

【原著・基礎】

Tosufloxacin の小児由来臨床分離 *Mycoplasma pneumoniae* に対する
in vitro および *in vivo* 抗菌活性帰山 誠¹⁾・大西 由美²⁾・古家 由理²⁾・工藤 奈都¹⁾・交久瀬善隆¹⁾¹⁾ 富山化学工業株式会社*²⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所

(平成 29 年 1 月 19 日受付・平成 29 年 3 月 29 日受理)

キノロン系薬である tosufloxacin (TFLX) の小児由来臨床分離 *Mycoplasma pneumoniae* に対する抗菌活性、殺菌作用、自然耐性菌出現頻度およびマウス肺感染モデルにおける有効性について検討した。

小児由来臨床分離マクロライド感性および耐性 *M. pneumoniae* に対する TFLX の MIC₉₀ は、それぞれ 0.25 μg/mL であった。マクロライド耐性 *M. pneumoniae* に対する TFLX の MIC₉₀ は tetracycline, doxycycline, minocycline, clindamycin, erythromycin, clarithromycin (CAM) および azithromycin (AZM) の MIC₉₀ と比較して、それぞれ 1/2, 1/2, 1/8, 1/512, <1/512, <1/512 および 1/256 であり、測定した薬剤のなかで最も低かった。

殺菌作用の検討では、マクロライド感性および耐性 *M. pneumoniae* に対して、TFLX は 2 MIC 以上で薬剤作用開始時より 3 log CFU/mL 以上の生菌数を減少させ、殺菌性を示した。

TFLX に対するマクロライド感性および耐性 *M. pneumoniae* の自然耐性菌出現頻度は、4 MIC 以上でそれぞれ <1.5 × 10⁻¹⁰ および <9.3 × 10⁻¹⁰ であった。CAM および AZM に対する自然耐性菌出現頻度は 7.6 × 10⁻¹⁰ ~ 7.8 × 10⁻⁹ と低かったが、試験したすべての濃度で耐性菌が出現した。

マクロライド耐性株を用いたマウス肺感染モデルにおいて、TFLX 投与群は CAM および AZM 投与群に比べて有意に BALF 中生菌数を減少させた (P < 0.001)。

以上、TFLX は *M. pneumoniae* に対し、強い抗菌活性および殺菌性、低い耐性菌出現頻度を示し、マクロライド耐性株を用いたマウス肺感染モデルにおいて治療効果を示した。

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, tosufloxacin, antimicrobial activity

Mycoplasma pneumoniae は市中肺炎における主要な病原微生物の一つであり、患者の 8 割以上を小児が占め、9 歳以下が全体の 6 割以上を占めている¹⁾。本邦において 2011 年から 2012 年に大流行がみられたのは記憶に新しい²⁾。

小児のマイコプラズマ肺炎に対しては、マクロライド系薬が第一選択薬として広く使用されている³⁾。しかし、2011 年から 2012 年のマイコプラズマ肺炎の流行時には、マクロライド耐性 *M. pneumoniae* が 2011 年で 63%、2012 年で 82% と高率に検出されており、臨床上的の問題となった⁴⁾。2012 年以降はマクロライド耐性 *M. pneumoniae* の割合は徐々に低下しており、2015 年では 42~71% と報告されている³⁾。マクロライド耐性 *M. pneumoniae* の感染が考えられる場合には、minocycline (MINO) が推奨されているが、8 歳未満の患児には歯牙着色やエナメル質形成不全等の副作用があるため原則禁忌となっている³⁾。

キノロン系薬 tosufloxacin (TFLX) は呼吸器感染症の原因

菌に高い有効性を示すこと、他のキノロン系薬より関節毒性が弱い⁵⁾ことから、本邦において小児用キノロン系経口抗菌薬として承認されている。TFLX は *M. pneumoniae* に対して良好な抗菌活性を示し^{6,7)}、臨床においても高い有効性を示す⁸⁾ことから、小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2017 において、マクロライド耐性 *M. pneumoniae* の感染が考えられる場合に使用が推奨されている。

マクロライド感性 *M. pneumoniae* の *in vitro* および *in vivo* 試験は多数報告されているが、日本だけでなく、中国および韓国でもマクロライド耐性株の分離頻度が 50% を超える報告⁹⁾があるにもかかわらず、マクロライド耐性株において薬剤感受性試験以外の試験成績はほとんど報告がない。

今回、マクロライド感性および耐性 *M. pneumoniae* を用い、TFLX の *in vitro* および *in vivo* の有効性を tetracycline (TC), doxycycline (DOXY), MINO, clindamycin (CLDM), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM) および azithro-

mycin (AZM) とともに検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

使用薬剤は、TFLX (富山化学工業株式会社合成品), TC (Sigma-Aldrich Co. LLC.), DOXY (Sigma-Aldrich Co. LLC.), MINO (ファイザー株式会社), CLDM (Sigma-Aldrich Co. LLC.), EM (アボットジャパン株式会社), CAM (LKT Laboratories, Inc.) および AZM (LKT Laboratories, Inc.) を用いた。いずれの薬剤も純度および含量の明らかなものを使用し、濃度は活性本体の値として表示した。

