

【原著・基礎】

In vitro pharmacokinetic model を用いた *Streptococcus pneumoniae* に対する garenoxacin の殺菌効果および耐性化の検討

古家 由理¹⁾・福田 淑子¹⁾・野村 伸彦¹⁾・石井 良和²⁾

¹⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所*

²⁾ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

(平成 24 年 6 月 27 日受付・平成 24 年 9 月 12 日受理)

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) 400 mg, 1 日 1 回 (q.d.) 経口投与時の *Streptococcus pneumoniae* に対する有効性を評価するため, ヒト血中蛋白非結合体濃度を再現した *in vitro* pharmacokinetic (PK) model を用い, levofloxacin (LVFX) に感受性を示す野生株 2 菌株および *parC* 変異保有株 (Ser-79→Phe) 1 菌株に対する殺菌効果ならびに耐性化の有無について LVFX 500 mg, q.d. 経口投与時と比較検討した。

野生株および *parC* 変異保有株に対する GRNX 400 mg, q.d. 投与時の free AUC/MIC は ≥ 246 で, いずれの株に対しても LVFX 500 mg, q.d. 投与時より大きく, GRNX は強い殺菌効果を示し, 耐性菌の出現を抑制した。

野生株 2 菌株 (*S. pneumoniae* D-5834 株および D-5580 株) に対し, GRNX 投与時の殺菌曲線上面積 (area above the killing curve : AAKC) は, >108 および $>103 \Delta \text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{h/mL}$ で, いずれも強い殺菌効果を示し, 24 時間後に再増殖および感受性の低下したポピュレーションは認められなかった。一方, LVFX 投与時の AAKC は >87.7 および $>114 \Delta \text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{h/mL}$ で, GRNX と同様, 強い殺菌効果を示したが, 24 時間後に再増殖が認められた。

parC 変異保有株 (*S. pneumoniae* D-5787 株) に対し, GRNX および LVFX 投与時の AAKC は >106 および $20.7 \Delta \text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{h/mL}$, 99.9% 殺菌到達時間は 2.24 および 4.74 時間で GRNX は強く速やかな殺菌効果を示した。また, GRNX 投与モデルでは 24 時間後の再増殖および感受性の低下したポピュレーションは認められなかったが, LVFX 投与モデルでは 24 時間後に再増殖が認められ, GyrA に 1 アミノ酸変異 (Ser-81→Phe または Tyr) を有し, 感受性が 1/8 に低下したポピュレーションが検出された。

以上, GRNX は, 早期除菌および耐性菌出現抑制の観点から *S. pneumoniae* を原因菌とする感染症に対して有用な薬剤であることが示唆された。

Key words: garenoxacin, *in vitro*, pharmacokinetic model, *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae は呼吸器および耳鼻咽喉科領域感染症の主要原因菌であり, ペニシリン系, セフェム系およびマクロライド系などの各種抗菌薬に対する耐性菌の分離頻度が高く問題となっている^{1,2)}。キノロン系薬のなかでも, いわゆるレスピラトリーキノロンはこれらの薬剤耐性菌に対し交差耐性を示さず, 良好な抗菌活性を示すことから, 日本呼吸器学会の「成人市中肺炎診療ガイドライン」においても, 多剤耐性菌を含む細菌性肺炎の初期治療薬の選択肢の一つとして推奨されている³⁾。

本邦におけるキノロン中等度耐性および耐性 *S. pneumoniae* の分離頻度は 1.2%¹⁾ と低いものの, 高齢者では耐性株の分離頻度が高い⁴⁾。また, 米国でも耐性株の分離頻度は低い, levofloxacin (LVFX) の MIC が 1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ を示す感

性株のうち, それぞれ 0.35~19% および 7.7~71% でキノロンの標的酵素であるトポイソメラーゼ IV (*parC*) に変異が認められており⁵⁻⁸⁾, このような *parC* 変異保有株を原因菌とした呼吸器感染症において, LVFX の有効性が確認されなかった症例も報告されている⁹⁾。そのため, LVFX に感受性を示す *parC* 変異保有株も含め, キノロンの耐性化動向には注意が必要であるとともに, 治療に際しては, 有効性および耐性化抑制の両観点から適切な抗菌薬選択ならびにその適正使用が重要となる。

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) は, グラム陽性菌ならびにグラム陰性菌, マイコプラズマ, クラミジアおよびレジオネラ属に対して幅広い抗菌スペクトルを有し, 特に薬剤耐性菌を含む *S. pneumoniae* に強い抗菌活性を示す¹⁰⁾ とも

*富山県富山市下奥井 2-4-1

に、薬物動態面では他のキノロン系薬に比べて大きなAUC¹¹⁾および良好な組織移行性^{12,13)}を示す。本薬は、pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD)理論に基づき用法用量を設定し、開発された薬剤であり、細菌性肺炎に対する高い有効性¹⁴⁾および呼吸器感染症に対する早期改善効果^{15,16)}を示す。

