml; *M. marinum* (10 strains), 25 µg/ml; *M. scrofulaceum* (19 strains), 50 µg/ml; *M. avium* (18 strains), 50 µg/ml; *M. intracellulare* (31 strains), >100 µg/ml; *M. fortuitum* (20 strains), 0.4 µg/ml; *M. chelonae* subsp. *abscessus* (15 strains), >100 µg/ml; and *M. chelonae* subsp. *chelonae* (20 strains), 100 µg/ml. The MICs against *M. tuberculosis* and *M. fortuitum* were lower than those of ofloxacin (OFLX), although it had somewhat higher MICs against *M. avium* complex than OFLX. Antimicrobial activity of Y-26611 against *M. tuberculosis* phagocytosed in cultured murine peritoneal macrophages were somewhat lower, as compared to that of OFLX. When *M. fortuitum*-infected (iv) A/J mice were treated with Y-26611 by gavage at doses of 0.5~2 mg/mouse, once daily, six times per week, from day 1 for up to 4 weeks after infection, mice were protected from death and the number of CFU recovered from their visceral organs, such as the lungs, spleen and kidneys were reduced. The therapeutic efficacy of Y-26611 was similar as that of OFLX.

Key words : New quinolone, Y-26611, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, Various mycobacteria

キーワード : ニューキノロン, Y-26611, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, 諸種抗酸菌

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

はじめに

Y-26611 (吉富製薬株式会社中央研究所) は新たに7位にモルホリン環を導入したニューキノロン系薬剤で、グラム陽性菌・陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、その作用は殺菌的である¹⁾。Y-26611のグラム陽性菌群に対する抗菌力は既存の norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX) などのニューキノロン剤よりも強く、呼吸器感染症の主要な起炎菌である *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (MRSA を含む), *S. pyogenes* に対する MIC₉₀ は 0.2 µg/ml 以下と低く、またグラム陰性菌群に対しては、OFLX および NFLX とほぼ同等の抗菌力を示すことが報告されている¹⁾。他方、実験的マウス感染に対する本剤の ED₅₀ 値は、グラム陽性菌感染では NFLX, OFLX あるいは CPFX よりも4倍以上も低く、またグラム陰性菌感染では OFLX よりもやや高いが NFLX より低く、優れた治療効果が認められている¹⁾。

今回、われわれはニューキノロン系薬剤の抗マイコバクテリア活性研究の一環として Y-26611 の *in vitro* 並びに *in vivo* 活性について検討し、若干の知見を得たので以下報告する。

材料と方法

1. 供試薬剤

Y-26611 並びにその対照として ofloxacin (OFLX) (第一製薬) を用いた。

2. 供試菌株

in vitro 抗菌活性の検討には教室保存の *Mycobacterium tuberculosis* 25 株, *M. kansasii* 19 株, *M. marinum* 10 株, *M. scrofulaceum* 19 株, *M. avium* 18 株, *M. intracellulare* 31 株, *M. fortuitum* 20 株, *M. chelonae* subsp. *chelonae* 20 株および *M. chelonae* subsp. *abscessus* 15 株を、またマウス感染治療実験には *M. fortuitum* ATCC 23010 株を用いた。なお、*M. avium* 並びに *M. intracellulare* は Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System (Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., USA) を用いて同定されたものであり、いずれの菌株も扁平、平滑、透明な集落形態を有した。

3. MIC 測定法

日本化学療法学会標準法²⁾ に準じて行った。すなわち、7H9 培地 (Difco) 中 37°C (*M. marinum*, *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C), OD_{540nm} = 0.1 になるまで培養した菌を同種培地で約 10⁶ CFU/ml になるように調整した。その希釈菌液の 5 µl を 100~0.025 µg/ml に至る 2 倍階段希釈濃度の薬剤を含有する 7H11

寒天 (Difco) 平板上にマイクロプランター (佐久間製作所, 東京) を用いてスポットし, 37°C (*M. marinum*, *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C) で、迅速発育菌は 7 日、また遅発育菌は 14 日培養後に薬剤の MIC を求めた。