2. 使用菌株

抗菌活性の測定には、富山化学工業総合研究所保存の2012年~2014年に小児鼻咽頭から分離され、かつマクロライド耐性への関与が知られている23S rRNA 遺伝子のドメインV領域の遺伝子変異が明らかな *M. pneumoniae* 67株 (変異を有さない株: 28株, A2063G 変異株: 30株, A2064G 変異株: 5株, A2063T 変異株: 3株, C2617G 変異株: 1株) を用いた。殺菌作用、自然耐性菌出現頻度およびマウス肺感染モデルにおける各薬剤の評価には、マクロライド感性株として *M. pneumoniae* FH を、耐性株として23S rRNA ドメインV領域にA2063G 変異を有する *M. pneumoniae* M-270 を用いた。

3. 抗菌活性測定

M. pneumoniae に対する各薬剤の抗菌活性を微量液体希釈法¹⁰⁾(フェノールレッド法)にて測定した。培地はPleuropneumonia-like organism 液体培地 (PPLOB) を用い、接種菌量は約 2.5×10^4 CFU/well とした。37°Cにて培養し、発育コントロールの培地が黄変してから3日後に目視にて判定を行い、培地の色が陰性コントロールと同程度に赤色を示すウェルの最小薬剤濃度をMICとした。マクロライド耐性の判定は成田の報告¹¹⁾を参考にCAMのMICが $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を耐性とした。

4. マクロライド耐性遺伝子の解析

23S rRNA 遺伝子のドメインV領域の塩基配列を以下の方法で解析した。23S rRNA 遺伝子のドメインV領域を、プライマー MpnMR2063F (5'-ATCTCTTGAC TGTCTCGGC-3') および MpnMR2617R (5'-TACAAC TGGAGCATAAGAGGTG-3')¹²⁾を用い、PCRにて増幅後、シーケンスを行った。シーケンスプライマーはMN23SDVR2 (5'-TGTCTCACAGTCAAGCAC-3') および MpnMR2617R を用いた。塩基配列の解析は *M. pneumoniae* M129株の配列 (GenBank accession no. X68422) を基に、A2063, A2064, A2067 および C2617 の変異を確認した。

5. 殺菌作用

TFLX, DOXY, MINO, CAM および AZM のMICを微量液体希釈法で測定した。-80°Cで保存された *M. pneumoniae* の菌液を融解し、*M. pneumoniae* FH を $5.4 \times$

10^5 CFU/mL に、*M. pneumoniae* M-270 を 1.8×10^5 CFU/mL に PPLOB で調製し、1/2, 1, 2 および 4 MIC の各薬剤を作用させ、37°Cで培養した。FH株は24, 48, 72 および 96時間後、M-270株は24, 48, 72, 96, 120 および 144時間後にサンプリングを実施した。サンプリングした菌液を適宜希釈し、Pleuropneumonia-like organism 寒天培地 (PPLOA) 上にて37°Cで培養後、生育したコロニーを計数し、生菌数を算出した。また、薬剤作用開始時の生菌数から $3 \log$ CFU/mL 以上の減少がみられた場合を殺菌作用ありと判定した¹³⁾。

6. 自然耐性菌出現頻度

CLSI のヒトマイコプラズマに対する抗菌薬感受性試験法のガイドライン¹⁴⁾を参考に、PPLOA を用い寒天平板希釈法にてMICを測定した。

自然耐性菌出現頻度は、-80°Cで保存された *M. pneumoniae* を、PPLOBにて培地の色調が黄色に変化するまで37°Cで増菌培養し、培地交換後、同条件で再度増菌培養を行い、遠心 (8,000 rpm, 4°C, 20分間)にて菌液を約 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL に濃縮した。この菌液 0.2 mL を 4, 8 および 16 MIC の TFLX, DOXY, MINO, CAM および AZM を含む各 PPLOA 平板2枚に塗布し、37°C, 5% CO₂ 条件下でFH株は7日間、M-270株は10日間培養した。培養後に出現したコロニーを計数し、塗布菌数で除して自然耐性菌出現頻度を算出した。試験は3回実施し、その範囲を試験結果とした。

7. マクロライド耐性 *M. pneumoniae* のマウス肺感染モデルおよび投与量設計

Hardy らの報告¹⁵⁾を参考に、BALB/cAnNCrI CrIj 系, SPF, 雌, 8週齢のマウス (日本チャールスリバー) を1群14例で用い、富山化学工業株式会社「実験動物使用・管理規定」に従って試験を実施した。-80°Cで保存されたM-270株の菌液を融解し、その $50 \mu\text{L}$ (約 5×10^7 CFU/mouse) をケタラール (第一三共プロフェーマ)-セラクター (バイエル薬品) 混液麻酔下のマウスに経鼻接種し、感染を惹起した。

