

原 著

異なる培地組成でのニューキノロン系抗菌薬 6 剤の
Mycobacterium tuberculosis 臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌活性の測定

山 根 誠 久 · Benson ZW Chilima

熊本大学医学部臨床検査医学講座

戸 坂 雅 一

同 医学部附属病院中央検査部

岡 沢 豊 · 丹 野 和 信

極東製薬工業株式会社研究開発部

受付 平成 8 年 3 月 4 日

受理 平成 8 年 5 月 16 日

DETERMINATION OF ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF
FLUOROQUINOLONES AGAINST CLINICAL ISOLATES OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: Comparative Determination
with Egg-based Ogawa and Agar-based Middlebrook 7H10 media

Nobuhisa YAMANE*, Benson ZW CHILIMA, Masakazu TOSAKA,
Yutaka OKAZAWA and Kazunobu TANNO

(Received 4 March 1996/Accepted 16 May 1996)

The minimum inhibitory concentrations (MICs) to the fluoroquinolones, ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), sparfloxacin (SPFX), norfloxacin (NFLX), balofloxacin (BLFX) and CS-940, were determined in 100 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. The MICs were determined with 1% egg-based Ogawa or agar-based Middlebrook 7H10 and each of them supplemented with oxidation-reduction color dye, 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) by using the microculture technique. The MICs determined with Ogawa medium were approximately two- to four-fold higher when compared to those determined with Middlebrook agar medium. The supplement with STC slightly increased the MICs, probably as a result of easily recognizing small initial colonies. Among the six fluoroquinolones, CS-940 and SPFX showed the greatest antimycobacterial activities with inhibition of 50% of all the isolates at the concentrations between 0.25 to 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. OFLX, CPFX and BLFX followed in potency at 0.5 to 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. NFLX was less potent requiring 8 to 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to inhibit 50% of the isolates.

* From the Department of Laboratory Medicine, Kumamoto University Medical School, 1-1-1, Honjo, Kumamoto 860 Japan.

Key words : Fluoroquinolone, Minimum inhibitory concentration, *Mycobacterium tuberculosis*, Ogawa media, Middlebrook 7H10 agar media

キーワード : ニューキノロン系抗菌薬, 最小発育阻止濃度, 結核菌, 小川培地, ミドルブルック 7H10 寒天培地

はじめに

Human immunodeficiency virus (HIV) 感染者での多剤耐性結核菌の出現とその拡がりに伴い、これらの耐性結核菌にも有効な抗結核剤の開発が緊急の課題として取り上げられている^{1)~3)}。わが国においては、初回治療時の耐性頻度は低いものの、治療中あるいは治療後に分離された菌株の耐性頻度は比較的高く、治療に抵抗する⁴⁾。Rifamycin 誘導体 (KRM-1648) などの新しい抗結核剤が開発途上にあるが⁵⁾、当面の対応として、これまで一般細菌による感染症に広く投与されてきたいくつかのニューキノロン系抗菌薬の適用が検討されている。これまでわが国の検査室では、専ら市販された小川培地での薬剤感受性試験が実施されてきたため、常用される抗結核剤のみが試験され、それ以外の抗菌剤の *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) に対する抗菌活性はほとんど測定されていない。

今回われわれは、新たに開発された2剤 (Balofloxacin, CS-940) を含む6剤のニューキノロン系抗菌薬を対象に、わが国で常用されている小川培地と寒天培地、Middlebrook 7H10 寒天培地を用い、それぞれの抗菌薬での最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) を測定したので報告する。

材料と方法

[対象抗菌薬]

MIC 測定の対象としたニューキノロン薬は以下の6剤である: Ofloxacin (OFLX; 第一製薬), Ciprofloxacin (CPFX; バイエル薬品), Sparfloxacin (SPFX; 大日本製薬), Norfloxacin (NFLX; 杏林製薬), Balofloxacin (BLFX; 中外製薬), CS-940 (三共)。いずれもそれぞれの製造元より原薬を分与され、その指示に従って一定濃度の水溶液を調整した。