4. 供試動物

日本 SLC より購入した A/J 系並びに BALB/c 系各雌マウスを用いた。

5. マウス腹腔マクロファージ (Mφ) 内被貪食 *M. tuberculosis* に対する抗菌作用

Mφ は既報の方法³⁾ に従って採取、調整した。すなわち、Zymosan A (Sigma) 1 mg を BALB/c 系雌マウス (10 週齢) の腹腔内へ投与し、その 4 日後に 1% 牛胎児血清加 Hanks' balanced salt solution (FBS-HBSS) で腹腔浸出細胞を採取した。このようにして得られた細胞は洗浄後、10% FBS-RPMI 1640 培地 (FBS-RPMI) (日水製薬) に浮遊させ、その 1 ml (1 × 10⁶) を径 16 mm の培養 well (Corning Glass Works, USA) に入れ、5% CO₂ 下で、37°C、2 時間培養後、FBS-HBSS で洗浄して非付着性細胞を除去し、得られた付着性細胞を Mφ として用いた。

この Mφ 細胞に *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株の FBS-RPMI による菌浮遊液 (2 × 10⁶ CFU/ml) の 1 ml を加え、5% CO₂ 環境下 37°C、1 時間培養後、FBS-HBSS で洗浄し、非貪食菌を除去した。これに Y-26611 あるいは OFLX (1 および 10 µg/ml) 各含有 FBS-RPMI の 1 ml を加えて 5 日間培養 (1 日 1 回培地交換) した。そして、既報の方法³⁾ にしたがって、Mφ 内の菌の CFU を 7H11 寒天上、5% CO₂ 環境下で 37°C、14 日間培養後に算定した。一方、上記と同一条件下で培養した Mφ を Giemsa 染色し、その数を算定し、成績を Mφ あたりの CFU で示した。

6. 実験的マウス *M. fortuitum* 感染に対する治療効果

M. fortuitum ATCC 23010 株の 0.2 ml (2 × 10⁷ CFU) を A/J 系雌マウス (5 週齢) の尾静脈内へ接種し、その翌日より Y-26611 あるいは OFLX の 2.5% アラビアゴム含有 0.2% Tween 80 水による懸濁液の 0.1 ml (0.5, 1 および 2 mg) を 1 日 1 回、週 6 回、4 週間にわたって胃ゾンデを用いて経口投与した。そして、動物の spinning disease の発現並びに生死を毎日観察し、斃死した場合にはその都度、生残したものは感染 28 日後に屠殺・剖検して、内臓の肉眼病変の有無ないし程度を観察し、さらに既報の方法³⁾ に従って、肺、脾および腎内 CFU を 7H11 寒天平板を用いて測定した。

結 果

1. *in vitro* 抗マイコバクテリア活性

Table 1. MICs of New Quinolones, Y-26611 and Ofloxacin, against Mycobacteria

Species	No. of strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Y-26611		Ofloxacin	
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>M. tuberculosis</i>	25	0.2	0.4	0.8	0.8
<i>M. kansasii</i>	19	1.6	6.25	0.8	3.13
<i>M. marinum</i>	10	6.25	25	6.25	25
<i>M. scrofulaceum</i>	19	3.13	50	6.25	25
<i>M. avium</i>	18	12.5	50	12.5	50
<i>M. intracellulare</i>	31	100	>100	25	50
<i>M. fortuitum</i>	20	0.4	0.4	0.4	0.8
<i>M. chelonae (abscessus)</i>	15	100	>100	100	>100
<i>M. chelonae (chelonae)</i>	20	12.5	100	12.5	50

Table 2. Activities of New Quinolones, Y-26611 and Ofloxacin, against *M. tuberculosis* H₃₇Rv Phagocytosed in Murine Peritoneal Macrophages