今回われわれは、2004年および2008~2009年に本邦で分離されたLVFX感性*S. pneumoniae*におけるキノロン耐性決定領域(quinolone resistance-determining region: QRDR)のアミノ酸変異保有率を調査した。また、GRNX 400 mg, 1日1回(q.d.)経口投与時のヒト血中蛋白非結合体濃度を再現した*in vitro* pharmacokinetic (PK) modelを用い、*S. pneumoniae*の野生株および*parC*変異保有株に対する殺菌効果ならびに耐性菌出現の有無についてLVFX (500 mg, q.d.)とともに検討したので、その成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

薬剤耐性遺伝子解析には、2004年および2008~2009年に本邦で分離され、LVFXのMICが1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の成人由来LVFX感性(LVFX MIC: $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$)¹⁷⁾*S. pneumoniae* 160菌株(2004年分離)および234菌株(2008~2009年分離)を使用した。これらの菌株は既報^{18,19)}にてLVFXのMICを測定しており、2004年分離株に対するLVFXのMICが0.39, 0.78および1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示したのはそれぞれ1, 116および43菌株であった。2008~2009年分離株に対しては、本検討で使用した234菌株のみに限定すると、LVFXのMICが0.78および1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示したのはそれぞれ108および126菌株であった。また、*in vitro* PK modelにおける殺菌効果解析には、薬剤耐性遺伝子解析に用いた2008~2009年分離株のうち、2008年11月~2009年2月に分離された喀痰由来株で、QRDRにアミノ酸変異を有さない野生株2菌株(D-5834株, D-5580株)および1アミノ酸変異を有するD-5787株(ParC: Ser-79→Phe)を使用した。

2. 臨床分離株のQRDRアミノ酸変異の検出

*S. pneumoniae*の*parC*および*gyrA*のQRDRをPCRにて増幅後、制限酵素HinfI, LweIおよびMboIIにて処理し、その切断フラグメント長よりParCのSer-79およびAsp-83, GyrAのSer-81およびGlu-85における変異の有無を確認した^{20,21)}。変異保有株については、*parC*, *parE*, *gyrA*および*gyrB*のQRDRの塩基配列を解析後、GENETYX(株式会社ゼネティックス, ver. 9)にてアミノ酸変異を確認した。

3. *In vitro* PK modelにおける殺菌効果の検討

1) 使用抗菌薬

GRNX (Esteve Quimica, S. A.) および LVFX (Chem-Impex International, Inc.) を使用した。いずれの薬剤も力価が明らかなものを使用し、各抗菌薬の濃度は活性本体の値として表示した。

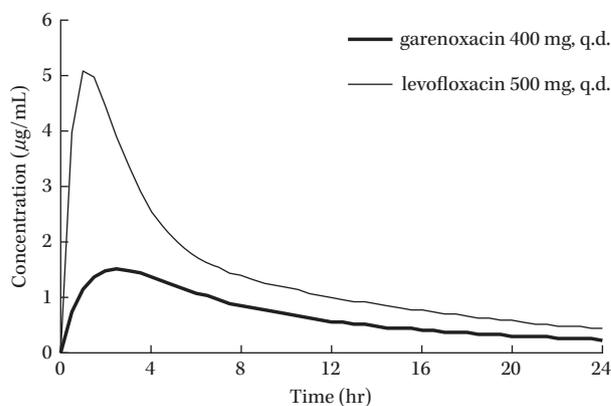


Fig. 1. Time-concentration curves simulating free serum concentration in an *in vitro* pharmacokinetic model.

2) MICの測定

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)の微量液体希釈法²²⁾を一部改変し、薬剤の希釈系列を1.2倍希釈としてMICを測定した。MIC測定は3回行い、その平均値をMICの値として用いた。

3) *In vitro* PK modelにおける殺菌効果

血中濃度推移の再現には、オートシミュレーションシステムPASS-400(大日本精機)を用いた。GRNX 400 mg および LVFX 500 mg の国内臨床第I相試験における単回経口投与時の薬動力学パラメータ^{11,23)}を基に蛋白非結合型血中濃度推移を再現した(Fig. 1)。GRNX および LVFX のヒト血清蛋白結合率は、それぞれ79.8%¹¹⁾および31%²⁴⁾とした。

各菌株を2.5%馬溶血液(日本バイオテスト研究所)添加cation-adjusted Mueller Hinton broth (CAMHB: Becton, Dickinson and Company)にて37°Cで約2時間前培養後、GRNX および LVFX の血中濃度を再現した*in vitro* PK modelにおいて、24時間まで経時的に生菌数を測定した。生菌数の検出限界は1.6 Log₁₀ CFU/mLとした。

