

## 【原著・基礎】

## 新規経口キノロン系薬 prulifloxacin の活性体 NM 394 の type II topoisomerase 遺伝子変異緑膿菌に対する抗菌力

荒明美奈子<sup>1)</sup>・谷 真理子<sup>1)</sup>・前橋 一紀<sup>1)</sup>・原 哲郎<sup>1)</sup>・渡部 宏臣<sup>1)</sup>  
高橋 洋<sup>2)</sup>・徳江 豊<sup>2)</sup>・藤村 茂<sup>2)</sup>・五味 和紀<sup>2)</sup>・渡辺 彰<sup>2)</sup><sup>1)</sup>明治製菓株式会社薬品総合研究所\*<sup>2)</sup>東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

(平成 15 年 2 月 5 日受付・平成 15 年 3 月 3 日受理)

臨床分離の緑膿菌 77 株を被検菌として, *gyrA* および *parC* のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining regions: QRDR) の変異に伴う GyrA および ParC のアミノ酸置換と新規経口キノロン系薬 prulifloxacin の活性体 NM 394 に対する感受性の関係を検討した。*gyrA* または *parC* の変異によるアミノ酸置換が認められた株は 77 株中 24 株 (31%) 存在した。それら 24 株はすべて GyrA にアミノ酸置換が認められ, さらに ParC にもアミノ酸置換の認められる株は 18 株あったが, ParC のみにアミノ酸置換の認められる株はなかった。これらアミノ酸の置換した株の NM 394 に対する感受性は, ciprofloxacin (CPFX), levofloxacin (LVFX) および gatifloxacin (GFLX) に対する感受性と同様に低下していた。GyrA のみにアミノ酸置換が認められた株は, 被験キノロン系薬に対して軽度または中等度耐性であり, さらに ParC にアミノ酸置換が加わった株は高度耐性であった。変異株に対する NM 394, CPFX および LVFX の短時間殺菌力を比較した結果, NM 394 は MIC 濃度においていづれの変異株に対しても変異のない株に対する殺菌力と同程度であった。一方, アミノ酸置換が認められた株に対する CPFX および LVFX の殺菌力は, アミノ酸置換がない株に対する殺菌力に比べ弱かった。以上の結果から, type II topoisomerase 変異株に対する NM 394 の殺菌力は, CPFX および LVFX の殺菌力に比べ優れていることが明らかになった。

**Key words:** NM 394, 緑膿菌, gyrase, topoisomerase IV

ニューキノロン系合成抗菌薬は 1980 年代から呼吸器系, 尿路系感染症など多くの感染症の治療薬として広く使用されてきた。一方, これらのキノロン系薬に対する耐性菌の増加が近年数多く報告され, 臨床的にも問題となっている<sup>1-3)</sup>。特に, 緑膿菌のキノロン耐性については多くの報告がある<sup>3-5)</sup>。緑膿菌のキノロン耐性の機序は標的分子である type II topoisomerase (DNA gyrase, topoisomerase IV) の変異による親和性の低下, 薬剤透過性の低下および薬剤排出系の亢進などである<sup>6-9)</sup>。DNA gyrase は二本鎖の DNA を同時に切断・再結合することにより DNA に負のスーパーコイルを導入する。本酵素は A サブユニット (GyrA) と B サブユニット (GyrB) の各 2 分子で構成される 4 量体で, 各サブユニットはそれぞれ *gyrA* および *gyrB* にコードされている<sup>10-12)</sup>。また, topoisomerase IV は二本鎖 DNA を切断・再結合することにより DNA のデカテネーションを行う酵素であり, 緑膿菌ではそれぞれ *parC* および *parE* にコードされている ParC 2 分子と ParE 2 分子から構成されている<sup>13)</sup>。このうち緑膿菌のキノロン耐性にかかわっているのは, *gyrA* および *parC* 上のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-

determining regions: QRDR) と呼ばれている狭い領域に局在している変異が主なものである<sup>14,15)</sup>。

Prulifloxacin (PUFX) は, 日本新薬株式会社と明治製菓株式会社で共同開発されたプロドラッグ型経口キノロン系薬である。PUFX の活性本体 NM 394 はグラム陽性菌および陰性菌に対して幅広く優れた抗菌力を示す<sup>16,17)</sup>。特に, 緑膿菌に対しては他剤に比べ強い抗菌力を示し, 短時間殺菌力も優れている。

