

新化学療法剤 AB-206 の抗菌作用

井沢昭雄・木崎容子・入江健二・江田靖子・小松敏昭

住友化学工業株式会社医薬事業部研究開発センター

並木信重郎・水谷 卓・長手尊俊・神郡邦男・大村貞文

大正製薬株式会社総合研究所

1962年 LESHER ら¹⁾により Nalidixic acid (ナリジクス酸) が発表されて以来, Oxolinic acid²⁾, Piromidic acid (ピロミド酸)³⁾, Cinoxacin⁴⁾, DB-2563⁵⁾, R-802⁶⁾ や Pipemidic acid⁷⁾ など多くの類縁の化学療法剤が発表され, Oxolinic acid は海外で, Nalidixic acid および Piromidic acid は国内および国外ですでに医療に供せられ, これらの化学療法剤の研究開発はめざましいものがある。

われわれはよりすぐれた新規化学療法剤の開発をめざし, Fig. 1 に示した構造を有する化合物, AB-206 を見出すに至った。ここに, 本物質の細菌学的評価を詳細

に報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

AB-206 は住友化学工業株式会社において合成されたものを用いた。ナリジクス酸 (以下 NA-第一製薬), ピロミド酸 (PA-大日本製薬) は市販錠剤より抽出精製し, 純度 98% 以上のものを使用した。他の対照薬剤としてアンピシリン (ABPC-万有製薬), セファレキシン (CEX-塩野義製薬), セファゾリン (CEZ-藤沢薬品), ゲンタマイシン (GM-塩野義製薬) を市販薬剤のまま使用した。

2. 抗菌力試験

標準菌株は東京大学医科学研究所, 京都薬科大学微生物学教室, 岐阜大学医学部微生物学教室から分与された菌株および住友化学工業株式会社, 大正製薬株式会社両研究所の保存株を用いた。臨床分離株は東北大学医学部中央検査部, 国立大阪病院臨床検査部, 京都微生物研究所等から, また *Mycoplasma* は東北大学抗酸菌病研究所小児科から分与された株を使用した。

試験管内の抗菌活性は日本化学療法学会標準法⁸⁾ に準じて, 寒天希釈法により測定した。AB-206, NA, PA は 1% 炭酸ソーダ溶液に 1~5 mg/ml に溶解後, M/15 SÖRENSEN のリン酸緩衝液 (pH 7.4) にて希釈して用いた。ABPC, CEX や GM は滅菌蒸留水で溶解, 希釈して用いた。

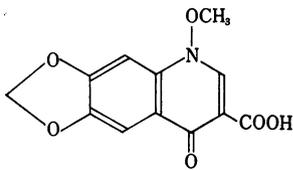
増菌および試験培地は原則として Tryptosoya broth, Heart infusion agar (いずれも日水製薬) を用い, 異なるものは個別に図表の脚注に記した。接種菌量は原則として 10^8 cells/ml を用いて測定した。

3. 諸因子の MIC 値におよぼす影響

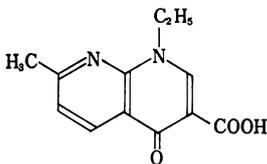
(1) 培地組成, 培地 pH の影響

AB-206 の抗菌力におよぼす培地組成の影響について, Heart infusion agar (HIA), Tryptosoya agar (TSA), 普通寒天 (NA), 感性ディスク用培地 (変法 MUELLER-HINTON agar, MHA) (いずれも日水製薬) を用いて, 日本化学療法学会標準法に準じて, 各培地での AB-206 の MIC を測定することによって検討した。

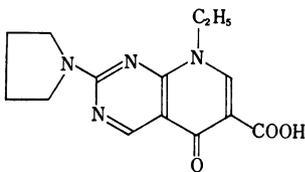
Fig. 1 Chemical structures of AB-206, nalidixic acid and piromidic acid



AB-206



Nalidixic acid (NA)



Piromidic acid (PA)

培地 pH の影響は Heart infusion agar (日水製薬) を用い、pH 5, 6, 7, 8, 9 に調整した同培地での菌の増殖に対する AB-206 の阻止効果によって検討した。被験菌は Tryptosoya broth (日水製薬) で 37°C, 18 時間前培養し、 10^8 /ml の接種菌量を用いた。

(2) 血清添加の影響

Heart infusion agar (日水製薬) に Moni-Trol I 血清 (DADE 社) を最終濃度 10, 25, 50% の割合いで添加し、AB-206 の抗菌力におよぼす血清の影響を検討した。測定は 1.5% の寒天を含む Heart infusion agar に各濃度の血清を加えて平板を作成し菌の増殖に対する AB-206 の阻止効果を平板希釈法を用いて測定した。

(3) 接種菌量の影響

AB-206 の抗菌力におよぼす接種菌量の影響は Heart infusion agar を使用して検討した。被験菌は Tryptosoya broth で 37°C, 18 時間前培養後 1 ml 当りの菌数を測定した。これを原液として 10^5 希釈まで段階的に希釈して用いた。MIC 測定は上記希釈液を用い、日本化学療法学会標準法に準じて NA を対照薬剤として各種接種菌量での MIC を測定し、影響を検討した。