Drug	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	CFU/100 macrophages		
		Incubation time (days)		
		0	3	5
None	—	9.9±0.5	26.0±2.3	66.7±12.8
Y-26611	1	—	20.1±2.1	18.4±1.3
	10	—	4.6±0.5	1.8±0.2
Ofloxacin	1	—	13.2±0.9	11.0±2.0
	10	—	1.6±0.2	0.8±0.3

代表的病原性抗酸菌に対する Y-26611 並びに OFLX の抗マイコバクテリア活性は Table 1 に示すようである。すなわち、Y-26611 は供試菌の中でも *M. tuberculosis*, *M. kansasii* および *M. fortuitum* に対して比較的優れた抗菌活性を有し、その MIC₉₀ はそれぞれ 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ および 0.4 $\mu\text{g/ml}$ であり、その他の抗酸菌に対してもこれらに対すると同様その抗菌活性は OFLX のそれと同程度か若干劣るものようであった。

2. M ϕ 内被貪食 *M. tuberculosis* に対する抗菌活性

Table 2 に示すように、*M. tuberculosis* 貪食 M ϕ の培養液中へ Y-26611 の 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加による菌の細胞内増殖は、薬剤非添加対照におけるよりも培養 3 日後では約 23 %、5 日後では約 72 % の抑制がみられ、また 10 $\mu\text{g/ml}$ の添加ではそれぞれ約 82 % 並びに 97 % の抑制がみられた。しかしながら、その M ϕ 内抗菌活性は OFLX に比べると弱く、1 $\mu\text{g/ml}$ を添加した場合、培養 3 日後では OFLX の約 2/3、5 日後では OFLX の約 3/5 であり、また 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加した場合で

はそれぞれ OFLX の約 1/3 並びに 1/2 の活性がみられたにすぎなかった。

3. 実験的マウス *M. fortuitum* 感染に対する治療効果

Y-26611 あるいは OFLX 投与並びに非投与 *M. fortuitum* 感染マウスの 28 日後における生存率は Fig. に示すようである。非治療対照マウスでは感染 6 日目に全例が斃死したのに対して、Y-26611 の 0.5, 1 あるいは 2 mg 投与マウス群の生存率はいずれも 80 % であり、他方 OFLX では 2 mg 投与群で 100 %, 0.5 および 1 mg 各投与群でともに 60 % であった。

次に、Table 3 は上記マウスの体重の増減、spinning disease 発現の有無とその平均初発所要日数および腎病変の有無とその程度を示したものである。これから分かるように、Y-26611 の 1 あるいは 2 mg 投与によって生残あるいは斃死マウスの別なく、体重の減少と腎病変の発現頻度とその程度が非治療対照群におけるよりも軽度であり、この傾向は OFLX 投与群においても同様であった。

Spinning disease の発現は Y-26611 あるいは OF

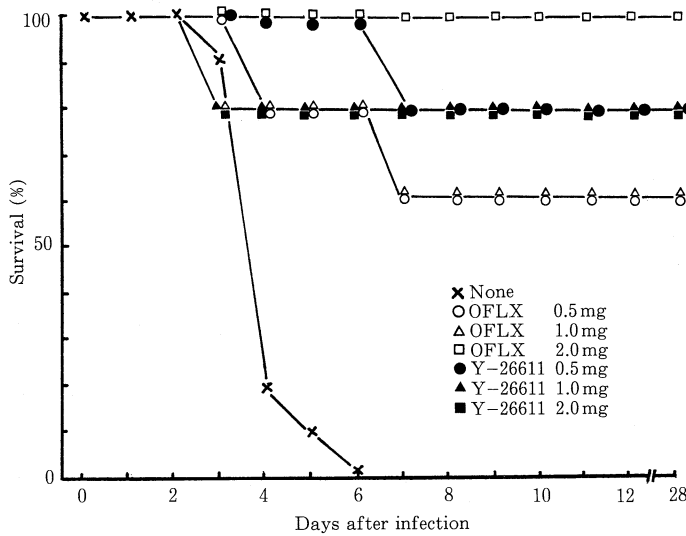


Fig. Comparative therapeutic efficacy of Y-26611 and ofloxacin in terms of survival rate of *M. fortuitum*-infected mice

