

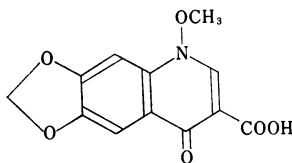
AB-206 の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用

三橋 進・長手 尊俊・倉茂 達徳

群馬大学医学部微生物学教室

AB-206 は住友化学工業株式会社研究開発センターで合成された新しい合成抗菌剤で、Fig.1 の化学構造を有している。本剤は主としてグラム陰性菌に有効であるといわれている¹⁾。今回は本剤の臨床分離株に対する *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を検討したので報告する。

Fig.1 Chemical structure of AB-206



I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

AB-206 は NaOH にて溶解し、ついで HCl にて中和した後、使用した。なお比較薬剤としては Nalidixic acid (NA)²⁾ および Piromidic acid (PA)³⁾ を用いた。

2. 使用菌株

ヒト病巣由来の *E. coli*, *Serratia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* および *Shigella* を用いた。

3. 薬剤感受性の測定

ペプトン水で 18 時間培養した被検菌を 100 倍希釈し、薬剤加 Heart infusion agar (HIA) (栄研) 平板上に 1 白金耳塗布、37°C、18 時間培養後、菌の増殖の有無を判定した。この方法によって薬剤加平板上に接種される菌量は約 10⁴ 個である。各菌株の薬剤に対する感受性は最小発育阻止濃度 (MIC) をもって表現した。

4. 殺菌作用の測定法

(1) 細菌の増殖曲線に及ぼす影響

試験菌は臨床分離の *E. coli* GN 6288, *Pseudomonas aeruginosa* GN 6733 を用いた。培地は Brain heart infusion broth (BHI) を用い、培養当初に、所定濃度の各薬剤を加え、37°C で振盪培養しながら以後経時的に生菌数を測定し、殺菌作用について検討した。

(2) Minimal bactericidal concentration (MBC) の測定

臨床分離の *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* および *Proteus* をそれぞれ 25 株用いた。培地は BHI を用い、培養当初に所定濃度の各薬剤を加え、37°C で培養し、

18 時間後に MIC を測定する。ついで MIC 以上の培養液についてはさらに培養液の 1 白金耳を HIA 培地に接種し、生育したコロニー数が 1 つも認められない場合を MBC 値とした。

5. マウス実験的感染症に対する治療効果

マウス実験的感染症には臨床分離の *E. coli* ML 4707, *Klebsiella pneumoniae* ML 4730 および *Proteus morganii* ML 4731 を用いた。マウスは ICR/JCL (雌)、体重 19±1.5 g のものを、1 薬剤濃度に対し 1 群 15~40 匹使用した。マウス腹腔内に菌株を感染させ、AB-206 および NA を経口投与し、7 日間観察、マウスの生死により ED₅₀ を算出した。ED₅₀ 値はプロビット法により求め、95% 信頼限界を算出した。

(1) *E. coli* 感染症

E. coli ML 4707 を HIA 平板培地に 37°C 約 18 時間培養した菌を 1.5×10⁷ cells/ml に希釈した後、その 0.2 ml をマウス腹腔内に接種した (3×10⁶ cells/mouse, 6 LD₅₀)。治療は感染 1 時間後に 1 回経口投与した。

(2) *Klebsiella* 感染症

Klebsiella pneumoniae ML 4730 を (1) と同様に培養し、5×10⁴ cells/ml に希釈した後、その 0.2 ml をマウス腹腔内に接種して感染させた (1×10⁴ cells/mouse, 10 LD₅₀)。治療は感染 1, 6 および 24 時間後に経口投与した。

(3) *Proteus* 感染症

Proteus morganii ML 4731 を (1) と同様に培養し、1×10⁸ cells/ml に希釈した後、その 0.2 ml をマウス腹腔内に接種して感染させた (2×10⁷ cells/mouse, 7 LD₅₀)。治療は感染直後および 3 時間後に 1 日投与量の半分を投与した。