殺菌効果の指標として、培養開始時の生菌数を基準としたベースラインと薬剤作用時の殺菌曲線で囲まれた面積である殺菌曲線上面積(area above the killing curve: AAKC)をオートシミュレーション制御ソフト(PASS-402W, Ver. 1.16)にて算出した。また、培養開始時の生菌数から99.9%(3 Log₁₀ CFU/mL)減少に要する99.9%殺菌到達時間(time to achieve 99.9% killing: 99.9%KT)は線形回帰法(Microsoft Office Excel 2003)にて算出した。

4) 耐性化に関する検討

In vitro PK modelにより得られた培養24時間後の各菌液を2.5%馬溶血液添加CAMHBで希釈後、37°Cで振盪培養した。これを適宜希釈し、GRNXまたはLVFX含有5%綿羊脱繊維血液(日本バイオテスト研究所)添

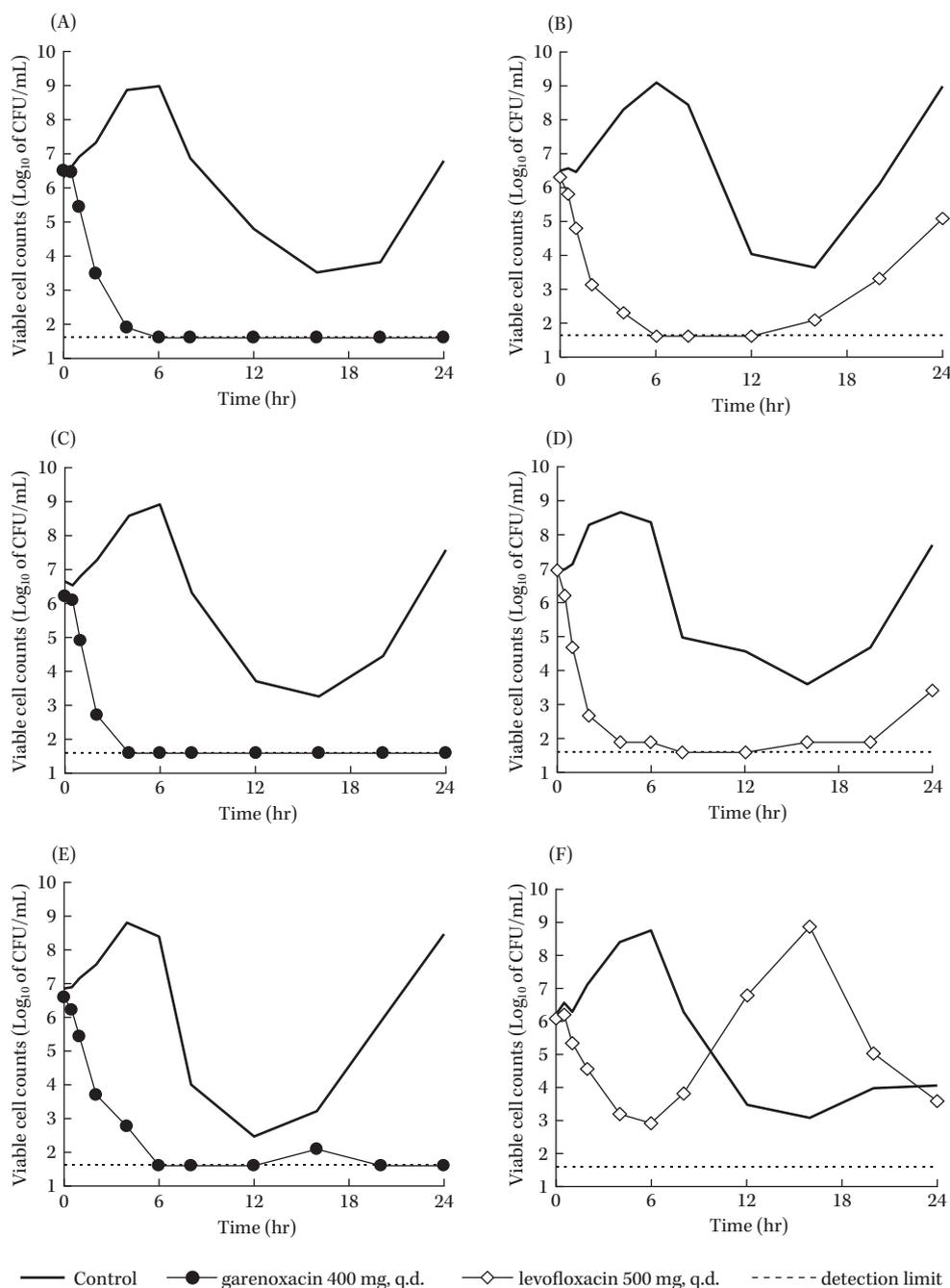


Fig. 2. Bactericidal activities of garenoxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model.