マウスでの薬物投与量はヒト小児における体内動態に該当する投与量から算出した。TFLXの投与量は、小児に本剤を $12 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 投与した時の $f\text{AUC}_{0-24}$ ($9.49 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$) に相当する $80 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ とした¹⁶⁻¹⁸⁾。また、いずれの対照薬についても、 $80 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ を投与した時のマウス $f\text{AUC}$ は、小児臨床投与量の $f\text{AUC}$ と同程度あるいはそれを上回る値と考えられたため¹⁹⁻²⁸⁾、今回、有効性を比較する用量として $80 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ を設定した。

感染2時間後より $80 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ の TFLX, CAM, MINO を1日2回, AZM は1日1回を5日間、コントロール群は0.5%メチルセルロース400 (和光純薬工業) を1日2回5日間経口投与した。最終投与の翌日にマウスをセボフルラン麻酔下で放血死させた後、気管支

Table 1. *In vitro* antibacterial activity of tosufloxacin and the other drugs against clinical isolates of macrolide-susceptible and -resistant *M. pneumoniae* in 2012 to 2014

Organism (Number of strains)	Drug	MIC ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Macrolide-susceptible ^{b)} <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (29)	TFLX	0.0625–0.5	0.25	0.25
	TC	0.25–0.5	0.5	0.5
	DOXY	0.0625–0.5	0.25	0.5
	MINO	0.25–2	1	2
	CLDM	0.25–1	1	1
	EM	0.001–1	0.0039	0.0039
	CAM	0.0005–0.25	0.002	0.002
	AZM	0.0000625–0.0078	0.00025	0.00025
Macrolide-resistant ^{c)} <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (38)	TFLX	0.125–0.5	0.25	0.25
	TC	0.25–0.5	0.5	0.5
	DOXY	0.125–0.5	0.25	0.5
	MINO	0.5–4	1	2
	CLDM	8–128	64	128
	EM	64–>128	>128	>128
	CAM	16–>128	>128	>128
	AZM	0.5–128	32	64

^{a)} Measured by a broth-dilution method

^{b)} CAM MIC, <8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

^{c)} CAM MIC, $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$

肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : BALF) を採取した。採取した BALF を適宜希釈し, 37°C で 14 日間, PPLOA 上で培養後, 生育したコロニーを計数して生菌数 (\log_{10} CFU/mL, 以下 \log CFU/mL) を算出した。各群の BALF 中生菌数を平均値 \pm 標準偏差で表し, パラメトリック Dunnett 型多重比較で群間の比較を行った。ソフトウエアは SAS 9.2 (SAS インスティテュートジャパン) および Stat Preclinica 1.2 (タクミインフォメーションテクノロジー) を使用した。

II. 結 果

1. 抗菌活性

測定した 67 株のうち, マクロライド感性株は 29 株であり, マクロライド耐性株は 38 株であった。マクロライド感性 *M. pneumoniae* 29 株に対する各薬剤の MIC₉₀ は, TFLX で 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TC および DOXY で 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MINO で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CLDM で 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EM で 0.0039 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAM で 0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AZM で 0.00025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

マクロライド耐性 *M. pneumoniae* 38 株に対する各薬剤の MIC₉₀ は, TFLX で 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TC および DOXY で 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MINO で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CLDM で 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EM および CAM で >128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AZM で 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Table 1)。

マクロライド耐性株に対する CLDM, EM, CAM および AZM の MIC₅₀ および MIC₉₀ は, マクロライド感性株に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ と比較して著しく高かった。

23S rRNA 遺伝子のドメイン V 領域に A2063G,

A2064G もしくは A2063T のいずれかの変異を有する株は, マクロライド耐性であった (Table 2)。A2063G 変異を有する 30 株に対する TFLX の MIC₉₀ は 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, TC および DOXY で 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MINO で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CLDM で 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EM および CAM で >128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AZM で 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。A2064G に変異を有する 5 株に対する TFLX の MIC range は 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, TC および DOXY で 0.25~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MINO で 0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CLDM および AZM で 8~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EM で 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAM で 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また, A2063T に変異を有する 3 株に対する TFLX および DOXY の MIC range は 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, TC で 0.25~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MINO で 1~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CLDM で 32~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EM で 64~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAM で 16~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AZM で 0.5~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。C2617G に変異を有する株は, マクロライド感性であった。

2. 殺菌作用

M. pneumoniae FH に対する TFLX, DOXY, MINO, CAM および AZM の MIC はそれぞれ 0.5, 0.25, 2, 0.0005 および 0.0039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。*M. pneumoniae* FH に対し, TFLX は 2 MIC 作用で薬剤作用開始時から 96 時間後に 3.35 \log CFU/mL, 4 MIC 作用で 72 時間後に 3.53 \log CFU/mL の生菌数を減少させた (Fig. 1)。TFLX, MINO および AZM は殺菌作用を示したが, DOXY および CAM は, 今回の試験条件下では殺菌作用を示さなかった。