[試験菌株]

熊本大学医学部附属病院中央検査部および国立療養所再春荘病院にて分離同定された *M. tuberculosis* 臨床分離株100株を試験対象とした。また精度管理の目的で American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, U.S.A.) より分与された感性株, *M. tuberculosis* ATCC 27294 を使用した。

[試験方法]

1%小川培地および Middlebrook 7H10 寒天培地の2種類の培地で MIC を測定した。また、菌発育の有無をより簡便に、正確に行う目的で、それぞれの培地に酸化還元反応呈色色素, 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) を50mg/l 濃度に添加した培地⁶⁾でも試験を行った。

先に報告したマイクロプレート培養法を用い⁷⁾、2倍濃度希釈系列の試験薬剤を含むそれぞれの培地 0.2 ml を各ウェルに分注して試験培地を作成した。試験にあたっては、まず McFarland #1 濁度 ($\sim 3 \times 10^7$ CFU/ml) に調整した *M. tuberculosis* 菌浮遊液を滅菌蒸留水にて10倍希釈し、接種菌液とした。調製した菌液 0.02 ml ずつを各ウェルに分注し、小川培地法では通常大気で、Middlebrook 7H10 寒天培地法では5% CO₂ 培養した。いずれも2週間の培養の後、菌発育の有無を判定し、菌発育のまったく認められない最小薬剤濃度を MIC とした。

各試験薬剤の測定濃度域は OFLX, CPFX, BLFX は 0.06~4.0 μg/ml, SPFX は 0.03~2.0 μg/ml, NFLX は 0.25~16 μg/ml, CS-940 は 0.015~1.0 μg/ml である。

結 果

1. 異なる培地組成, STC 添加による影響

6種類のニューキノロン薬について測定された MIC を、小川培地法、Middlebrook 寒天培地法およびそれぞれの培地に STC 色素を添加した時の条件で比較した。table 1 には、STC 添加の有無別に、小川培地法と Middlebrook 寒天培地法で測定された MIC を比較している。STC 添加の有無にかかわらず、小川培地法の MIC は Middlebrook 寒天培地法と比べ、高い傾向が観察された。6~7%の頻度で小川培地法の MIC が低く測定されているが、64% (STC 無添加)~68% (STC 添加) は小川培地法での MIC が高く、全体の50%以上は2~4倍高い MIC を示した。

Table 2 では、同一の培地で STC 添加の有無による MIC への影響を解析している。すべての MIC は 1/4~4倍以内に分布しているが、いずれの培地についても、STC 添加の培地で測定された MIC が若干高い傾向を示している。STC を添加していない培地と比べ、2倍高い MIC が28.8% (小川培地法)、32.2% (Middlebrook 寒天培地法) の頻度で観察された。

Table 1 Comparison between the MICs Determined with Ogawa and Middlebrook 7H10 Agar Media

Without STC

Fluoroquinolone	MIC ratio (MIC _{Ogawa} / MIC _{7H10})						
	1/4	1/2	1	2	4	8	16
Ofloxacin	0	4	32	40	12	10	2
Ciprofloxacin	0	5	15	23	42	12	3
Sparfloxacin	0	5	32	44	13	3	3
Norfloxacin	0	4	19	50	21	6	0
Balofloxacin	0	5	31	35	12	12	5
CS-940	1	12	49	26	11	1	0
Total	1	35	178	218	111	44	13
(% ratio)	(0.2)	(5.8)	(29.7)	(36.3)	(18.5)	(7.3)	(2.2)