(A) (B): *S. pneumoniae* D-5834, (C) (D): *S. pneumoniae* D-5580, (E) (F): *S. pneumoniae* D-5787

加 Mueller Hinton agar (Becton, Dickinson and Company) 平板に塗布し、37°C で 2 日間培養後のコロニー数を測定した。薬剤添加および非添加時の感受性ポピュレーションを比較し、感受性変化を調べた。感受性の低下したポピュレーションが確認された場合、24 時間後の菌液を塗布した薬剤非含有平板から無作為に 7 コロニーを選択し、薬剤感受性および標的酵素の QRDR の塩基配列を解析した。薬剤感受性測定は日本化学療法学会標準法²⁵⁾ に準じた寒天平板希釈法を用いた。

II. 結 果

1. 臨床分離株の QRDR アミノ酸変異保有率

2004 年分離株(160 菌株)のうち、LVFX の MIC が 0.39 および 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株では変異は認められず、1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す 1 菌株 (1/43 株 : 2.3%) で ParC の Ser-79 \rightarrow Phe 変異が認められた。

2008~2009 年分離株(234 菌株)のうち、LVFX の MIC が 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株では変異が認められなかったが、1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す 7 菌株 (7/126 株 : 5.6%) で ParC の Ser-

Table 1. Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters of garenoxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*

PK-PD parameter	Strain					
	D-5834 (wild type)		D-5580 (wild type)		D-5787 (ParC; Ser-79 → Phe)	
	garenoxacin 400 mg, q.d.	levofloxacin 500 mg, q.d.	garenoxacin 400 mg, q.d.	levofloxacin 500 mg, q.d.	garenoxacin 400 mg, q.d.	levofloxacin 500 mg, q.d.
MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.063	0.89	0.041	0.84	0.067	1.21
fAUC _{0-24h} /MIC	262	39.7	403	42.0	246	29.2
fC _{max} /MIC	23.8	5.75	36.6	6.09	22.4	4.23
AAK _{0-24h} ($\Delta\text{Log}_{10}\text{CFU}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	>108	>87.7	>103	>114	>106	20.7
99.9% KT (hr)	1.98	1.90	1.78	1.36	2.24	4.74

Abbreviations: AAKC, area above the killing curve; 99.9% KT, time to achieve 99.9% killing

79→Phe 変異が認められた。そのうちの1菌株では、ParCのSer-79→Phe変異に加えて、Lys-137→Asn変異およびParEのIle-460→Val変異が認められた。

なお、ParCのAsp-83、GyrAのSer-81およびGlu-85に変異を有している株は認められなかった。

2. *In vitro* PK modelにおける殺菌効果

GRNX 400 mg, q.d. および LVFX 500 mg, q.d. 投与モデルでの *S. pneumoniae* D-5834 株、D-5580 株および D-5787 株 (ParC: Ser-79→Phe) に対する殺菌効果を Fig. 2 に示す。薬剤非添加時 (Control) では、いずれの場合も生菌数は培養開始後 8~9 Log₁₀ CFU/mL まで増加し、その後徐々に減少したが、12 または 16 時間後より再び増殖が認められた。

S. pneumoniae D-5834 株に対して、GRNX 投与モデルでは培養開始 6 時間後に生菌数は検出限界以下となり、その後再増殖は認められなかった。LVFX 投与モデルでは培養開始 6 時間後に生菌数は検出限界以下となったが、その後再増殖が認められ、24 時間後の生菌数は培養開始時に比べて 1.2 Log₁₀ CFU/mL 低かった (Fig. 2A, B)。

S. pneumoniae D-5580 株に対して、GRNX 投与モデルでは培養開始 4 時間後に生菌数は検出限界以下となり、その後再増殖は認められなかった。LVFX 投与モデルでは培養開始 8 時間後に生菌数は検出限界以下となったが、その後再増殖が認められ、24 時間後の生菌数は培養開始時に比べて 3.5 Log₁₀ CFU/mL 低かった (Fig. 2C, D)。

parC 変異保有 *S. pneumoniae* D-5787 株に対して、GRNX 投与モデルでは培養開始 6 時間後に生菌数は検出限界以下となり、16 時間後に 2.0 Log₁₀ CFU/mL 検出されたが、20 時間後には再び検出限界以下となり、その後再増殖は認められなかった。LVFX 投与モデルでは、培養開始 6 時間後に生菌数は 3.2 Log₁₀ CFU/mL 減少したが、8 時間後には再増殖し、12~16 時間後には培養開始時の生菌数を上回り、その後再び生菌数の減少がみられた (Fig. 2E, F)。

S. pneumoniae D-5834 株 および D-5580 株 に対する

GRNX 投与時の AAKC ならびに 99.9%KT はそれぞれ、>108 および >103 $\Delta\text{Log}_{10}\text{CFU}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、1.98 および 1.78 時間で、LVFX 投与時と同程度であり、両薬剤とも強く速やかな殺菌効果を示した。一方、*parC* 変異保有 D-5787 株に対する GRNX および LVFX 投与時の AAKC は、>106 および 20.7 $\Delta\text{Log}_{10}\text{CFU}\cdot\text{h}/\text{mL}$ で、GRNX は LVFX に比べて強い殺菌効果を示すとともに、それぞれの 99.9%KT は 2.24 および 4.74 時間で、GRNX は *parC* 変異保有株に対しても速やかな初期殺菌効果を示した (Table 1)。