M. pneumoniae M-270 に対する TFLX, DOXY, MINO および AZM の MIC はそれぞれ 0.25, 0.25, 1 および 32

Table 2. *In vitro* antibacterial activity of tosufloxacin and the other drugs against 23S rRNA mutants of *M. pneumoniae*

Drug	MIC ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	A2063G (n = 30)			A2064G (n = 5)	A2063T (n = 3)	C2617G (n = 1)
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC range	MIC
TFLX	0.125–0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
TC	0.25–0.5	0.5	0.5	0.25–0.5	0.25–0.5	0.5
DOXY	0.125–0.5	0.25	0.5	0.25–0.5	0.25	0.25
MINO	0.5–2	1	2	0.5–2	1–4	1
CLDM	32–128	64	128	8–16	32–128	0.5
EM	64–>128	>128	>128	128	64–128	1
CAM	32–>128	>128	>128	16	16–64	0.25
AZM	8–128	32	64	8–16	0.5–1	0.0078

^{a)} Measured by a broth-dilution method

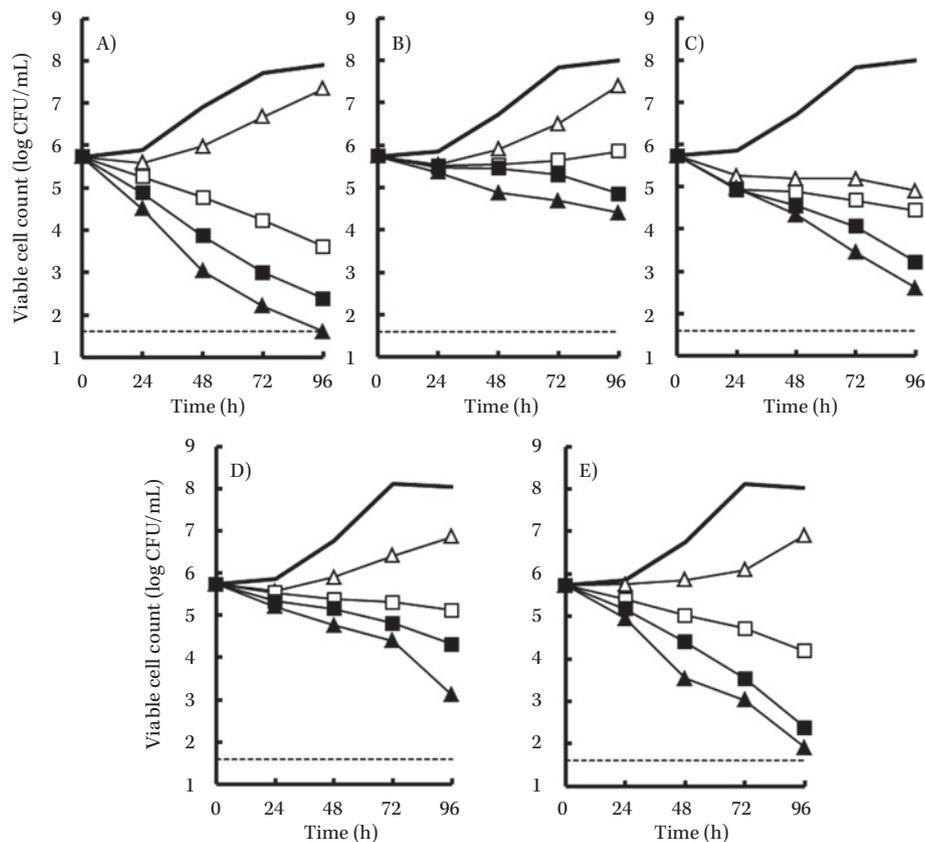


Fig. 1. Bactericidal activity of tosufloxacin and the other drugs against *M. pneumoniae* FH in a time-kill assay.

The drugs: A), TFLX (MIC: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B), DOXY (MIC: 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C), MINO (MIC: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$); D), CAM (MIC: 0.0039 $\mu\text{g}/\text{mL}$); E), AZM (MIC: 0.0005 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Symbols: —, growth control; \triangle , 1/2 MIC; \square , 1 MIC; \blacksquare , 2 MIC; \blacktriangle , 4 MIC

The dotted lines indicate the lower limit of quantification (1.6 log CFU/mL).