4. 殺菌作用の検討

AB-206 の抗菌作用形式を *E. coli* 055 株を用いて検討した。被験菌は Tryptosoya broth で 37°C, 18 時間前培養し、1/2 MIC 濃度および MIC 濃度の AB-206 または NA を添加した Tryptosoya broth 中へ、 7×10^6 cells/ml と 4×10^4 cells/ml に接種し、37°C, 24 時間振盪培養を行ない、生菌数の変動をみることによって検討した。菌数の測定は培養 0, 2, 4, 8, 12, 24 時間後の培養液を一定量 Tryptosoya agar 上に塗抹して測定した。

5. 耐性獲得様式

E. coli NIHJ JC-2, *Proteus vulgaris* HX 19 を用い AB-206 および NA に対する試験管内耐性獲得様式の検討を行なった。被験菌は Tryptosoya broth で 37°C, 18 時間前培養して用いた。Tryptosoya broth による AB-206 と NA の 2 倍希釈系列 (各 2.5 ml) を作製し、これに前培養菌液 0.05 ml を接種した。37°C, 24 時間培養後、液の濁度によって MIC を判定し、1/2 MIC 濃度において発育した菌の 0.05 ml を新たに作製した薬剤の希釈系列に接種して MIC を測定した。この増量継代法を 10 代継代して耐性の上昇を検討した。

6. 血清蛋白との結合と不活化

AB-206 と NA のヒトおよび動物血清との結合率を遠心限外濾過法を用いて測定した。血清は Moni-Trol I (DADE 社)、マウス、ラット、ウシを使用し、AB-206, NA を 50 μ g/ml の割合で各血清に溶解し、25°C, 1 時

間放置後 Centriflow CF-50 (Amicon 社) にて 1,000 $\times g$ 10 分間遠心限外濾過し、濾液中の活性体量を bioassay により測定して結合率を求めた。

不活化率は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 0, 10, 20, 50, 100% の割合でヒト血清 (Consera-日水製薬) を添加し、AB-206 は 40 μ g/ml, NA は 100 μ g/ml の割合で溶解し、25°C, 1 時間放置後、溶液中の活性体量を測定し、下記の式を用いて不活化率を求めた。

$$\text{不活化率} = \frac{\text{無血清時の薬剤濃度} - \text{血清中の活性体量}}{\text{無血清時の薬剤濃度}} \times 100$$

7. 感染防禦試験

マウスの全身感染症に対する AB-206 の感染防禦効果を検討した。マウスは ICR 系雄性マウス (体重 20 ± 1 g) を一薬剤濃度に対して 10 匹使用した。

使用した菌株は *E. coli* O-111, No. 34, No. 37, *Klebsiella pneumoniae* No. 18, No. 26, *Proteus mirabilis* GN 2425, No. 25, *Proteus vulgaris* KS, *Serratia marcescens* No. 72, No. 74, *Pseudomonas aeruginosa* T, *Streptococcus pyogenes* A1 で、Heart infusion broth で 37°C, 18 時間培養後、菌量を定量した後 5% ムチン液に懸濁して使用した (*S. pyogenes* は Heart infusion broth で培養し、同ブロスで希釈して使用)。被験菌はマウスの腹腔に接種して感染を惹起した。薬剤は 0.5% CMC 液中に懸濁し、菌感染後 1~3 回経口投与した。薬効判定は感染当日より 1 週間生死を観察し、生存率より ED₅₀ を算出した。

II. 実験結果

1. 標準株に対する抗菌活性

標準株に対する *in vitro* 抗菌活性は Table 1 および Table 2 に示した。AB-206 は腸内細菌群の大部分に対して強い抗菌活性を有し、その MIC 値は Table 1 に示すように 0.10~0.78 μ g/ml であり、NA に比べて 1/16~1/8, PA の 1/32~1/16 の MIC 値のものが多かった。また、AB-206 は *P. aeruginosa* や *Staphylococcus* に対しても抗菌力を示した。また、グラム陰性菌のなかでも、*Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio parahaemolyticus* や *Neisseria* に対して強い抗菌力を示した。しかし *Streptococcus* に対しては NA や PA³⁾ 同様抗菌力を示さず、嫌気性菌に対しても一部の *Clostridium* 以外には抗菌活性を示さなかった (Table 2)。このように AB-206 は類薬の NA や PA に比べて、より強い抗菌活性とより広い抗菌スペクトラムを示した。

また、ABPC や CEX と比較しても、これらの薬剤が抗菌力を示さない Indole 陽性の *Proteus*, *Serratia*,

Table 1 Antibacterial spectrum of AB-206 compared with those of nalidixic acid, piromidic acid, ampicillin and cephalixin