3. *In vitro* PK model における薬剤 24 時間作用後の耐性化

GRNX 投与モデルにおける 24 時間後の菌液では、いずれの菌株に対しても 24 時間後の Control から得られた菌液と比べて感受性の低下したポピュレーションは確認されなかった。一方、LVFX 投与モデルでは、野生株 2 菌株に対しては 24 時間後のポピュレーションに変化はみられなかったが、*parC* 変異保有 *S. pneumoniae* D-5787 株では、感受性の低下したポピュレーションが確認された (Fig. 3)。

parC 変異保有 D-5787 株において、LVFX 投与 24 時間後の菌液から無作為に選択した 7 コロニーに対する GRNX および LVFX の MIC はすべて元株の 8 倍に上昇し、いずれも GyrA の Ser-81 に 1 カ所アミノ酸変異が加わっていた。それら 7 コロニー中 4 コロニーが Ser-81→Tyr に、残りの 3 コロニーが Ser-81→Phe に変異していた。なお、その他の QRDR 部位に新たな変異は認められなかった。

III. 考 察

今回、われわれは、GRNX の *S. pneumoniae* に対する有効性を評価するため、臨床用量投与時のヒト血中濃度を再現した *in vitro* PK model を用い、野生株および *parC* 変異保有株に対する殺菌効果ならびに耐性化の有無について LVFX とともに検討した。

本邦における *S. pneumoniae* のキノロン耐性率は 1.2% とまだ低い¹⁾、今後さらなる使用頻度の増加に伴い、耐性化の進行が危惧される。すでに、60 歳以上の高齢者で