$\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。*M. pneumoniae* M-270 に対し、TFLX は 2 MIC 作用で薬剤作用開始時から 144 時間後に 3.36 log CFU/mL、4 MIC 作用で 96 時間後に 3.66 log CFU/mL の生菌数を減少させた (Fig. 2)。TFLX は殺菌作用を示したが、DOXY、MINO および AZM は、今回の試験条件下では殺菌作用を示さなかった。

3. 自然耐性菌出現頻度

M. pneumoniae FH に対する TFLX、DOXY、MINO、CAM および AZM の MIC はそれぞれ 0.5、0.25、0.5、0.0078 および 0.0078 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。TFLX および MINO に対する自然耐性菌出現頻度は、4、8 および 16 MIC 作用時でいずれも $<1.5 \times 10^{-10}$ であった。DOXY に

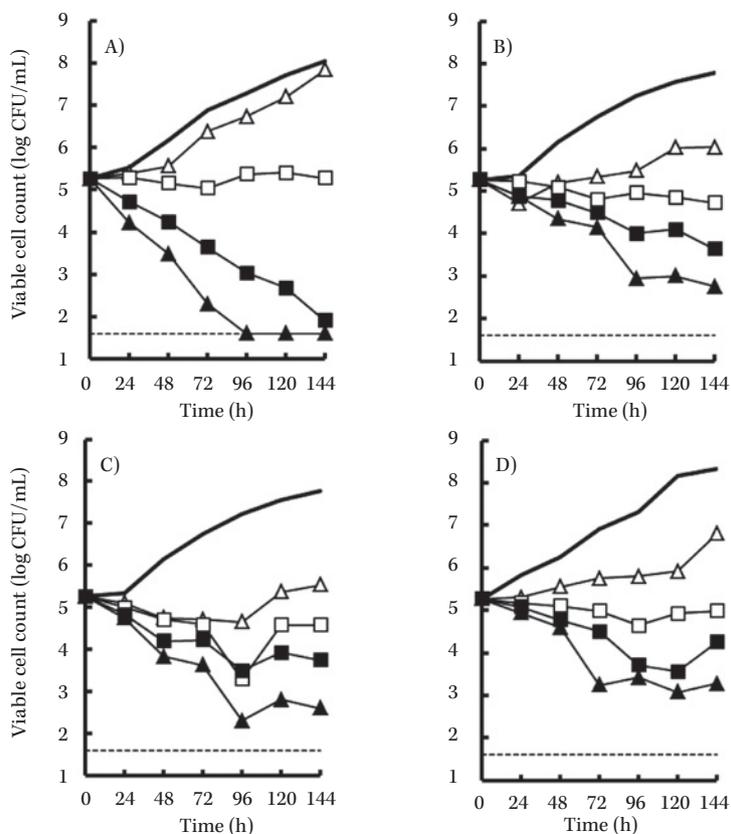


Fig. 2. Bactericidal activity of tosylloxacin and the other drugs against macrolide-resistant *M. pneumoniae* M-270 in a time-kill assay. The drugs: A), TFLX (MIC: 0.25 µg/mL); B), DOXY (MIC: 0.25 µg/mL); C), MINO (MIC: 1 µg/mL); D), AZM (MIC: 32 µg/mL). Symbols: —, growth control; △, 1/2 × MIC; □, 1 × MIC; ■, 2 × MIC; ▲, 4 × MIC. The dotted lines indicate the lower limit of quantification (1.6 log CFU/mL).

に対する自然耐性菌出現頻度は、4 および 8 MIC 作用時において $<1.5 \times 10^{-10}$ 、16 MIC 作用時において $\leq 2.5 \times 10^{-10}$ であった。CAM に対する自然耐性菌出現頻度は、4、8 および 16 MIC 作用時、 $1.2 \times 10^{-9} \sim 7.8 \times 10^{-9}$ 、AZM に対しては、 $7.6 \times 10^{-10} \sim 5.9 \times 10^{-9}$ であった。マクロライド系薬では低頻度ではあるが、作用濃度にかかわらず耐性菌が出現した (Table 3)。

M. pneumoniae M-270 に対する TFLX, DOXY, MINO, CAM および AZM の MIC はそれぞれ 0.5, 0.25, 0.5, >128 および $128 \mu\text{g/mL}$ であった。TFLX, DOXY および MINO に対する自然耐性菌出現頻度は、4、8 および 16 MIC 作用時、いずれも $<9.3 \times 10^{-10}$ であった (Table 4)。なお、*M. pneumoniae* M-270 に対する CAM および AZM の MIC は高値であり、試験実施のための溶液作製が困難であることから、この菌株を用いた両薬剤の自然耐性菌出現頻度の測定は実施しなかった。

4. マクロライド耐性 *M. pneumoniae* マウス肺感染モデルに対する治療効果

TFLX, MINO, CAM および AZM 投与群の BALF 中生菌数は、それぞれ 2.52 ± 0.634 , 2.88 ± 0.948 , 5.11 ± 0.359 および 4.86 ± 0.527 log CFU/mL であった。また、コントロール群の BALF 中生菌数は 5.04 ± 0.407 log CFU/mL であった。TFLX 投与群は CAM 投与群, AZM 投与群およびコントロール群に比べ有意に BALF 中生菌数を減少させた ($P < 0.001$)。また、MINO 投与群とは差がなかった (Fig. 3)。

III. 考 察

本研究では、小児肺炎の主要な原因菌である *M. pneumoniae* に対する TFLX の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性について検討した。