With STC

Fluoroquinolone	MIC ratio (MIC _{Ogawa} / MIC _{7H10})						
	1/4	1/2	1	2	4	8	16
Ofloxacin	0	4	24	48	12	8	4
Ciprofloxacin	0	2	20	32	31	13	2
Sparfloxacin	0	4	27	38	18	8	5
Norfloxacin	0	3	25	30	29	13	0
Balofloxacin	0	9	22	35	17	11	6
CS-940	1	17	34	25	15	6	2
Total	1	39	152	208	122	59	19
(% ratio)	(0.2)	(6.5)	(25.3)	(34.7)	(20.3)	(9.8)	(3.2)

Table 2 Influence of STC on the MIC Determination with the Respective Culture Media

Ogawa media

Fluoroquinolone	MIC ratio (MIC _{STC(+)} / MIC _{STC(-)})				
	1/4	1/2	1	2	4
Ofloxacin	0	7	55	30	8
Ciprofloxacin	1	10	54	27	8
Sparfloxacin	0	5	63	22	10
Norfloxacin	0	5	52	31	12
Balofloxacin	0	8	52	31	9
CS-940	0	7	50	32	11
Total	1	42	326	173	58
(% ratio)	(0.2)	(7.0)	(54.3)	(28.8)	(9.7)

Middlebrook 7H10 agar media

Fluoroquinolone	MIC ratio (MIC _{STC(+)} / MIC _{STC(-)})				
	1/4	1/2	1	2	4
Ofloxacin	0	5	63	26	6
Ciprofloxacin	0	5	54	35	6
Sparfloxacin	0	11	61	25	3
Norfloxacin	0	16	39	41	4
Balofloxacin	0	11	49	34	6
CS-940	0	12	54	32	2
Total	0	60	320	193	27
(% ratio)	(0.0)	(10.0)	(53.3)	(32.2)	(4.5)

Table 3 Correlation and Linear Equation between the MICs Determined with the Respective Culture Media

Culture media (x)	Culture media (y)			
	Ogawa	Ogawa with STC	Middlebrook	Middlebrook with STC
Ogawa	—	$y=0.92x + 0.52^a$	$y=0.79x - 0.90$	$y=0.79x - 0.56$
Ogawa with STC	0.915 ^b	—	$y=0.75x - 1.22$	$y=0.75x - 0.89$
Middlebrook	0.833	0.799	—	$y=0.91x + 0.29$
Middlebrook with STC	0.847	0.812	0.927	—

Each linear equation^a and correlation coefficient^b were calculated on the basis of \log_2 (MIC).

Table 4 MICs of Fluoroquinolones against Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

Fluoroquinolone	MIC ($\mu\text{g/ml}$) determined with Ogawa media ;					
	without STC			with STC		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
Ofloxacin	2.0	4.0	0.25~>4.0	2.0	>4.0	0.25~>4.0
Ciprofloxacin	2.0	4.0	0.25~>4.0	2.0	>4.0	0.5~>4.0
Sparfloxacin	0.5	2.0	0.06~>2.0	0.5	2.0	0.06~>2.0
Norfloxacin	16	>16	1.0~>16	16	>16	1.0~>16
Balofloxacin	1.0	4.0	0.125~>4.0	2.0	4.0	0.125~>4.0
CS-940	0.25	0.5	0.03~>1.0	0.5	1.0	0.03~>1.0

Fluoroquinolone	MIC ($\mu\text{g/ml}$) determined with Middlebrook 7H10 ;					
	without STC			with STC		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
Ofloxacin	1.0	2.0	0.125~>4.0	1.0	2.0	0.25~>4.0
Ciprofloxacin	1.0	2.0	0.125~>4.0	1.0	2.0	0.25~>4.0
Sparfloxacin	0.25	1.0	$\leq 0.03 \sim >2.0$	0.25	0.5	0.06~>2.0
Norfloxacin	8.0	>16	0.5~>16	8.0	>16	1.0~>16
Balofloxacin	0.5	2.0	0.125~>4.0	1.0	2.0	0.25~>4.0
CS-940	0.25	0.5	0.03~>1.0	0.25	0.5	0.06~>1.0