本研究では, 近年臨床分離された緑膿菌の *gyrA* および *parC* 変異株分離頻度, それら変異株に対する NM 394 とキノロン系薬 3 剤の抗菌活性について検討した。

**I. 材料と方法****1. 使用菌株**

1998 年に臨床材料より分離された緑膿菌 77 株を使用した。

**2. 使用薬剤**

PUFX の活性本体 NM 394 は日本新薬より分与されたものを使用した。Ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品), levofloxacin (LVFX, 第一製薬) および gatifloxacin

\* 神奈川県横浜市港北区師岡町 760

(GFLX, 杏林製薬) は市販製剤より抽出精製したものを使用した。

### 3. 抗菌力の測定

日本化学療法学会標準法<sup>18)</sup>に準じ、Mueller-Hinton agar (Difco) を用いた寒天平板希釈法で最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

### 4. 短時間殺菌力

Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) にて一夜培養した被験菌液を新鮮 MHB で  $10^6$ CFU/mL になるように希釈し、さらに  $37^\circ\text{C}$  で振盪培養した。培養開始 2 時間後に所定濃度となるように抗菌薬を添加し、抗菌薬添加 3 および 6 時間後にサンプリングし、生菌数 (CFU/mL) を測定した。

### 5. PCR および DNA 塩基配列の決定

遺伝子の増幅および DNA 塩基配列の決定は Mouneimne らの方法<sup>19)</sup>に準じた。すなわち各菌株より抽出した染色体 DNA をテンプレートとし、*gyrA* には PSE 1 (5'-GAC GGC CTG AAG CCG GTG CAC-3', ナクレチド (nt) 115-135) と PAGA 2 (5'-ACG CTC GAC CAT CGC TTC CA-3', nt 1281-1262) を、*parC* には PAPC 1 (5'-ATG AGC GAA TCC CTC GAT CTG-3', nt 1-26) と PAPC 5 (5'-TGG CCC AGT TCG CTG AGC AGC A-3', nt 434-413) をプライマーとして各 QRDR を含む領域を PCR 法にて増幅した。反応液には各プライマーのペア  $0.4\ \mu\text{M}$  と TaKaRa Ex-Taq<sup>TM</sup> (宝酒造)  $2.5\ \text{U}$  を添加した。PCR の反応条件は変性;  $94^\circ\text{C}$ , 1 分, アニーリング;  $65^\circ\text{C}$ , 1 分, 伸長反応;  $72^\circ\text{C}$ , 1 分, サイクル数; 25 とした。

増幅された各遺伝子を精製し、ABI dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (アプライドバイオシステムジャパン) の手順書にしたがって塩基配列を決定した。塩基配列決定用のプライマーとして、*gyrA* には PSE 1 および PYO 1 (5'-GCC CAC GGC GAT ACC GCT GGA-3', nt 531-511), *parC* には PAPC 1 および PAPC 5 を用いた。シークエンサーは ABI 社製 3700 を用いた。感受性株である *P. aeruginosa* PAO 1 株についても同様に塩基配列を決定し、この配列と比較し、アミノ酸置換を伴うものを変異とした。

## II. 結 果

### 1. QRDR 変異によるアミノ酸置換の頻度

アミノ酸置換のパターンから 77 株を 4 グループに分類した。I グループは置換が認められない株、II グループは *GyrA* に 1 か所置換がある株、III グループは *GyrA* と *ParC* にそれぞれ 1 か所置換がある株、および IV グループは *GyrA* に 2 か所と *ParC* に 1 か所置換のある株である (Table 1)。

