

原 著

新キノロン系薬剤, NM394 の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

受付 平成5年1月18日

IN VITRO ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF
A NEW QUINOLONE, NM394

Haruaki Tomioka, Katsumasa Sato and Hajime Saito *

(Received for publication January 18, 1993)

We evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of NM394 and ofloxacin (OFLX) against representative pathogenic mycobacteria by the agar dilution method, using 7H11 agar medium. NM394 showed appreciable antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* (MIC₉₀ = 0.78 µg/ml), *M. kansasii* (MIC₉₀ = 6.25 µg/ml), *M. marinum* (MIC₉₀ = 3.13 µg/ml) and *M. fortuitum* (MIC₉₀ = 3.13 µg/ml), whereas the agent was not active against *M. scrofulaceum* (MIC₉₀ = > 100 µg/ml), *M. avium* (MIC₉₀ = 50 µg/ml), *M. intracellulare* (MIC₉₀ = > 100 µg/ml), *M. chelonae* subsp. *abscessus* (MIC₉₀ = > 100 µg/ml) and *M. chelonae* subsp. *chelonae* (MIC₉₀ = 25 µg/ml). The *in vitro* antimicrobial activity of the agent against *M. fortuitum* was a little more active than that of OFLX, whereas the activity of NM394 against the other mycobacteria was slightly inferior to that of OFLX. The antimycobacterial activity of NM394 against *M. tuberculosis* H₃₇Rv (MIC : NM394 = 0.78 µg/ml, OFLX = 0.78 µg/ml) phagocytosed in murine peritoneal macrophages was less active than that of OFLX, when the macrophages were cultured in RPMI-1640 medium containing 1 µg/ml or 10 µg/ml of these agents for up to 5 days.

Key words : NM394, NM441, Antimicrobial activity, *Mycobacterium tuberculosis*

キーワード : NM394, NM441, 抗菌活性, *Mycobacterium tuberculosis*

はじめに

NM394 は日本新薬株式会社および明治製菓株式会社で開発中のニューキノロン系薬剤で, 本剤はグラム陽性菌および陰性菌に対して, 広範な抗菌スペクトルを有し, これら菌種に対する MIC₉₀ は ciprofloxacin (CPFX) のそれと同等か2倍程度であり, ofloxacin (OFLX)

との *in vitro* 抗菌活性の比較では, 緑膿菌や腸内細菌などに対しては2~8倍強く, ブドウ球菌やレンサ球菌に対してはほぼ同等といわれている¹⁾。

NM394 はこのように強い抗菌活性を有するにもかかわらず, 諸種細菌による実験感染に対する経口投与ではあまり治療効果はみられず, これは本剤の腸管吸収性の悪いことに起因するものと考えられている²⁾。そこで,

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

体内吸収性が優れたプロドラッグの NM441 が開発され、これは経口投与後腸管壁より吸収され、速やかに抗菌活性体 NM394 に代謝され、諸種細菌による実験的マウス感染に対して OFLX や CPFY よりも優れた効果を示すことが報告されている²⁾。

今回、われわれは NM441 の活性本体である NM394 の *in vitro* 抗マイコバクテリア活性について検討したので以下報告する。

材料と方法

1. 供試薬剤

NM394 の他に対照として OFLX (第一製薬) を用いた。

2. 供試菌株

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. *abscessus* 15 株および *M. chelonae* subsp. *chelonae* 20 株を用いた。*M. avium* および *M. intracellulare* はわれわれにより、これら菌種の Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System³⁾ (Gen-Probe, 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 (SmT) を有するものである。

3. MIC 測定

7H9 液体培地 (Difco) 中 37°C, ただし *M. marinum* と *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C, OD_{540nm} = 0.1 の培養菌 (3~7 日培養) を 0.1% Tween 80 加生食水で 10 倍希釈し (約 10⁶ CFU/ml), その 5 μ l を, 100~0.025 μ g/ml に至る 2 倍階段希釈濃度の薬剤含有 7H11 寒天平板 (Difco) 上にマイクロプランター (佐久間製作所) でスポットし, 37°C (*M. marinum* と *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C), 迅速発育菌は 7 日, また遅発育菌は 14 日培養後に菌発育の有無を観察し, MIC 値を求めた。ただし, 5 個以下の集落の場合は発育陰性と判定した⁴⁾。

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

既報の方法⁵⁾ に準じて検討した。すなわち, Zymosan A (Sigma) 1 mg を BALB/c 系雌マウス (8 週齢) の腹腔内へ投与し, その 4 日後に 2% 牛胎児血清加 Hanks' balanced salt solution (FBS-HBSS) で腹腔浸出細胞を採取した。得られた細胞は洗浄後, 10% FBS-RPMI 1640 培地 (FBS-RPMI) (白水製薬) に浮遊させ, その 1 ml (7.5 \times 10⁵) を培養 well (16 mm) (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