II. 実験結果

1. *In vitro* 抗菌作用

(1) 臨床分離株の感受性分布

グラム陰性菌である *E. coli* 125 株, *Serratia marcescens* 100 株, *Proteus morganii* 50 株, *Proteus vulgaris* 50 株, *Proteus mirabilis* 50 株, *Proteus rettgeri* 37 株, *Klebsiella pneumoniae* 200 株, および *Pseudomonas aeruginosa* 150 株, およびグラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* 50 株, および NA 耐性 *Klebsiella* 31 株, *Proteus* 31 株, *Serratia* 39 株,

Fig. 2 Antibacterial activity of AB-206 against clinical isolates

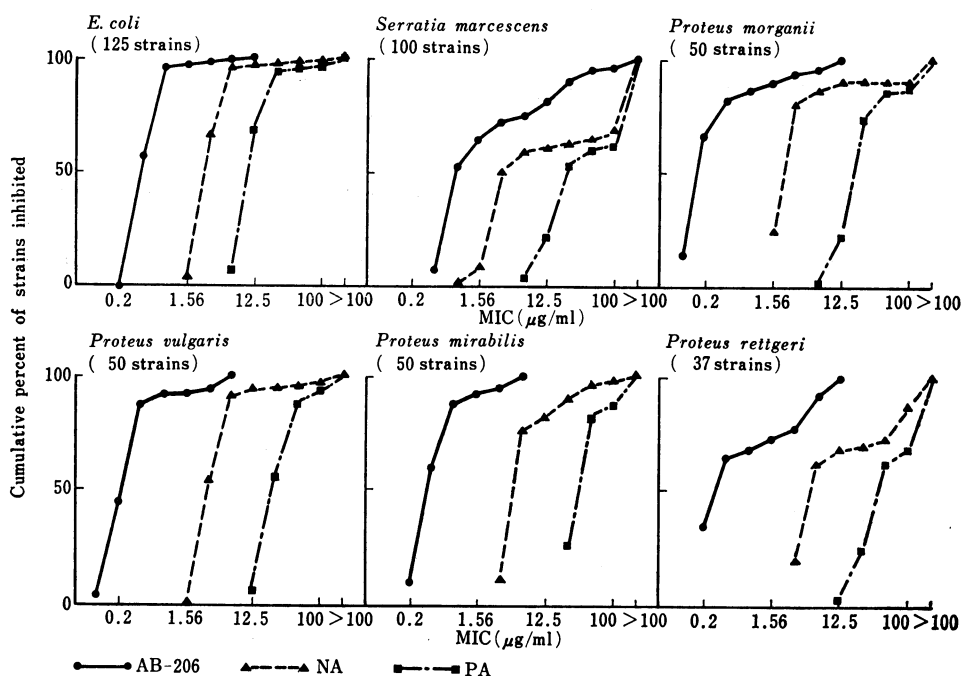
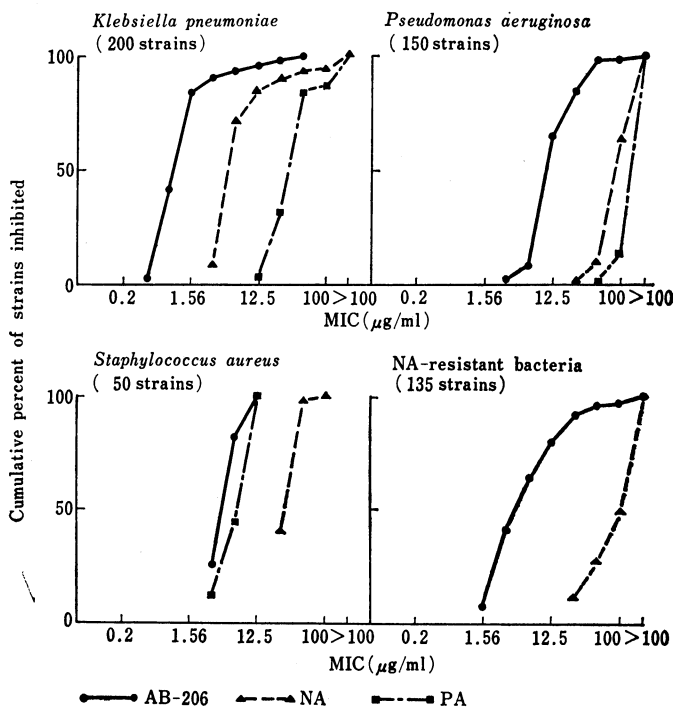