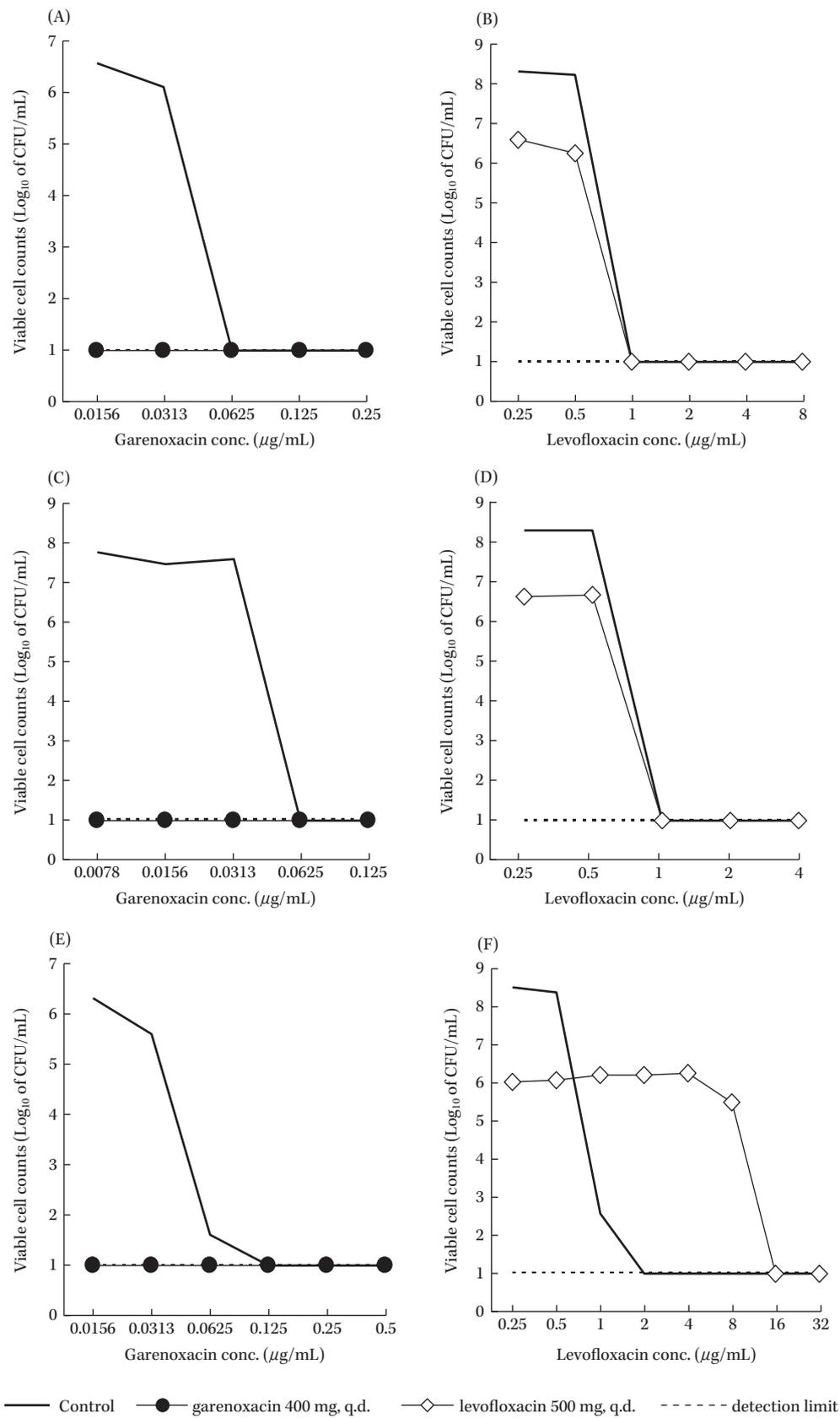


Fig. 3. Frequency of a resistant population in *Streptococcus pneumoniae* after 24-hr cultivation in a simulated free serum concentration of garenoxacin and levofloxacin.

(A) (B): *S. pneumoniae* D-5834, (C) (D): *S. pneumoniae* D-5580, (E) (F): *S. pneumoniae* D-5787

は、キノロン耐性株が15%と高い頻度で分離されている⁴⁾。米国では、LVFXに感受性を示すもののQRDRに1アミノ酸変異を有する株が分離され⁵⁻⁸⁾、このような1変異株に対する不十分なキノロンの曝露は耐性化につながる可能性が示唆されており²⁶⁾、臨床で有効性が認められなかった症例も報告されている⁹⁾。今回、LVFX感性株でQRDRに1変異を有する株は2004年分離株で1/160株(0.6%)、2008~2009年分離株で7/234株(3.0%)で、僅かながらも増加傾向を示した。2007年の全国サーベイランスでは、LVFX感性株の5.9%でQRDRにアミノ酸変異が認められており¹⁾、今回の結果と同程度であった。本邦ではQRDR変異保有株の分離頻度はまだ低いが、1変異株の多くはLVFX感性であるため⁷⁾、MICで判別することは困難である。1変異株は野生株に比べ、さらにQRDRに変異を獲得しやすく²⁷⁾、2カ所以上に変異を有するとキノロン系薬に対する感受性が著しく低下する²⁸⁾。キノロン高度耐性菌の拡大を防ぎ、良好な治療効果を得るためには、1変異株に対しても耐性菌を選択しにくく、速やかに除菌可能な薬剤が求められる。

キノロン系薬の有効性の指標はfree AUC ($fAUC$)/MICであり²⁹⁾、呼吸器感染症に対する臨床試験の結果から、GRNXは $fAUC/MIC$ が30以上、LVFXは34以上で良好な治療効果を得ることが報告されている^{30,31)}。今回の検討において、QRDRにアミノ酸変異をもたない野生株2菌株(D-5834株およびD-5580株)に対するGRNXならびにLVFX投与時の $fAUC/MIC$ はそれぞれ、262および403, 39.7および42.0で、いずれもターゲット値を満たし、*in vitro* PK modelでも強い殺菌効果を示しており、両薬剤とも本菌を原因菌とした感染症に対し良好な臨床効果を示すことが期待された(Table 1)。その一方で、これら2菌株に対してLVFX投与モデルでは培養24時間後に再増殖が認められた。神田らの報告³²⁾でも、LVFX 500 mg, q.d. 経口投与時の*in vitro* PK modelにおいて、QRDRにアミノ酸変異をもたない*S. pneumoniae*に対し、ほとんどの株で培養24時間後に再増殖がみられている。今回の検討で、99.9%KTは両薬剤とも同程度であり、どちらも速やかな殺菌効果を示したが、GRNX投与モデルの培養24時間後の生菌数は検出限界以下であり、GRNXは再増殖を抑制した。

*parC*変異保有株(D-5787株)では、GRNX投与時の $fAUC/MIC$ は246とターゲット値を大きく上回り、強い殺菌効果を示したのに対し、LVFX投与時の $fAUC/MIC$ は29.2とターゲット値付近ではあるが、十分な殺菌効果が認められず、24時間後には感受性の低下したポピュレーションが認められた。また、初期殺菌能の指標である99.9%KTは、GRNXが2.24時間とLVFXの4.74時間に比べ短く、速やかな殺菌効果を示した(Table 1)。*In vitro* PK modelにおいて、LVFXは*parC*変異保有株に対し十分な殺菌効果が得られず、GyrAにさらなるアミノ

酸変異を獲得した高度耐性菌が選択されることが報告されており²⁶⁾、今回の結果と一致していた。

*parC*変異保有株に対するLVFX投与モデルでは、投与後に生菌数が減少し、その後増殖したものの、再び生菌数の減少がみられた。これについて詳細は明らかではないが、LVFX投与直後の生菌数の減少は薬剤作用によるものであり、その後、薬剤濃度の低下に伴う残存菌の増殖および不十分な薬剤作用による耐性菌の出現により徐々に生菌数が増加し、自己融解にて再び減少したと推察される。また、いずれの株もControlでは一時的な生菌数の減少がみられた。*S. pneumoniae*に対する*in vitro* PK modelにおいて同様の報告があり³²⁻³⁴⁾、これらは*S. pneumoniae*特有の現象であることから、*S. pneumoniae*の自己融解によるものと考えられる。