*gyrA* の QRDR の変異によるアミノ酸の置換は 24 株 (31.2%) に認められた。24 株中 21 株は 83 番目の Thr

Table 1. Amino acid changes encoded by mutations in *gyrA* and *parC*

Group	Number of strains tested	Replacement in QRDR			
		GyrA		ParC	
		83 Thy	87 Asp	87 Ser	91 Glu
I	53	—*	—	—	—
II	3	Ile	—	—	—
	2	—	Asn	—	—
	1	—	Tyr	—	—
III	12	Ile	—	Leu	—
	1	Ile	—	Trp	—
	1	Ile	—	—	Lys
IV	2	Ile	Asn	Leu	—
	2	Ile	Gly	Leu	—

—\*: no mutation

が Ile に置換しており、もっとも多い置換であった。また、21 株中の 4 株ではさらに *GyrA* の 87 番目の Asp が Asn または Gly に置換していた。

*parC* の QRDR の変異によるアミノ酸置換は 87 番目の Ser が Leu または Trp に置換した株が 17 株ともっとも多く、そのほかに 91 番目の Glu が Lys に置換した株が 1 株認められた。また、*ParC* にアミノ酸置換の認められた株ではすべて *GyrA* にも置換が認められた。今回検討した株のなかでは *GyrA* の 83 番の Thr が Ile に、*ParC* の 87 番目の Ser が Leu に 2 重置換している株がもっとも多く 12 株存在した。87 番目のアミノ酸以外では 91 番目の Glu が Lys に置換した株が 1 株認められ、この株も *GyrA* の 83 番目に Ile 置換を伴っていた。

2. QRDR 変異によるアミノ酸置換と MIC との関係  
緑膿菌 77 株に対する NM 394, CPFEX, LVFX および GFLX の MIC 分布を Fig. 1 に示した。*GyrA* および *ParC* にアミノ酸置換が認められない I グループの株に対する NM 394 および CPFEX の MIC は  $0.03\sim 2\ \mu\text{g}/\text{mL}$  に分布し、LVFX は  $0.13\sim 8\ \mu\text{g}/\text{mL}$  および GFLX は  $0.06\sim 8\ \mu\text{g}/\text{mL}$  に分布していた。*GyrA* に 1 か所アミノ酸の置換が認められた II グループの株に対する NM 394 および CPFEX の MIC は 1 株を除いて  $1\sim 4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、LVFX および GFLX の MIC は  $4\sim 16\ \mu\text{g}/\text{mL}$  であり、被験薬に対する II グループの株の感受性は I グループの株に比べやや低かった。上で除外した 1 株に対する NM 394, CPFEX, LVFX および GFLX の MIC はそれぞれ 32, 32, 64 および  $32\ \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

*GyrA* および *ParC* に各 1 か所のアミノ酸置換が認められた III グループの株に対する NM 394 と CPFEX の MIC は  $8\sim 64\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、LVFX および GFLX の MIC は  $16\sim >128\ \mu\text{g}/\text{mL}$  であり、III グループの株の感受性は II グループの株に比べさらに低下していた。*ParC* のアミノ酸が置換した III グループの株のうち、91 番目の Glu が Lys へ置換した株が 1 株および 87 番目の Ser が Trp

へ置換した株が1株であり、他の12株はすべて87番目のSerがLeuへ置換していたが、Ⅲグループに分類された株の間には今回検討した薬剤に対する感受性の差は認められなかった。GyrAに2か所のアミノ酸置換の認められるⅣグループの株は試験に用いたすべての薬剤