Table 3. Therapeutic Efficacies of Y-26611 and Ofloxacin in Terms of Increase in Body Weight, Incidence of Spinning Disease and Gross Renal Lesions of *M. fortuitum*-Infected Mice

Drug	Dose (mg)	No. of mice	Fate	Survival time (day)	Increase in body weight (g)	Spinning disease		Renal lesions ^{a)}		
						-	+	(day)	-	1+
None	-	10	Died	4~6	-6.0±0.2	10	0	0	0	10
Y-26611	0.5	1	Died	7	-8.5	1	0	0	0	1
		4	Killed	28	-1.5±0.6	0	4(10)	0	1	3
	1.0	1	Died	3	-5.0	1	0	0	0	1
		4	Killed	28	-2.4±1.5	0	4(12)	3	0	1
	2.0	1	Died	4	-4.5	1	0	0	0	1
		4	Killed	28	-0.3±0.4	1	3(16)	4	0	0
Ofloxacin	0.5	2	Died	4~7	-6.5	2	0	0	0	2
		3	Killed	28	-1.5±1.0	0	3(16)	0	0	3
	1.0	2	Died	3~7	-7.0	2	0	0	0	2
		3	Killed	28	0.5±1.0	1	2(15)	3	0	0
	2.0	5	Killed	28	1.1±0.4	5	0	5	0	0

a) 1+, Small discrete lesions covering <25% of surface; 2+, confluent lesions covering 25~50% of surface.

LX 投与群と対照群との別なく感染早期（1週以内）に斃死した動物では全くみられなかったが、28日の長期にわたって観察した動物ではY-26611投与群とOFLX投与群の別なく、またOFLX 2mg投与群を除いては投与量（0.5, 1, 2 mg）の別なく、すべてあるいはほとんどすべての動物にみられた。

Table 4はY-26611あるいはOFLX投与並びに非投与*M. fortuitum*感染マウスの臓器内CFUを示した

ものである。Y-26611投与群とOFLX投与群とを問わず感染28日間生存していたマウスのみならず、3~7日目に斃死したマウスでも臓器内CFUは非投与対照群におけるよりも著しく減少し、両群間に差はみられなかったが、その程度は前者において後者におけるよりも顕著であった。なお、Y-26611並びにOFLXとも脾の腫大の軽減作用はみられなかった。

Table 4. Therapeutic Efficacies of Y-26611 and Ofloxacin in Terms of Splenomegaly and the Number of CFU in the Visceral Organs of *M. fortuitum*-Infected Mice

Drug	Dose (mg)	No. of mice	Fate	Survival time (day)	Spleen / body weight (%)	Log CFU/organ		
						Lungs	Spleen	Kidneys
None	—	10	Died	4~6	0.51±0.04	7.09±0.07	6.02±0.13	8.08±0.08
Y-26611	0.5	1	Died	7	0.47	5.01	5.18	5.21
		4	Killed	28	0.96±0.25	2.83±0.10	<1.77	3.28±0.50
	1.0	1	Died	3	0.45	5.39	5.96	5.88
		4	Killed	28	0.74±0.15	2.18±0.24	1.92±0.15	3.44±0.46
	2.0	1	Died	4	0.33	5.67	5.44	5.17
		4	Killed	28	1.07±0.09	2.04±0.16	<1.77	1.96±0.19
Ofloxacin	0.5	2	Died	4~7	0.40	5.30	5.34	6.12
		3	Killed	28	1.15±0.04	2.58±0.11	<1.77	4.50±0.21
	1.0	2	Died	3~7	0.44	5.46	5.82	6.31
		3	Killed	28	1.05±0.58	2.63±0.08	<1.77	1.97±0.20
	2.0	5	Killed	28	1.60±0.09	2.53±0.15	1.80±0.04	<1.77