Fig. 3 Antibacterial activity of AB-206 against clinical isolates



Shigella 30 株, および *E. coli* 4 株について検討した。結果は Fig. 2, 3 に示した。

AB-206 の MIC の peak は *E. coli* では $0.39 \mu\text{g/ml}$, *Serratia marcescens* $0.78 \mu\text{g/ml}$, *Proteus* $0.2 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$, *Klebsiella pneumoniae* $0.78 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$, *Pseudomonas aeruginosa* $12.5 \mu\text{g/ml}$, *Staphylococcus aureus* $6.25 \mu\text{g/ml}$ であった。AB-206 はグラム陰性菌に対し, NA に比べ 4~16 倍, PA に比べ 32~128 倍強い抗菌力を示した。また NA が無効な *Pseudomonas* および *Staphylococcus* に対しても比較的強い抗菌力を示した。

AB-206 は $1.56 \mu\text{g/ml}$ にて 86~96% の *E. coli*, *Proteus morganii*, *Proteus vulgaris* および *Proteus mirabilis* を阻止するが NA および PA では同濃度では全く阻止されなかった。また AB-206 は $1.56 \mu\text{g/ml}$ で 64~73% の *Proteus rettgeri*, *Serratia marcescens* および *Klebsiella pneumoniae* を阻止するが NA および PA では同濃度では 0~8% の阻止であった。

NA 耐性菌 (NA : MIC $25 \mu\text{g/ml}$ 以上) に対しては AB-206 の MIC peak は $3.13 \mu\text{g/ml}$ であり, 一方,

NA のそれは $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。AB-206 は NA 耐性菌に対し, NA に比べ 64 倍以上の抗菌力を示した。

(2) 殺菌作用

a) 細菌の増殖曲線に及ぼす影響

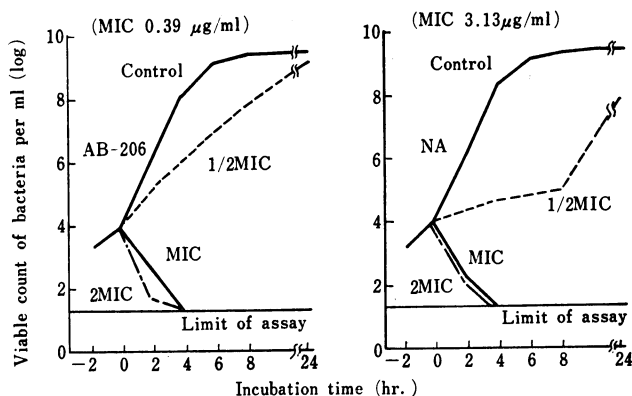
Fig. 4 は *E. coli* GN 6288 および *Pseudomonas aeruginosa* GN 6733 の増殖に対する AB-206 および NA の影響を調べた成績である。*E. coli* GN 6288 の場合は AB-206 および NA の MIC 濃度で, 薬剤添加 4 時間後では *E. coli* GN 6288 の viable count は 1/500 以下に低下した。また *Pseudomonas aeruginosa* GN 6733 の場合は, AB-206 は $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上で, NA は $200 \mu\text{g/ml}$ 以上で殺菌作用が認められた。

b) Minimal bactericidal concentration の測定

Table 1 は臨床分離の *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* それぞれ 25 株の液体培養法における AB-206 と NA の MIC 値と MBC 値を示した。AB-206 は寒天希釈法で認められたと同様に, 液体培養法でも強い抗菌力を示し, NA に比べ, 8~16 倍の強い抗菌力を示した。AB-206 は MIC 値と MBC 値がほぼ一致し, NA と同様, 強い殺