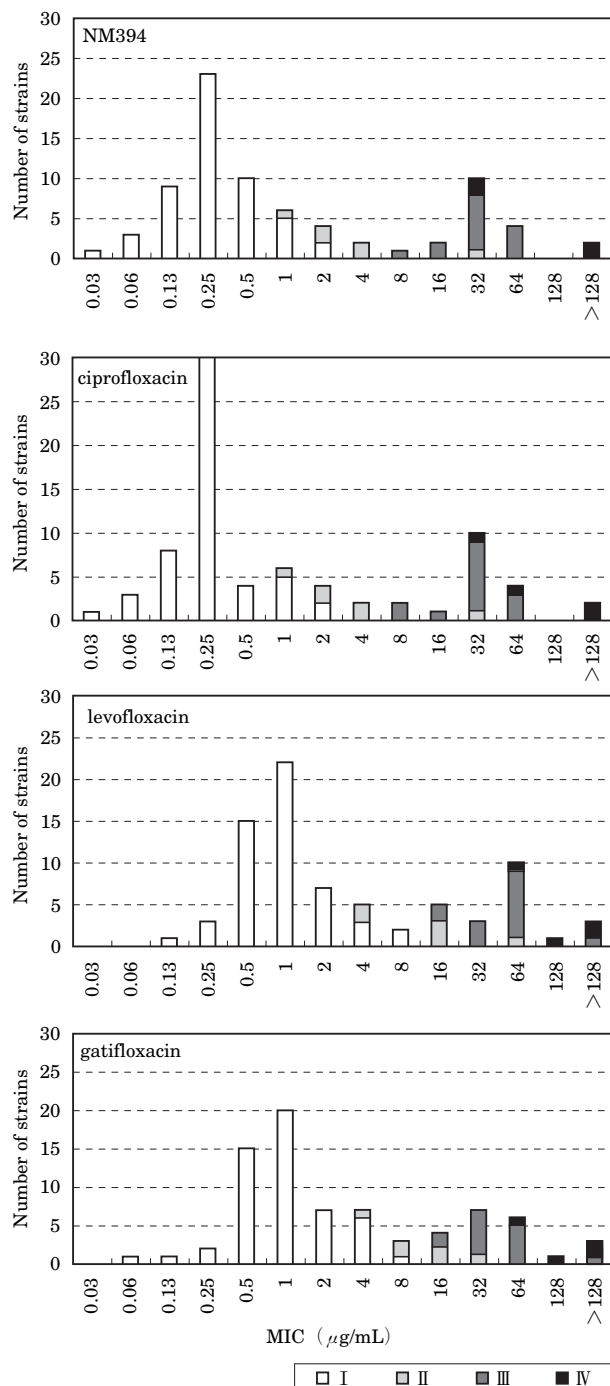


Fig. 1. Susceptibility distribution of 77 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to four quinolones. The isolates were classified into four groups according to the presence of QRDR mutations in the *gyrA* and/or *parC* genes. See Table 1 for the definitions of groups I ~ IV.

に対して高度耐性を示した。

### 3. QRDR 変異によるアミノ酸置換株に対するキノロン系薬の短時間殺菌力

I, IIおよびⅢグループから任意に選択した各5株およびⅣグループの2株に対するNM394, CFXおよびLVFXの短時間殺菌力を検討した。各薬剤の1 MICと1/2 MIC濃度の3時間および6時間作用後の生菌数(CFU/mL)の減少をFig. 2に示した。それぞれの値は、I, IIおよびⅢグループでは5株、Ⅳグループでは2株の生菌数の減少を平均した値で示した。

アミノ酸置換の認められなかったIグループの株では、NM394の1 MIC濃度を3時間および6時間作用後にそれぞれ約3.2および3.6 logの生菌数の減少が認められた。NM394はII, ⅢおよびⅣグループの株に対してもほぼ同程度に生菌数を減少させた(Fig. 2A)。CFXの1 MIC作用ではIグループの菌株はNM394とほぼ