マクロライド耐性株を含む小児由来臨床分離株に対する抗菌活性では、TFLX の MIC range は $0.0625 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$ であり、2005 年分離株を測定した既報^{6,7)}と差はなかった。マクロライド耐性株に関しては明確な定義が

Table 3. Frequency of spontaneous mutants resistant to tosufloxacin and the other drugs in *M. pneumoniae* FH

Organism	Drug	MIC ^{a)} ($\mu\text{g/mL}$)	Spontaneous mutation frequency		
			4 MIC	8 MIC	16 MIC
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH	TFLX	0.5	$<1.5 \times 10^{-10}$	$<1.5 \times 10^{-10}$	$<1.5 \times 10^{-10}$
	DOXY	0.25	$<1.5 \times 10^{-10}$	$<1.5 \times 10^{-10}$	$\leq 2.5 \times 10^{-10}$
	MINO	0.5	$<1.5 \times 10^{-10}$	$<1.5 \times 10^{-10}$	$<1.5 \times 10^{-10}$
	CAM	0.0078	1.8×10^{-9} – 4.1×10^{-9}	2.1×10^{-9} – 7.8×10^{-9}	1.2×10^{-9} – 4.0×10^{-9}
	AZM	0.0078	1.4×10^{-9} – 5.9×10^{-9}	7.6×10^{-10} – 2.5×10^{-9}	9.1×10^{-10} – 3.3×10^{-9}

a) Measured by the agar-dilution method

Table 4. Frequency of spontaneous mutants resistant to tosufloxacin and the other drugs in macrolide-resistant *M. pneumoniae* M-270

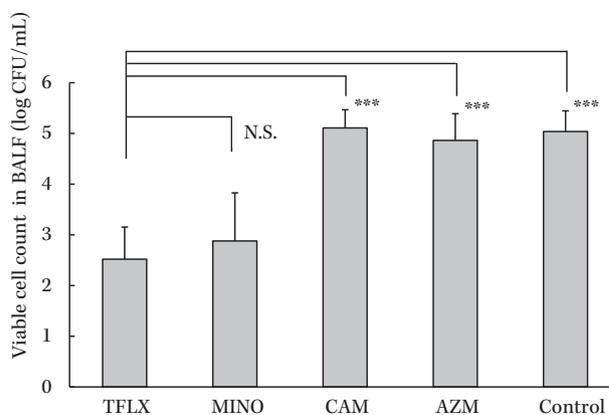
Organism	Drug	MIC ^{a)} ($\mu\text{g/mL}$)	Spontaneous mutation frequency		
			4 MIC	8 MIC	16 MIC
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TFLX	0.5	$<9.3 \times 10^{-10}$	$<9.3 \times 10^{-10}$	$<9.3 \times 10^{-10}$
	DOXY	0.25	$<9.3 \times 10^{-10}$	$<9.3 \times 10^{-10}$	$<9.3 \times 10^{-10}$
	MINO	0.5	$<9.3 \times 10^{-10}$	$<9.3 \times 10^{-10}$	$<9.3 \times 10^{-10}$
M-270	CAM	>128	— ^{b)}	— ^{b)}	— ^{b)}
	AZM	128	— ^{b)}	— ^{b)}	— ^{b)}

a) Measured by the agar-dilution method

b) Not tested

ないことから、本研究では成田の報告¹⁾を基にマクロライド耐性株をCAMのMICが $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ の株と定義した。23S rRNA 遺伝子のドメイン V 領域に A2063G もしくは A2064G 変異を有する株に対するCAMもしくはAZMのMICはいずれも $8 \mu\text{g/mL}$ 以上であったが、A2063T 変異株におけるCAMおよびAZMのMIC rangeはそれぞれ $16 \sim 64 \mu\text{g/mL}$ および $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ であることから、変異塩基の差異により、CAM耐性かつAZM感性和判定される株が存在した。このような変異株の存在がマクロライド耐性株について定義されていない理由の一つなのかもしれない。また、TFLXはこれらマクロライドの感性、耐性にかかわらず *M. pneumoniae* に対して強い抗菌活性を示した。

殺菌作用の検討では、TFLXはマクロライド感性および耐性 *M. pneumoniae* に対して2MIC以上で殺菌的に作用し、4MIC以上で検出限界以下まで生菌数を低下させ、キノロン系薬の特長である強い殺菌性が認められた。マクロライド感性 *M. pneumoniae* のTFLXに対する自然耐性菌出現頻度は、すべての試験濃度(4, 8および16MIC)で $<1.5 \times 10^{-10}$ であり、検出限界未満であった。マクロライド感性 *M. pneumoniae* のCAMおよびAZMに対する自然耐性菌出現頻度は 7.8×10^{-9} 以下であったが、すべての試験濃度で耐性菌が検出された。TFLXにおいてはキノロン系薬の特長である強い殺菌性が自然耐性菌出現頻度に反映したと考えられた。今回の試験結果も含め、現時点で臨床検体からのキノロン耐性 *M. pneumoniae* の分離報告はないが、*in vitro*でLVFXに対する感受性が低下した株が得られている²⁹⁾。今後、臨床でもキノロ

Fig. 3. The therapeutic efficacy of tosufloxacin in a murine pulmonary infection model caused by macrolide-resistant *M. pneumoniae* M-270.