有効性だけでなく耐性菌抑制の観点からもPK-PD理論に基づく投与法が提唱されており、Madaras-Kellyらは、*S. pneumoniae*において C_{max}/MIC が5以上でLVFXへの耐性化が認められなかったことを報告している³⁵⁾。GRNX投与時の fC_{max}/MIC はいずれの株においてもこの値を大きく上回り、耐性化は認められなかった。一方、LVFX投与時の fC_{max}/MIC は野生株では5以上で耐性化は認められなかったが、*parC*変異保有株ではこの値を下回り耐性化が認められており、既報の結果を支持するものであった(Table 1)。

以上、*S. pneumoniae*の野生株および*parC*変異保有株に対し、強く速やかな殺菌効果を示すGRNXは、早期除菌ならびに耐性菌出現抑制の観点から、*S. pneumoniae*を原因菌とする呼吸器および耳鼻咽喉科領域の感染症治療に対して有用であることが示唆された。

謝 辞

貴重な臨床分離株を譲渡いただきました三嶋廣繁先生をはじめとする東海アンチバイオグラム研究会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) 山口恵三, 大野 章, 石井良和, 館田一博, 岩田守弘, 神田 誠, 他: 2007年に全国72施設から分離された臨床分離株12,919株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiot 2009; 62: 346-70
- 2) 大崎能伸: 起炎菌別に考えること、肺炎球菌。化学療法領域 2008; 24 (S-1): 94-102
- 3) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会: 成人市中肺炎診療ガイドライン, 日本呼吸器学会, 東京, 2007
- 4) 横田伸一, 佐藤 清, 吉田 繁, 藤井暢弘: フルオロキノロン耐性 *Streptococcus pneumoniae* の検出状況と分子疫学的検討。感染症学雑誌 2004; 78: 428-34
- 5) Brueggemann A B, Coffman S L, Rhomberg P, Huynh H, Almer L, Nilius A, et al: Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in United States since 1994-1995. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 680-8