考 察

ニューキノロン系薬剤 Y-26611 の一般細菌に対する *in vitro* 抗菌活性は、OFLX のそれよりも強いあるいはほぼ同等であると報告されている¹⁾。今回のわれわれの代表的病原性抗酸菌に対する本剤の *in vitro* 抗菌活性は供試 8 菌種中 *M. tuberculosis* 並びに *M. fortuitum* の 2 菌種に対しては OFLX よりも若干優れたものであったが、その他の菌種に対する活性は OFLX と同程度あるいは若干劣るものであった。

Y-26611 をマウスに 50mg/kg 経口投与した場合の血清濃度は約 1 µg/ml であること⁴⁾ を勘案し、本剤の 1 µg/ml 並びに 10 µg/ml のマクロファージ内被食食 *M. tuberculosis* に対する抗菌活性を OFLX のそれと比較検討した。その結果、Y-26611 は OFLX の 1/2 の MIC を示すにもかかわらず、マクロファージ内被食食菌に対する抗菌力は逆に OFLX の方がやや優れているものようであった。これは、Y-26611 が OFLX に比べてマクロファージ内への移行性が劣ることによるものと思われる。

Y-26611 と OFLX の *M. fortuitum* に対する MIC は同様 (0.4 µg/ml) であり、Y-26611 の血中への移行性は OFLX における約 1/4 である⁴⁾ にもかかわらず、実験のマウス *M. fortuitum* 感染に対する治療効果は OFLX とほぼ同程度であった。このことは、既存 (NFLX, OFLX, CPFX) のキノロン剤がセフェム系薬剤と同様、免疫反応増強効果があるとする報告⁵⁾⁻⁷⁾ を勘案する時、Y-26611 にも免疫賦活作用のある可能性が示唆されよう。

ま と め

(1) Y-26611 の代表的病原性抗酸菌に対する *in vitro* 抗菌活性は *Mycobacterium tuberculosis* 並びに *M. fortuitum* に対しては OFLX よりも強いが、*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. chelonae* に対しては OFLX のそれと同程度か、若干劣るものであった。

(2) Y-26611 のマウス腹腔マクロファージ内被食食 *M. tuberculosis* に対する抗菌活性は OFLX におけるよりもやや劣るものであった。

(3) *M. fortuitum* 感染マウスに対する Y-26611 の治療効果は OFLX におけるとほぼ同等であった。

文 献

- 1) Yokota, T. Kanda, K. Hirayama, F. : Y-26611, its antibacterial activity, cytotoxicity to mammalian cells, and synergy with serum complement or mouse cultured macrophage, 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract No. 390, Atlanta, U. S. A., 1990.
- 2) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について, *Chemotherapy*, 29 : 76~79, 1981.
- 3) Saito, H. Sato, K. Tomioka, H. : Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and rifampicin against *Mycobacterium*

- avium* complex, *Tubercle*, 69 : 187-192, 1988.
- 4) Ikeda, Y. Iwao, E. Yokoyama, Y. et al. : Tissue distribution and drug interaction of Y-26611, a novel quinolone compound in mice and rats, 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract No. 391, Atlanta, U. S. A., 1990.
 - 5) Forsgren, A. Bergh, A. -K. Brandt, M. et al. : Quinolones affect thymidine incorporation into the DNA of human lymphocytes, *Antimicrob Agents Chemother*, 29 : 506-508, 1986.
 - 6) Ohnishi, H. Inaba, H. Mochizuki, H. et al. : Mechanism of action of AC-1370 on phagocyte functions, *Antimicrob Agents Chemother*, 25 : 88-92, 1984.
 - 7) 佐藤勝昌, 斎藤 肇, 富岡治明 : Cefpimizole (AC-1370) の *in vitro* 並びに *in vivo* 抗抗酸菌活性とマクロファージの活性酸素産生能に及ぼす効果, *結核*, 63 : 19-24, 1988.