Data are represented as mean \pm standard deviations (error bars). All drugs were orally dosed at 80 mg/kg/day for 5 days beginning at 2 hours post-infection. The viable bacterial count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measured on 5 days post infection.

***: $P < 0.001$ vs. TFLX by Dunnett's multiple comparison test, N.S.: not significant

MIC ($\mu\text{g/mL}$) against M-270: TFLX, 0.25; MINO, 1; CAM, > 128; AZM, 32

The lower limit of detection was 1.6 (log CFU/mL).

ン系薬に対する感受性が低下した株が分離される可能性もあり、継続的にキノロン系薬の感受性動向を把握していく必要があると考えられた。

今回、23S rRNA ドメイン V 領域の A2063G 変異を有する株をマウス肺感染モデル試験に用いた。この変異の

株は、臨床分離マクロライド耐性 *M. pneumoniae* のなかの 90% 以上を占める株⁹⁾であり、マウス肺感染モデルにおいて、CAM および AZM は治療効果を示さなかった。一方、TFLX の治療効果は、本剤 12 mg/kg/day を小児に経口投与した血中 fAUC₀₋₂₄ に相当するマウスの投与量 (80 mg/kg/day) において、同用量を投与した CAM および AZM に比べ強く、MINO と差がなかった。今回の試験結果は、マクロライド耐性株に対する各種抗菌薬の治療効果を評価するうえで有用と考えられた。

以上、TFLX はマクロライドの感性、耐性にかかわらず *M. pneumoniae* に対して強い抗菌活性、殺菌性および低い自然耐性菌出現頻度を示した。また、TFLX はマクロライド耐性 *M. pneumoniae* の肺感染モデルにおいて高い治療効果を示した。

利益相反自己申告：著者である 山 誠、大西由美、古家由理、工藤奈都、交久瀬善隆は富山化学工業株式会社の社員である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：注目すべき感染症マイコプラズマ肺炎。IDWR 2012 年第 39 号
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/mycoplasma-pneumonia-m/mycoplasma-pneumonia-idwrc.html>
- 2) Yamazaki T, Kenri T: Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan and therapeutic strategies for macrolide-resistant *M. pneumoniae*. *Front Microbiol* 2016; 23: 693
- 3) The Committee of Japanese Society of Mycoplasmaology: Guiding principles for treating *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia
<http://square.umin.ac.jp/jsm/Eng%20shisin.pdf>
- 4) Kawai Y, Miyashita N, Kudo M, Akaike H, Kato A, Nishizawa Y, et al: Nationwide surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4046-9
- 5) 古坊真一, 福田 均, 小崎 司, 阿久根淳, 三善隆弘: Tosufloxacin tosilate hydrate の幼若動物における毒性試験およびクラスエフェクトに関する検討。日治療会誌 2010; 58(S-2): 12-23
- 6) 神田裕子, 黒坂勇一, 藤川香津子, 千葉めぐみ, 山近伸一郎, 奥村 亮, 他: Sitafloxacin の細菌学的評価。日治療会誌 2008; 56(S-1): 1-17
- 7) 高畑正裕, 福田淑子, 二口直子, 杉浦陽子, 久田晴美, 水永真吾, 他: Garenoxacin の *in vitro* 抗菌活性。日治療会誌 2007; 55(S-1): 1-20
- 8) 砂川慶介: 小児のマイコプラズマ肺炎に対する tosufloxacin の臨床投与と成績。Jpn J Antibiot 2012; 65: 173-9
- 9) Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, et al: Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications. *Front Microbiol* 2014; 5: 410
- 10) 山本孝志: マイコプラズマ実験法。尾形 学 監修, マイコプラズマとその実験法, 近代出版, 東京, 1988; 331-457
- 11) 成田光生: マイコプラズマにおけるブレイクポイントの考え方。日マイコプラズマ会誌 2008; 35: 59-60
- 12) Chalker V, Stocki T, Mentasti M, Fleming D, Harrison T: Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in England and Wales in 2010: multilocus variable number tandem repeat analysis typing and macrolide susceptibility. *Euro Surveill* 2011; 16: pii: 19865
- 13) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline. M26-A; 19 (18). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 1999
- 14) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; Approved guideline. M43-A; 31 (19). Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, 2011
- 15) Hardy R D, Jafri H S, Olsen K, Wordemann M, Hatfield J, Rogers B B, et al: Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia model: a microbiologic, histologic, immunologic, and respiratory plethysmographic profile. *Infect Immun* 2001; 69: 3869-76
- 16) 砂川慶介, 岩井直一, 岩田 敏, 尾内一信, 坂田 宏, 鈴木賢二, 他: 母集団薬物動態-薬力学的解析に基づく tosufloxacin 小児用細粒の臨床推奨用量。日治療会誌 2010; 58(S-2): 69-77
- 17) 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 北山理恵子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 1988; 36(S-9): 143-8
- 18) 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 熊野克彦, 高木伸一, 恒田礼子, 他: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の各種動物における吸収・分布・代謝および排泄。Chemotherapy 1988; 36(S-9): 149-57
- 19) Tessier P R, Kim M K, Zhou W, Xuan D, Li C, Ye M, et al: Pharmacodynamic assessment of clarithromycin in a murine model of pneumococcal pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1425-34
- 20) 酒田英明, 安達のどか, 辰野欣司, 砂川慶介: 小児感染症患者におけるクラリスロマイシンシロップの薬物動態の検討。日治療会誌 2009; 57: 97-100
- 21) Girard D, Finegan S M, Dunne M W, Lame M E: Enhanced efficacy of single-dose versus multi-dose azithromycin regimens in preclinical infection models. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 365-71
- 22) Shepard R M, Falkner F C: Pharmacokinetics of azithromycin in rats and dogs. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25 (Suppl A): 49-60
- 23) 武藤秀弥, 窪江有夏, 木村泰子, 斉藤 亨, 関口金雄, 榎垣一憲, 他: Azithromycin の動物における体内動態に関する研究。日治療会誌 1995; 43(S-6): 110-21
- 24) Azithromycin 小児科領域研究会: 小児科領域における Azithromycin (細粒剤) の総合評価。Jpn J Antibiot 1995; 48: 1051-73
- 25) Alder J, Hutch T, Meulbroek J A, Clement J C: Treatment of experimental *Toxoplasma gondii* infection by clarithromycin-based combination therapy with minocycline or pyrimethamine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7: 1141-8
- 26) Chaturvedi P, Esposito C, Koroma J, Canon E P,