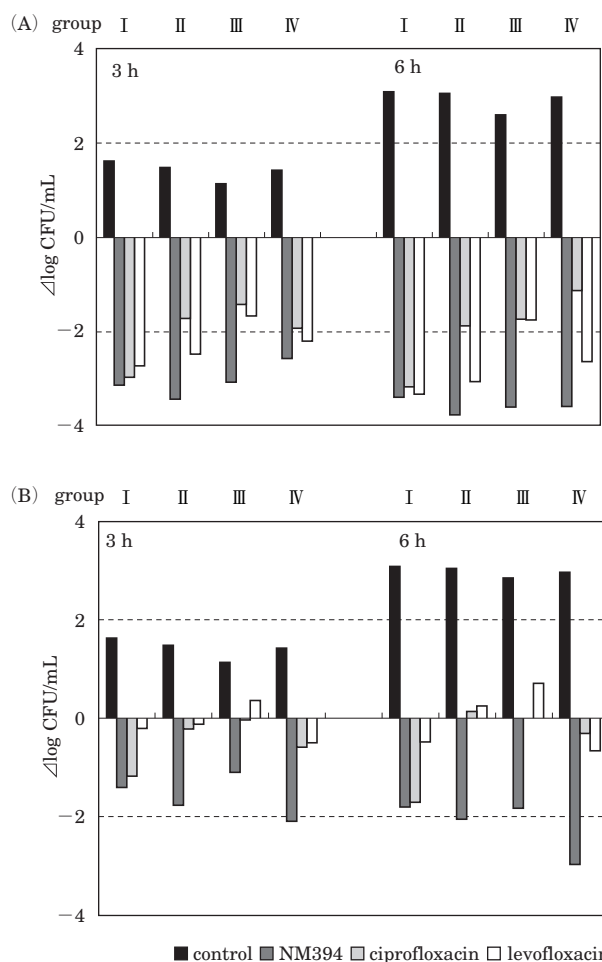


Fig. 2. Bactericidal activities of NM394, ciprofloxacin and levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* with or without mutations in the *gyrA* and/or *parC* genes of the QRDR. The means of five or two strains are shown.

(A) Antibiotic concentration of 1 MIC; (B) Antibiotic concentration of 1/2 MIC. See Table 1 for the definitions of groups I ~ IV.

同程度の生菌数の減少を示したが、II、IIIおよびIVグループの菌株では生菌数の減少はNM 394より少なかった。LVFXの1 MIC作用ではI、IIおよびIVグループの菌株の生菌数減少は、ほぼ同程度であったが、IIIグループの菌株ではCPFVと同様に生菌数の減少がNM 394に比べ少なかった。

また、NM 394はいずれのグループの株に対しても1/2 MIC濃度で生菌数を減少させた(Fig. 2B)。1/2 MICのCPFVはIグループの株の生菌数を減少させたが、変異株ではIグループの株に比べ生菌数の減少が少なくなっていた。アミノ酸置換の有無にかかわらず1/2 MICのLVFXではNM 394に比べ生菌数の減少は少なかった。

### III. 考 察

臨床分離緑膿菌77株を被験菌株として、キノロン系薬の標的分子であるtype II topoisomeraseをコードする遺伝子上のQRDRにおける変異によるアミノ酸置換のタイプとキノロン系薬の抗菌力との関係について検討した。77株のうち、QRDRの変異によるアミノ酸置換が認められた株は24株(31.2%)であり、この頻度はいままでの報告<sup>20)</sup>とほぼ一致した。変異の認められた24株ではすべて*gyrA*に変異が認められ、*parC*のみに変異の認められる株は存在しなかった。Akasakaらは、緑膿菌のDNA gyraseに対するキノロン系薬の阻害活性はtopoisomerase IVに対する阻害活性に比べ強く、キノロン系薬の緑膿菌に対する一次作用点はDNA gyraseであるとしている<sup>21)</sup>。われわれの検討でもNM 394の緑膿菌のDNA gyraseに対する阻害活性はtopoisomerase IVに対する阻害活性に比べ強く、一次作用点はDNA gyraseであると考えられる<sup>22)</sup>。疫学的検討からも、キノロン中等度耐性緑膿菌では*gyrA*変異のみしか検出されず、高度耐性株では*gyrA*変異にさらに*parC*変異が加わっていることから、緑膿菌におけるキノロン系薬の一次作用点はDNA gyraseであり、キノロン耐性変異は、まず*gyrA*で起こり、その後*parC*に起こることが示唆されている<sup>19, 23, 24)</sup>。今回の77株の検討でも、*parC*のみに変異を保有する株は認められなかった。また、*gyrA*の変異では83番目のThrのIluへの置換がもっとも多く、この変異の認められた株はすべてキノロン耐性となっていた。この結果は、従来の報告<sup>21, 24)</sup>と一致した。この変異は、大腸菌で1ステップで選択される83番目のSerがLeuへ置換する変異<sup>25)</sup>と同様に、臨床の場においてもっとも選択されやすい変異であると考えられる。この他に、*gyrA*では87番目のAspがAsnまたはGlyへの置換を伴う変異が認められ、この変異もキノロン耐性に関与していると考えられる。今回の検討では、アミノ酸の置換が認められた*gyrA*の変異はこの2か所のみであった。*parC*でもっとも頻度が高く認められたのは87番目のSerがLeuへ置換する変異であった。