着細胞を除去し, 得られた付着細胞を M ϕ として用いた。

この M ϕ 細胞に FBS-RPMI による *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株 (MIC : NM394 = 0.78 μ g/ml, OFLX = 0.78 μ g/ml) の菌浮遊液 (4.1 \times 10⁶ CFU/ml) の 1 ml を加え, 5% CO₂ 下, 37°C, 1 時間培養後, 非貪食菌を FBS-HBSS で洗浄, 除去した。これに NM394 あるいは OFLX の 1 μ g/ml あるいは 10 μ g/ml 含有 FBS-RPMI の 1 ml を加え, さらに 5 日間培養 (その間, 1 日 1 回新鮮培地と交換) した。所定日数後に培養液を除去し, M ϕ 細胞を FBS-HBSS で洗浄後, 2 ml の蒸留水を加えて超音波処理して細胞を破壊し, M ϕ 内の生菌単位を 7H11 寒天平板を用いて 37°C, 14 日培養後に求める一方, 上記したと同様に培養した感染 M ϕ を Giemsa 染色し, その数を鏡検・算定し, M ϕ あたりの生菌単位でもって表した。

結 果

1. *in vitro* 抗菌力

NM394 並びに OFLX (対照) の主要病原性抗酸菌に対する MIC は Table 1 に示すようである。すなわち, NM394 の *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum* および *M. fortuitum* に対する MIC₉₀ はそれぞれ 0.78, 6.25, 3.13 および 3.13 μ g/ml で, 比較的強い抗菌活性を示したが, 他の供試菌種に対しては 25~>100 μ g/ml と高いものであった。

Fig. は *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum* および *M. fortuitum* の本剤並びに OFLX に対する感受性分布を示したものである。これから分かるように, *M. fortuitum* に対する本剤の感受性分布曲線は OFLX のそれよりも若干左方 (低 MIC 側) へ移動し, MIC のピーク値は, NM394 では 1.56 μ g/ml であったのに対して OFLX では 3.13 μ g/ml であった。しかし, これを除く他菌種では NM394 に対する感受性分布曲線は OFLX のそれよりも右方 (高 MIC 側) へ移動する様相を呈した。また, 図には示さなかったが, *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. chelonae* についても同様な傾向がみられた。すなわち, NM394 の抗菌活性は, *M. fortuitum* に対しては OFLX よりも幾分強いが, 他の代表的病原性抗酸菌に対しては弱いものといえよう。

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 を NM394 1 μ g/ml 含有培養液中で培養した場合の M ϕ 内菌数は薬剤非添加対照におけるよりもむしろ増加傾向がみられたが, 10 μ g/ml の添加では, 薬剤非添加対照におけるよりも培養 3 日後では約 50%, 5 日後では約 80

Table 1 MICs of NM394 against Various Mycobacteria

Species	Number of strains	MICs ($\mu\text{g/ml}$)			
		NM394		OFLX	
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>M. tuberculosis</i>	25	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>M. kansasii</i>	19	1.56	6.25	0.78	3.13
<i>M. marinum</i>	10	3.13	3.13	1.56	3.13
<i>M. scrofulaceum</i>	19	12.5	>100	3.13	12.5
<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	1.56	3.13	3.13	3.13
<i>M. chelonae (abscessus)</i>	15	>100	>100	100	>100
<i>M. chelonae (chelonae)</i>	20	1.56	25	6.25	25