- Tanaka S K: *In vitro* assessment of plasma protein binding and metabolic stability of PTK 0796, abstr. 2675. 43rd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Poster F-760. ASM, Washington, DC, 2003
- 27) 佐藤吉壮, 楠本 裕, 岩田 敏, 秋田博伸, 横田隆夫, 砂川慶介: 小児科領域における minocycline の体内動態に関する検討. *Chemotherapy* 1992; 40: 1320-6
- 28) Nightingale C H, Ambrose P G, Drusano G L, Murakawa T: *Antimicrobial Pharmacodynamics in theory and clinical practice*, Second ed. Informa Healthcare, New York, 2007
- 29) Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar C M: *In vitro* development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1190-3

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of tosufloxacin against *Mycoplasma pneumoniae* from pediatric patients

Makoto Kaeriyama¹⁾, Yoshimi Oonishi²⁾, Yuri Furuya²⁾,
Nami Kudo¹⁾ and Yoshitaka Katakuse¹⁾

¹⁾ Toyama Chemical Co., Ltd., 3-2-5 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

²⁾ Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.

We evaluated antibacterial activity, bactericidal activity and *in vivo* efficacy of tosufloxacin (TFLX) against *Mycoplasma pneumoniae* isolated from pediatric patients. Frequency of spontaneous mutation to TFLX resistance was also measured.

TFLX showed the lowest minimum inhibitory concentration (MIC)₉₀ against clinical isolates of macrolide-resistant *M. pneumoniae* from pediatric patients. The MIC₉₀ of TFLX against macrolide-resistant *M. pneumoniae* was 0.25 μg/mL, which was 1/2-, 1/2-, 1/8-, <1/512-, <1/512- and 1/256-fold compared with that of tetracycline, doxycycline, minocycline, clindamycin, clarithromycin (CAM) and azithromycin (AZM), respectively.

TFLX at 2 MIC and more decreased the viable count of macrolide-susceptible and -resistant *M. pneumoniae* by over 3 log CFU/mL from the initial inoculum in a time-kill assay. TFLX showed bactericidal activity against *M. pneumoniae* regardless of macrolide susceptibility.

The frequencies of spontaneous mutation to TFLX resistance in macrolide-susceptible and -resistant *M. pneumoniae* were $<1.5 \times 10^{-10}$ at ≥ 4 MIC and $<9.3 \times 10^{-10}$ at ≥ 4 MIC, respectively. The frequencies of spontaneous mutation to CAM and AZM were 7.6×10^{-10} – 7.8×10^{-9} , generating resistant strains at all concentrations.

TFLX significantly reduced the viable bacterial count compared with the CAM and AZM groups ($P < 0.001$) in a murine pulmonary infection model caused by macrolide-resistant *M. pneumoniae*.

In conclusion, TFLX had strong antimicrobial and bactericidal activity. The frequency of spontaneous mutation to TFLX resistance was low. TFLX had stronger efficacy than CAM and AZM in a pulmonary infection model caused by macrolide-resistant *M. pneumoniae*.