この他に、87番目のSerがTrpへ、91番目のGluがLysへ置換した株が各1株認められた。緑膿菌では*gyrA*の変異に*parC*の変異が加わることによりさらにキノロン系薬に中等度から高度耐性となり、*parC*の変異はキノロン系薬に対する高度耐性化に重要であると考えられる。

これらの変異株に対するNM 394のMICは、CPFVおよびLVFXのMICと同様に上昇し、NM 394は他キノロン系薬と同様の部位に作用すると考えられる。しかし、短時間殺菌力を比較すると、NM 394はI、IIおよびIIIグループのそれぞれの菌株に対して同程度の殺菌力を示したが、CPFVおよびLVFXではIグループの菌株と比較しIIおよびIIIグループの菌株に対する殺菌力が低下していた。この結果は、緑膿菌に対するキノロン系薬の殺菌力にはMICに関与する因子とは異なった因子が関与し、NM 394とCPFVおよびLVFXとではそれに対する作用が異なる可能性を示唆している。この点についてはさらに詳細な検討が必要である。

緑膿菌のキノロン耐性機序として、標的分子の変異のほかに、薬剤排出機構の関与が知られている<sup>26-28)</sup>。本研究で分類した各グループ内にも、被験キノロン系薬に対する感受性が大きく異なる株が存在した。これら感受性の違いには、DNA gyraseおよびtopoisomerase IVのQRDR以外の領域の変異および薬剤の取り込み・排出機構の変化が関与している可能性も考えられる。

以上、緑膿菌のQRDRの変異株に対するNM 394のMICの上昇は他のキノロン系薬と同様であったが、NM 394の短時間殺菌力はQRDRにおける変異の影響を受けにくいことが明らかとなった。

### 文 献

- 1) 二木芳人: ニューキノロン薬。総合臨床 44: 1595~1599, 1995
- 2) 高橋 洋, 庄司 聡, 菊池宏明, 他: 臨床分離黄色ブドウ球菌のニューキノロン薬を含む各種抗菌薬感受性の年次推移。日治療誌 43: 547~549, 1995
- 3) 山口恵三, 大野 章, 櫻谷聡子, 他: 日本国内24施設から分離された臨床分離4993菌株のフルオロキノロン系抗菌薬を中心とした各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn. J. Antibiot. 52: 75~92, 1999
- 4) 後藤 元, 後藤美恵子, 岡 慎一, 他: 本邦19施設における新キノロン剤耐性菌の現況。化学療法の領域 7: 95~101, 1991
- 5) 朝野和典: 多剤耐性緑膿菌感染症。日本臨床別刷領域別症候群シリーズ No.23 感染症症候群 I: 198~201, 1999
- 6) 伊予部志津子: キノロン薬の耐性機構。臨床と微生物 22: 563~568, 1995
- 7) Piddock L J, Hall M C, Bellido F, et al.: A pleiotropic, posttherapy enoxacin-resistant mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1057~1061, 1992
- 8) Masuda N, Gotoh N, Ohya S, et al.: Quantitative correlation between susceptibility and OprJ