Fig. 4 Bactericidal activity of AB-206

E. coli GN6288



Pseudomonas aeruginosa GN6733

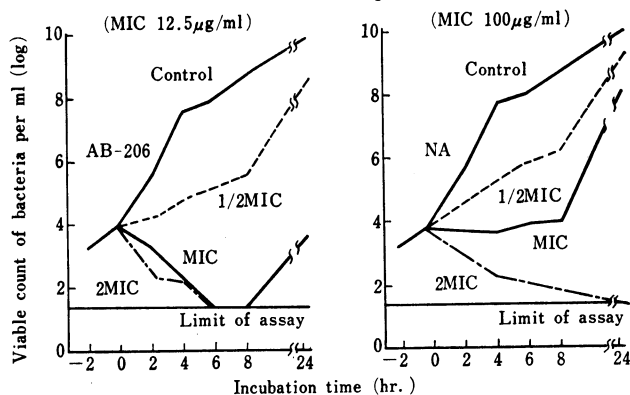
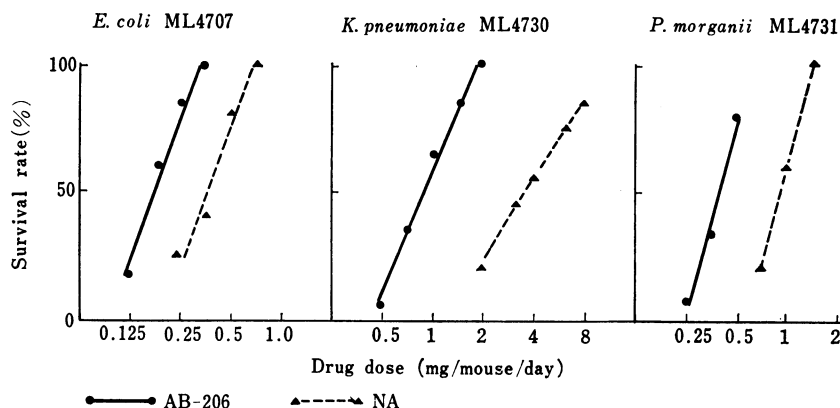


Table 1 Bactericidal effect of AB-206

Organism	Drug		Concentration of drug ($\mu\text{g/ml}$)												
			0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	>200
<i>E. coli</i>	AB-206	MIC MBC		3	16 16	6 7	2								
	NA	MIC MBC					6 5	14 12	5 8						
<i>Proteus</i>	AB-206	MIC MBC	7 3	11 10	3 7	1		3 2	1 1	1					
	NA	MIC MBC					5	6 7	8 8	2 5	1		4 1		3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AB-206	MIC MBC		1	10 7	12 15	1	1 1	1	1					
	NA	MIC MBC					1	2 2	17 17	3 4		1 1			1 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB-206	MIC MBC							4 3	15 13	2 4	3 4	1 1		
	NA	MIC MBC										1 1	12 4	7 14	5 6

10⁴ cells/mlFig.5 *In vivo* antibacterial activity of AB-206 on experimental infection of mice

菌作用が認められた。

2. *in vivo* 抗菌作用：マウス実験的感染症

E. coli ML 4707 の場合は Table 2, Fig.5 に示すごとく、AB-206 および NA の ED₅₀ 値はそれぞれ 8.99 および 19.0 mg/kg であり、AB-206 は NA に比べ約 2 倍、良好な成績を示した。なお無処置群は感染 1 日後には全マウス感染死亡した。

Klebsiella pneumoniae ML 4730 の場合は Table 2, Fig.5 に示すごとく、AB-206 および NA の ED₅₀ 値はそれぞれ 46 および 187 mg/kg であった。AB-206 は NA より約 4 倍良好な成績を示した。なお無処置群は感

染 2~3 日後に全マウス感染死亡した。

Proteus morganii ML 4731 の場合は Table 2, Fig.5 に示すごとく、AB-206 および NA の ED₅₀ 値はそれぞれ 20.4 および 47.8 mg/kg であった。AB-206 は NA より約 2.4 倍良好な成績を示した。なお無処置群は感染 1 日後には全マウス感染死亡した。これらの ED₅₀ 値はいずれの株に対してもその 95% 信頼限界から AB-206 と NA の差が有意であることを示している。

III. 考 察

AB-206 の種々臨床分離株に対する抗菌力を検討した結果、AB-206 は化学構造的に類似した NA および PA

Table 2 *In vivo* antibacterial activity of AB-206 on experimental infection of mice