Table 3には異なる4種類の試験培地で測定されたMIC相互の相関係数と一次直線回帰式をまとめている。相関係数は同じ培地間(小川培地 vs 小川培地/STC添加, Middlebrook 寒天培地 vs Middlebrook 寒天培地/STC添加)で比較的高い値を示し,それぞれ0.915, 0.927であった。それぞれの組み合わせで得られた一次直線回帰式は, Middlebrook 寒天培地法でのMICが, 小川培地法のMICと比べ若干低い値を示し, y -切片は負の値(-0.56~-1.22)となった。またいずれの培地についてもSTC添加の培地で得られたMICが若干高い傾向にあり, その y -切片は正の値(+0.52, +0.29)を示した。

2. 各ニューキノロン薬に対するMIC分布

Table 4には今回試験対象とした6剤でのMIC分布

をその試験方法別にまとめている。先の解析からも示されたように, すべての薬剤について小川培地法がより高いMICを示し, また, 特に小川培地法ではSTCの添加によってさらに高くなる傾向が観察された。

Fig.にはそれぞれの試験培地での各薬剤のMIC累積分布を示している。試験した6剤のニューキノロン薬はおおむね3つのグループに大別することができる。いずれの試験方法でも最も高い抗菌活性を示すのがCS-940とSPFXで, MIC₅₀, MIC₉₀はそれぞれ0.25~0.5, 0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$ に算出された。第2のグループはBLFX, OFLX, CPFxの3剤で, CS-940, SPFXと比べ4~8倍高いMICを示し, MIC₅₀, MIC₉₀はそれぞれ0.5~2.0, 2.0~>4.0 $\mu\text{g/ml}$ にあった。NFLXは検討した薬剤のなかで最も抗菌活性が劣り, MIC₅₀