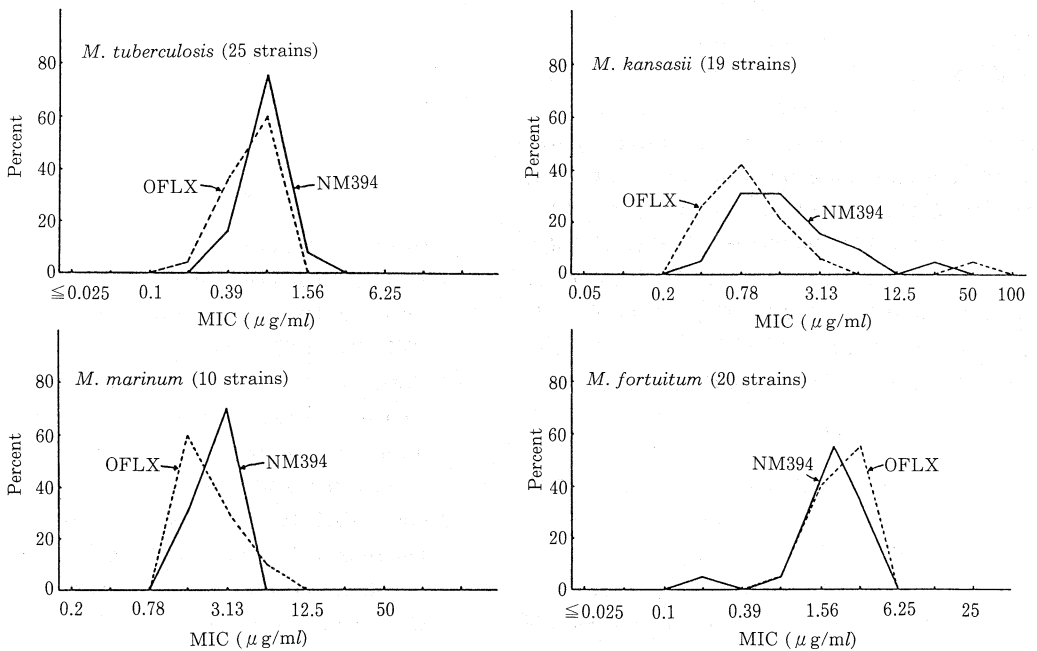


Fig. Distribution of Susceptibility of *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum* and *M. fortuitum* to NM394

の抑制がみられた。他方、OFLXのM ϕ 内被食*M. tuberculosis*に対する増殖抑制作用はNM394よりも強く、培養3日および5日後ともNM394の約2倍の抗菌活性を示した。

考 察

NM394の*in vitro*抗菌活性は、グラム陽性菌と陰性菌とを問わず、ほとんどの菌種に対してOFLXよりも強いことが報告されている¹⁾。今回、われわれは、本

剤の主要病原性抗酸菌8菌種 (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* および *M. chelonae*) に対する抗菌活性を検討したところ、*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum* および *M. fortuitum* に対しては OFLX とほぼ同等の優れた抗菌活性を示したが、その他の菌種に対しては OFLX と同等あるいは高い MIC 値を示した。

NM441の20mg/kgをマウスに経口投与した場合、

Table 2 Antimicrobial Activity of NM394 against *M. tuberculosis* H₃₇Rv Phagocytosed in Murine Peritoneal Macrophages

Drug	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	CFU/100 macrophages		
		Incubation time		
		0 d	3 d	5 d
None	—	38.8 \pm 0.55	248 \pm 7.20	507 \pm 43.2
NM394	1	—	378 \pm 123	806 \pm 96.3
	10	—	131 \pm 11.5	99.2 \pm 10.8
OFLX	1	—	185 \pm 9.43	245 \pm 21.9
	10	—	70.1 \pm 12.7	49.1 \pm 9.32

抗菌活性を有する代謝産物である NM394 の C_{max} と $AUC_{0-\infty}$ (area under the serum concentration-time curve from 0 h to infinity) はそれぞれ $0.83 \mu\text{g/ml}$ 並びに $1.687 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ であり、OFLX のそれら (各 $2.39 \mu\text{g/ml}$ および $4.637 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$) よりも劣ることが報告されている²⁾。他方、Ozaki ら²⁾ は、*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* などによる実験的マウス感染に対して、NM441 は OFLX や CPFX と比較して有意な ED₅₀ 値の減少や臓器内 CFU の減少がみられたことから、この *in vivo* 抗菌活性の発現には *in vitro* 抗菌活性並びに血中濃度以外の因子の関与が示唆されると述べている。今後、われわれはこの点に意を払って NM441 の抗酸菌感染治療実験を検討したい。

結 語

NM394 の主要病原性抗酸菌に対する *in vitro* 抗菌活性を 7H11 寒天希釈法によって ofloxacin (OFLX) と比較検討し、概略以下の知見を得た。

(1) NM394 の *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum* および *M. fortuitum* に対する MIC₉₀ はそれぞれ $0.78 \mu\text{g/ml}$, $6.25 \mu\text{g/ml}$, $3.13 \mu\text{g/ml}$ および $3.13 \mu\text{g/ml}$ で OFLX と同等の比較的強い抗菌活性を有したが、*M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. chelonae* に対しては OFLX と同等あるいはそれよりも高い MIC₉₀ 値を示した ($25 \sim >100 \mu\text{g/ml}$)。

(2) *M. fortuitum* を除く供試他菌種では NM394 に対する感受性分布曲線は OFLX のそれよりも右方 (高

MIC 側) へ移動する様相を示した。

(3) マウス腹腔マクロファージ被貪食 *M. tuberculosis* に対する本剤の抗菌活性は OFLX よりも劣るものであった。

謝 辞

NM394 をご提供頂いた日本新薬株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Ozaki M, Matsuda M, Tomii Y, et al. : *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 ; 35 : 2490-2495.
- 2) Ozaki M, Matsuda M, Tomii Y, et al. : *In vivo* evaluation of NM441, a new thiazetoquinoline derivative. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 ; 35 : 2496-2499.
- 3) GEN-PROBE INC. : Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System for *M. avium* Complex. *In Manual for In vitro Diagnostic Use*, Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., USA.
- 4) 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.* 1981 ; 29 : 76-79.
- 5) Saito H, Sato K, Tomioka H : Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle.* 1988 ; 69 : 187-192.