- production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 909~913, 1996
- 9) Drlica K, Zhao X: DNA gyrase, topoisomerase IV, and 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 377~392, 1997
  - 10) Gellert M, Mizuguchi K, O'Dea M H, et al.: DNA gyrase: an enzyme that introduces super helical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 3872~3876, 1976
  - 11) Reece R J, Maxwell A: DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 335~375, 1991
  - 12) Wang J C: DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 635~692, 1996
  - 13) Ferrero L, Cameron B, Manse B, et al.: Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: A primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* 13: 641~653, 1994
  - 14) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al.: Quinolone resistance-determining region in DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1271~1272, 1990
  - 15) Jahal S, Wrethlind B: Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 4: 257~261, 1998
  - 16) Yoshida T, Mitsuhashi S: Antibacterial activity of NM 394, the active form of prodrug NM 441, new quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 794~800, 1993
  - 17) 井上松久, 久我明男, 海江田哲, 他: キノロン系経口抗菌薬プルリフロキサシンの *in vitro* 抗菌力および臨床的ブレイクポイントにおける感性率の比較検討。 *Jpn. J. Antibiot.* 53: 593~608, 2000
  - 18) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
  - 19) Mouneimne H, Robert J, Jarlier V, et al.: Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 62~66, 1999
  - 20) Takenouchi T, Sakagawa E, Sugawara M: Detection of *gyrA* mutation among 335 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Japan and their susceptibilities to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 406~409, 1999
  - 21) Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, et al.: Type II topoisomerase mutation in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2263~2268, 2001
  - 22) 谷真理子, 前橋一紀, 荒明美奈子, 他: Prulifloxacin の活性本体 NM 394 の緑膿菌由来 II 型 Topoisomerase に対する阻害活性。 *Jpn. J. Antibiot.* 55: 882~885, 2002
  - 23) Nakano M, Deguchi T, Kawamura M, et al.: Mutation in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2269~2291, 1997
  - 24) Jalal S, Wrethlind B: Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 4: 257~261, 1998
  - 25) Heisig P, Schedletzky H, Falkenstein-Paul H: Mutation in the *gyrA* gene of a high fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 696~701, 1993
  - 26) Fukuda H, Hosaka M, Iyobe S, et al.: *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 790~792, 1995
  - 27) Jahal S, Ciofu O, Hoiby N, et al.: Molecular mechanism of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 710~712, 2000
  - 28) Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, et al.: Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2540~2543, 1997

Antimicrobial activity of NM 394, an active form of prulifloxacin, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with a type II topoisomerase mutation

Minako Araake<sup>1)</sup>, Mariko Tani<sup>1)</sup>, Kazunori Maebashi<sup>1)</sup>, Tetsuro Hara<sup>1)</sup>,  
Hiroomi Watabe<sup>1)</sup>, Hiroshi Takahashi<sup>2)</sup>, Yutaka Tokue<sup>2)</sup>, Shigeru Fujimura<sup>2)</sup>  
Kazunori Gomi<sup>2)</sup> and Akira Watanabe<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., 760 Morooka-cho,  
Kouhoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

<sup>2)</sup>Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development,  
Aging and Cancer, Tohoku University

We examined mutations in the quinolone-resistance-determining regions (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes in 77 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and compared the susceptibility of these isolates to NM 394, an active form of the prodrug prulifloxacin, with those to ciprofloxacin (CPFX), levofloxacin (LVFX), and gatifloxacin (GFLX). Of the 77 strains, 24 isolates exhibited an amino acid replacement in the GyrA or both the GyrA and ParC regions as a result of mutations in *gyrA* or both *gyrA* and *parC*, respectively. All of the 24 isolates had amino acid replacements in GyrA; none of the strains had amino acid replacements restricted to ParC. Amino acid replacement in GyrA but not in ParC was found in 6 isolates whose susceptibility to NM 394 was decreased; the susceptibilities of these 6 isolates to CPFX, LVFX and GFLX were also decreased. Amino acid replacement in GyrA and ParC was found in 18 isolates that were highly resistant to NM 394, LVFX, CPFX and GFLX. The short-term bactericidal activity of NM 394 at the MIC concentration against strains with or without amino acid replacement in GyrA or both GyrA and ParC was similar. The short-term bactericidal activities of CPFX and LVFX against strains with amino acid replacements in GyrA or both GyrA and ParC were lower than those against the strains with no amino acid replacements. These results demonstrate that the bactericidal activity of NM 394 against strains with a mutation in their type II topoisomerase genes was higher than those of CPFX and LVFX.