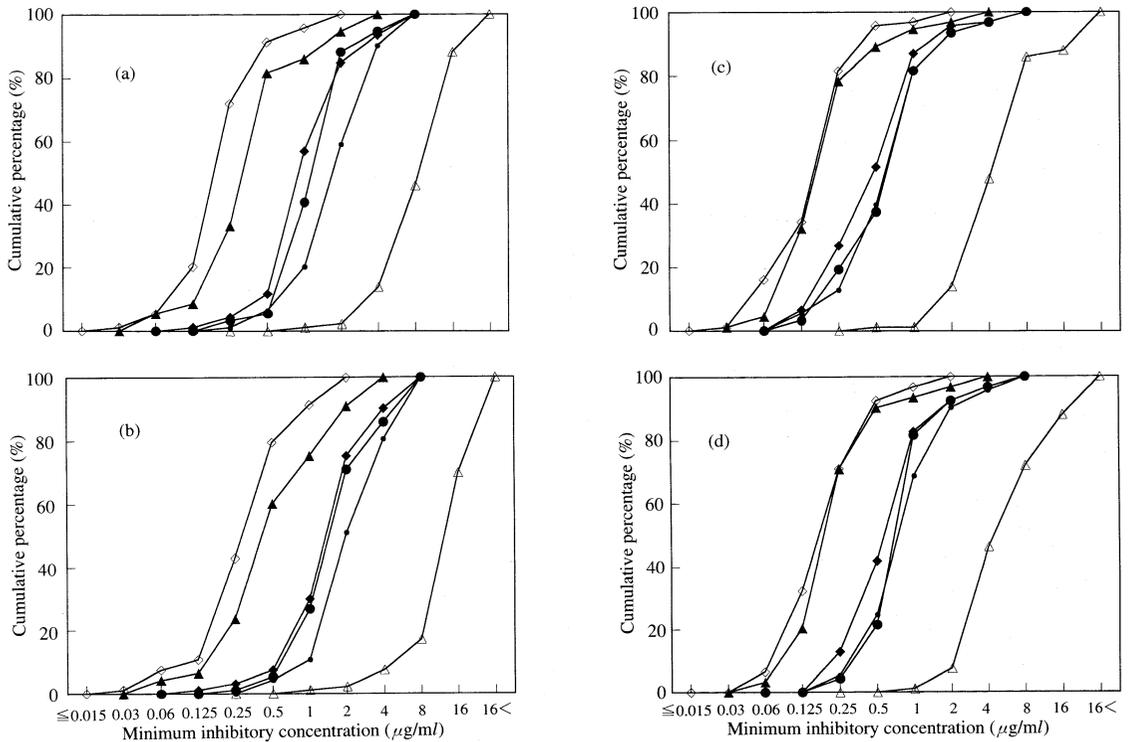


Fig. Cumulative distributions of the MICs determined with the respective culture media against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.

●-●: OFLX; ●-●: CPFX; ▲-▲: SPFX; △-△: NFLX; ◆-◆: BLFX; ◇-◇: CS-940

(a) MICs determined with Ogawa media. (c) MICs determined with Middlebrook 7H10 agar media.

(b) As (a), but media supplemented with STC. (d) As (c), but media supplemented with STC.

も 8.0~16 μg/ml, MIC₉₀ は測定域の上限を越えた (>16 μg/ml)。

考 察

今回のわれわれの検討は、まずニューキノロン系抗菌薬を対象とする *in vitro* 薬剤感受性試験を基礎的に検討することに最初の目的がある。これまで検査室で試験されてきた Rifampicin, Isoniazid などの抗結核剤は、既に長年の使用経験から小川培地での試験薬剤濃度が決定され、Middlebrook 7H10 寒天培地での判定結果と互換性をもたせることも可能となっている⁷⁾。しかし小川培地では薬剤の種類によって卵成分による吸着、失活の程度が大きく異なり、用いる培地の種類によって MIC が変動してくる⁸⁾。したがって、ニューキノロン薬の抗菌活性 (MIC) を測定する際にも、まず培地による差異がどの程度観察されるのか確認する必要がある。われわれの検討では、Middlebrook 7H10 寒天培地と比べ、小川培地で得られる MIC は 2~4 倍高い値を示した。このことは、ニューキノロン薬についても小川培

地法では若干の薬剤の吸着あるいは失活が避けられないことを示唆している。

酸化還元反応呈色色素, STC を培地に添加する方法でも MIC は若干高い値を示した。小川培地, Middlebrook 寒天培地, いずれについてもこの傾向が観察されている。すでに報告したわれわれの成績⁶⁾⁷⁾でも、同じ現象が確認されており、STC 添加によって菌苔が紅色に着色することから、ウェル内に発育した菌コロニーの観察が容易となり、そのため STC 無添加では見逃されていた微小な菌発育を識別していると考えられる。

今回検討したニューキノロン薬の一部については、内外から MIC 測定成績が報告されている。米国での成績⁹⁾¹⁰⁾を MIC₉₀ で比較すると、SPFX が最も高い抗菌活性を示し、0.25 μg/ml, 次いで OFLX, CPFX の 1.0 μg/ml, NFLX の 8.0 μg/ml であり、今回のわれわれの成績と比較すると 2~4 倍低い値が報告されている。これは、すでにこれらのニューキノロン薬が臨床で広く使用されるようになってきていること、また今回われわれが使用した菌株は結核症治療の既往のある患者由来のもの

が含まれていることに原因が求められるものと思われる。

今回新たに評価した2剤のニューキノロン薬, BLFX, CS-940では, 特にCS-940で *M. tuberculosis* に対する高い抗菌活性が示された。そのMICはほぼSPFXと同等であり, MIC₅₀/MIC₉₀は0.25~0.5/0.5~1.0 μg/mlに評価された。CS-940は, 一般細菌についてもOFLX, CPFXと同等の抗菌活性をもつとされ, 特にグラム陽性球菌, 偏性嫌気性菌に有効とされている¹¹⁾。*M. tuberculosis*を対象とした抗菌活性測定の結果はわれわれの報告が最初であり, 今後, 結核症を対象とした臨床評価が待たれる。