- 6) Davis T A, Evangelista A, Pfleger S, Bush K, Sahn D F, Goldschmidt R: Prevalence of single mutations in topoisomerase type II genes among levofloxacin-susceptible clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States in 1992 to 1996 and 1999 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 119-24
- 7) Richter S S, Heilmann K P, Beekmann S E, Miller N J, Rice C L, Doern G V: The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 225-35
- 8) Pletz M W, Shergill A P, McGee L, Beall B, Whitney C G, Klugman K P: Prevalence of first-step mutants among levofloxacin-susceptible invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1561-3
- 9) de Cueto M, Rodríguez J M, Soriano M J, López-Cerero L, Venero J, Pascual A: Fatal levofloxacin failure in treatment of a bacteremic patient infected with *Streptococcus pneumoniae* with a preexisting *parC* mutation. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1558-60
- 10) 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. 日化療会誌 2007; 55 (S-1): 1-20
- 11) 内田英二: Garenoxacin の臨床第 I 相: 臨床薬理試験. 日化療会誌 2007; 55 (S-1): 95-115
- 12) 渡辺 彰, 新妻一直, 武田博明, 青木信樹: 慢性呼吸器疾患の二次感染患者における garenoxacin の喀痰移行性試験. 日化療会誌 2007; 55 (S-1): 162-8
- 13) 馬場駿吉, 鈴木賢二, 山中 昇, 夜陣紘治: 耳鼻咽喉科領域感染症に対する garenoxacin の臨床効果と組織移行性試験. 日化療会誌 2007; 55 (S-1): 194-205
- 14) Takagi H, Tanaka K, Tsuda H, Kobayashi H: Clinical studies of garenoxacin. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 468-74
- 15) 渡辺 彰, 河野 茂, 小林宏行: ジェニナック錠による呼吸器感染症に対する症状改善効果. 化学療法の領域 2011; 27: 571-81
- 16) 望月優一郎, 徳丸岳志, 洲崎春海: 成人急性咽頭・扁桃炎患者に対するガレノキサシンとレボフロキサシンの臨床効果に関する比較検討. 耳鼻咽喉科展望 2011; 54: 372-9
- 17) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth Informational Supplement, CLSI, 2009; M100-S19
- 18) 満山順一, 山岡一清, 浅野裕子, 澤村治樹, 末松寛之, 寺地真弓, 他: 岐阜県下における肺炎球菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス—2004 年—. *Jpn J Antibiot* 2006; 59: 137-51
- 19) 古家由理, 福田淑子, 野村伸彦, 満山順一, 浅野裕子, 末松寛之, 他: 岐阜及び愛知県内で分離された肺炎球菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス (2008 年~2009 年). *Jpn J Antibiot* 2012; 65: 1-14
- 20) Alonso R, Galimand M, Courvalin P: An extended PCR-RFLP assay for detection of *parC*, *parE* and *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 682-3
- 21) Pan X S, Ambler J, Mehtar S, Fisher L M: Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2321-6
- 22) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition, CLSI, 2009; M07-A8
- 23) 柴 孝也, 深瀬広幸, 杉山 篤: 健康成人男性および高齢男性を対象とした levofloxacin 250~1,000 mg の第 I 相臨床試験. 日化療会誌 2009; 57 (S-2): 1-11
- 24) Schentag J J: Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clin Infect Dis* 2000; 31(Suppl 2): S40-4
- 25) 日本化学療法学会: 抗菌薬感受性測定法検討委員会最終報告 (2007 年). 日化療会誌 2008; 56: 49-57
- 26) Schafer J, Hovde L B, Simonson D, Rotschafer J C: *In vitro* pharmacodynamics of moxifloxacin versus levofloxacin against 4 strains of *Streptococcus pneumoniae*: 1 wild type, 2 first-step *parC* mutants, and pump mutant. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 155-61
- 27) Li X, Zhao X, Drlica K: Selection of *Streptococcus pneumoniae* mutants having reduced susceptibility to moxifloxacin and levofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 522-4
- 28) Rozen D E, McGee L, Levin B R, Klugman K P: Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 412-6
- 29) Craig W A: Does the dose matter? *Clin Infect Dis* 2001; 33(Suppl 3): S233-7
- 30) Tanigawara Y, Nozawa K, Tsuda H: Optimal dose finding of garenoxacin based on population pharmacokinetics / pharmacodynamics and Monte Carlo simulation. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68: 39-53
- 31) Ambrose P G, Grasela D M, Grasela T H, Passarell J, Mayer H B, Pierce P F: Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2793-7
- 32) 神田裕子, 千葉めぐみ, 井上和恵, 星野一樹, 田中眞由美, 大谷 剛, 他: *In vitro* 血中濃度シミュレーションモデルを用いた *Streptococcus pneumoniae* および *Escherichia coli* 耐性化防止のための levofloxacin の至適投与法の検討. 日化療会誌 2009; 57: 1-14
- 33) 田中眞由美, 内田洋子, 吉原清美, 赤坂高明, 村上要一, 佐藤謙一, 他: ヒト血清中濃度シミュレーションモデルにおける levofloxacin の殺菌作用. 日化療会誌 2000; 48: 325-32
- 34) 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. 日化療会誌 2008; 56 (S-1): 1-17
- 35) Madaras-Kelly K J, Demasters T A: *In vitro* characterization of fluoroquinolone concentration/MIC antimicrobial activity and resistance while simulating clinical pharmacokinetics of levofloxacin, ofloxacin, or ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37: 253-60

Bactericidal activity and resistant selectivity evaluation of garenoxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model

Yuri Furuya¹⁾, Yoshiko Fukuda¹⁾, Nobuhiko Nomura¹⁾ and Yoshikazu Ishii²⁾

¹⁾ Research Laboratories, Toyama Chemical Co. Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama, Japan

²⁾ Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Toho University School of Medicine

We evaluated the bactericidal activity and resistance selectivity of garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) against clinical isolates of levofloxacin(LVFX)-susceptible *Streptococcus pneumoniae* with no mutation or a mutation in ParC (Ser-79 to Phe) using an *in vitro* pharmacokinetic model simulating free serum concentrations for a standard clinical regimen [400 mg, q.d.], and compared its efficacy with that of LVFX (500 mg, q.d.).

GRNX showed excellent and rapid bactericidal activity against isolates of *S. pneumoniae* including the *parC* mutant, achieving a free AUC/MIC ratio above 246, without the emergence of resistant subpopulations.

The area above the killing curves (AAKC) of GRNX against 2 strains without mutation (*S. pneumoniae* D-5834 and D-5580) were >108 and $>103 \Delta\text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{h/mL}$. GRNX showed excellent bactericidal activity, without regrowth and emerging resistant subpopulations over 24 hr. The AAKCs of LVFX were >87.7 and $>114 \Delta\text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{h/mL}$. Although LVFX also showed a potent bactericidal activity, regrowth occurred over 24 hr.

The AAKCs of GRNX and LVFX against the *parC* mutant (*S. pneumoniae* D-5787) were >106 and $20.7 \Delta\text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{h/mL}$, and the times to achieve 99.9% killing were 2.24 hr and 4.74 hr, respectively. GRNX showed excellent and rapid bactericidal activity, without regrowth and emerging resistant subpopulations over 24 hr. On the other hand, exposure to LVFX led to the outgrowth of resistant subpopulations which were 8-fold less susceptible to LVFX and had an additional amino acid substitution in GyrA (Ser-81 to Phe or Tyr).

In conclusion, our results suggest that GRNX is useful against *S. pneumoniae* infection in terms of rapid eradication and resistant prevention.