Organism	Drug	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg) (Confidence limits (95%))
<i>E. coli</i> ML 4707	AB-206 NA	0.39 1.56	8.99 (8.0~9.94) 19.0 (16.8~21.4)
<i>K. pneumoniae</i> ML 4730	AB-206 NA	0.39 6.25	46.0 (35.9~57.9) 187 (87.3~276)
<i>P. morganii</i> ML 4731	AB-206 NA	0.20 3.13	20.4 (15.3~25.5) 47.8 (39.4~60.5)

と同様、主としてグラム陰性菌に有効であるが、NA および PA より強い抗菌力を有することがわかった。AB-206 は PA と同様に NA がほとんど無効な *Staphylococcus aureus* に対し抗菌作用を示す。また AB-206 は NA および PA が無効な *Pseudomonas aeruginosa* に対しても抗菌作用を示す。さらに AB-206 は NA 耐性菌に対して一部は交叉耐性を示すが、大部分は不完全交叉耐性を示し、AB-206 は NA 耐性菌に対し NA より 64 倍以上の抗菌力を示す。なぜ AB-206 が NA 耐性菌に対して不完全な交叉耐性を示すのか、この理由の解明は今後の研究課題である。

最近、大日本製薬総合研究所で NA 誘導体である Pipemidic acid (PPA)^{4,5)} が開発されたがその抗菌力はグラム陰性菌に対し NA の 2~4 倍と報告されている。AB-206 はグラム陰性菌に対し NA より 4~16 倍の抗菌力を有している。従って AB-206 は PPA より強い抗菌力を有すると考えられる。また PPA は *Pseudomonas* に対し抗菌力を有し、NA 耐性菌に対してもある程度の抗菌作用を示すことが報告されている。これら新しい誘導体である AB-206 および PPA のこれらの菌に対する作用機作は興味ある課題である。

AB-206 はマウス実験的感染症では経口投与により、

臨床分離のグラム陰性菌に対し NA より良好な感染防御効果を示した。これらの *in vivo* 効果は *in vitro* 抗菌作用を反映していると考えられる。

IV. ま と め

AB-206 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を検討したような結果をえた。

1. AB-206 は主としてグラム陰性菌に抗菌力が強く、一般の腸内細菌に対し、PA および NA より強い抗菌作用を示した。
2. AB-206 は *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* および NA 耐性菌に対しても抗菌力を示し、NA 耐性菌の多くで完全な交叉耐性を示さないことが特徴である。
3. AB-206 は MIC 以上の濃度で強い殺菌作用を示した。
4. 種々の臨床分離株によるマウス実験的感染症において、経口投与で NA より良好な治療効果を示した。

文 献

- 1) 井澤昭雄, 木崎容子, 入江健二, 江田靖子, 小松敏昭, 並木信重郎, 水谷卓, 長手尊俊, 神郡邦男, 大村貞文: 新化学療法剤 AB-206 の抗菌作用。Chemotherapy (in press)
- 2) 中澤昭三, 中村敦子, 丹羽能子, 余公元子: 新化学療法剤 Nalidixic acid に関する基礎的研究。Chemotherapy 13: 139~145, 1965
- 3) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & T. TAKASE: Piromidic acid, a new antibacterial agent: Antibacterial properties. Antimicrob. Agents & Chemoth. —1970: 117~122, 1971
- 4) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. TAKASE, A. MINAMI, K. NAKATA, S. INOUE, M. ISHIYAMA & Y. KUBO: Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: *In vitro* properties. Antimicrob. Agents & Chemoth. 8(2): 132~138, 1975
- 5) 中澤昭三, 西野武志, 浜洲泰久, 石山正光: 合成化学療法剤 Pipemidic acid に関する細菌学的研究。Chemotherapy 23: 2647~2657, 1975

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AB-206

SUSUMU MITSUHASHI, TAKATOSHI NAGATE and SATONORI KURASHIGE

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of AB-206 was examined using various strains of both gram-positive and gram-negative bacteria. The results are summarized as follows:

1. AB-206 showed a potent antibacterial activity against gram-negative bacteria and was found to be more active than piromidic acid and nalidixic acid.
2. It was characteristic that AB-206 also showed the antibacterial activity against *Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus* and nalidixic acid-resistant strains of bacteria.

3. AB-206 was generally bactericidal against various species of gram-negative bacteria including *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Oral administration of AB-206 showed greater antibacterial activity than nalidixic acid in the experimental infection of mice with *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus morganii*.