すでにこれまでの臨床経験から, ニューキノロン薬の単剤投与, また長期間排菌の継続する患者では, 投与されたニューキノロン薬に対する耐性菌が早期に出現してくることが観察されている。しかし現在のところ, 臨床的ニーズが高まっているにもかかわらず, 検査室ではこれらの薬剤を対象とした薬剤感受性試験がまったく実施できない状態にある。今後の多様な抗結核薬の開発, 応用を考えた場合, 簡便で, 柔軟性のある薬剤感受性試験を早期に開発することが急務と考える。

結 語

1%小川培地, Middlebrook 7H10 寒天培地, およびこれらの培地に酸化還元反応呈色色素, STCを添加した培地を用いて, 臨床分離株 *M. tuberculosis* 100株でのニューキノロン薬, 6剤のMICを測定した。

1. 用いた培地の種類によるMICの差異は, 小川培地法がMiddlebrook 寒天培地法と比較して2~4倍高い傾向を示した。また微小な菌発育も容易に識別できることから, STC添加した培地でも若干高いMICが得られた。

2. 検討した6種類のニューキノロン薬は3つのグループに大別された。SPFX, CS-940は最も高い抗菌活性を示し, 50% MICは0.25~0.5 μg/mlであった。次いでOFLX, CPFX, BLFXの3薬剤が, SPFX, CS-940と比べ, 4~8倍高いMICを示した。NFLXは検討した薬剤の中で最も抗菌活性が劣り, ほとんどの菌株のMICは8.0 μg/ml以上であった。

以上, *in vitro*で測定されたMICの分布からすると, SPFX, CS-940などのニューキノロン薬は十分臨床効果が期待される成績である。しかし予想されるニューキノロン薬耐性の菌株を正確に検出する意味からも, 早期に薬剤感受性試験が開発される必要がある。

謝 辞

本研究は(財)国際保健医療交流センターにおける研修事業の一部として行われた。

文 献

- 1) Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, et al.: An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 177-183.
- 2) Snider DE, Roper WL: The new tuberculosis. *N Engl J Med.* 1992; 326: 703-705.
- 3) Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, et al.: The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med.* 1993; 328: 521-526.
- 4) 尾形英雄: 持続排菌患者の集学的研究 2. 細菌学的立場から一薬剤感受性成績を中心に. *Kekkaku.* 1996; 71: 37-41.
- 5) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: In vitro antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 542-547.
- 6) 山根誠久, Chilima BZW, 池上あづさ, 他: 結核菌を対象とした薬剤感受性試験—異なる培地組成でのマイクロプレート法の検討—。臨床と微生物. 1995; 22: 361-369.
- 7) 山根誠久, 大岩 雄, 清田敏幸, 他: 酸化還元反応呈色色素を用いたマイクロプレート法での結核菌薬剤感受性試験の検討: NCCLS M24-Pを参照法とした複数施設での共同評価。臨床病理. 1996; 44: 456-464.
- 8) Vestal AL: Drug susceptibility tests. In: *Procedures for the isolation and identification of mycobacteria*, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 1975, 97-115.
- 9) Scully BE: Therapy of respiratory tract infections with quinolone antimicrobial agents. In: *Quinolone antimicrobial agents*, 2nd Eds Hooper DC and Wolfson JS, ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993, 339-362.
- 10) Wolfson JS: The fluoroquinolones: Clinical and laboratory considerations. *Clin Microbiol News Lett.* 1992; 14: 1-7.
- 11) Biedenbach DJ, Sutton LD, Jones RN: Antimicrobial activity of CS-940, a new trifluorinated quinolone. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 2325-2330.