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	AB-206	NA	PA	ABPC	CEX
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.20	1.56	6.25	3.13	6.25
<i>E. coli</i> O-111	0.39	3.13	25	3.13	6.25
<i>E. coli</i> K-12	0.39	6.25	12.5	3.13	6.25
<i>E. coli</i> B	0.10	0.39	0.78	0.39	3.13
<i>E. coli</i> Kp	0.10	1.56	3.13	0.78	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.78	12.5	25	25	3.13
<i>K. pneumoniae</i> GN 45	0.20	1.56	3.13	6.25	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a	0.20	0.78	3.13	1.56	6.25
<i>S. sonnei</i> D1 (EW 33)	0.20	1.56	12.5	0.39	1.56
<i>Salmonella typhi</i> 58	0.20	3.13	25	0.39	3.13
<i>S. typhi</i> 901	0.20	1.56	50	1.56	6.25
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.20	0.78	25	12.5	6.25
<i>S. enteritidis</i> G 14	0.20	3.13	50	1.56	6.25
<i>S. shottmuelleri</i> 8006	0.20	1.56	3.13	0.20	3.13
<i>Proteus mirabilis</i> GN 2425	0.39	25	25	1.56	6.25
<i>P. mirabilis</i> 1289	0.20	3.13	12.5	0.39	6.25
<i>P. vulgaris</i> HX 19	0.20	6.25	6.25	25	25
<i>P. vulgaris</i> IID 874	0.20	6.25	50	>200	200
<i>P. morganii</i> Kono	0.20	3.13	25	100	>200
<i>Yersinia enterocolitica</i> 03	0.39	1.56	6.25	25	6.25
<i>Y. enterocolitica</i> 05	0.20	1.56	12.5	100	200
<i>Y. enterocolitica</i> 09	6.25	50	100	50	200
<i>Serratia marcescens</i> X 100	0.39	3.13	>200	>200	>200
<i>Enterobacter cloacae</i> IID 977	0.39	12.5	50	>200	>200
<i>Citrobacter freundii</i> IID 976	6.25	100	>200	>200	>200
<i>Hafnia alvei</i> IID 978	0.39	6.25	25	12.5	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T	12.5	100	>200	>200	>200
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	6.25	50	200	>200	>200
<i>P. aeruginosa</i> IID 5142	25	>200	>200	>200	>200
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P JC-1	12.5	200	25	<0.20	12.5
<i>S. aureus</i> Smith	6.25	50	12.5	<0.20	1.56
<i>S. epidermidis</i> IAM 1296	50	>200	50	<0.20	1.56
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.78	6.25	3.13	<0.20	3.13

Enterobacter さらには *Pseudomonas* などの菌に AB-206 は強い活性を示すが、逆にグラム陽性菌群には ABPC, CEX に比べて AB-206 の抗菌力は弱かった。

2. 臨床分離株に対する抗菌活性

多くの臨床機関より分与された分離株に対する MIC 累積百分率を Fig. 2~9, Table 3, 4 に示した。*E. coli* の 80% が 0.78 $\mu\text{g/ml}$, *K. pneumoniae* の 75% が 3.13 $\mu\text{g/ml}$, *P. mirabilis* の 90% が 1.56 $\mu\text{g/ml}$, *S. marcescens* の 75% が 0.78 $\mu\text{g/ml}$ の AB-206 (いずれも $10^8/\text{ml}$ 菌接種時) により阻止され、同時比較した

NA に比べて 1/16~1/8 の MIC 値であった (Fig. 2~5)。また AB-206 は *P. aeruginosa* に対しても抗菌力を有し、その MIC 値は 25~50 $\mu\text{g/ml}$ にあるものが最も多いのに対して、NA, PA はいずれも 200 $\mu\text{g/ml}$ でもまったく抗菌力を示さなかった (Fig. 6)。*H. influenzae* に対して AB-206 は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ に MIC を示すものが多く、現在市販されている薬剤中、本菌に対してもっとも抗菌力が強いとされている ABPC より *in vitro* においてやや強い抗菌活性を示した (Fig. 7)。*H. parainfluenzae* に対する AB-206 の抗菌力は Table 3 に示され

Table 2 Antibacterial spectrum of AB-206 and nalidixic acid

Organism	Method	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		AB-206	NA
<i>Haemophilus influenzae</i> S-1	1	0.39	1.56
<i>Bordetella pertussis</i> 18-323	2	3.13	6.25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> S	3	0.39	1.56
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	3	0.20	0.78
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Moriwaki	4	0.39	3.13
<i>N. gonorrhoeae</i> Sugiyama	4	0.39	1.56
<i>N. meningitidis</i> 13077	4	0.78	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	2	>400	>400
<i>S. mitis</i> 90	2	>400	>400
<i>S. faecalis</i> 8213	2	>400	>400
<i>S. pneumoniae</i> Neufeld	2	50	>400
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	5	50	400
<i>C. xerosis</i> NCTC 9755	5	12.5	>400
<u>Anaerobes</u>			
<i>Clostridium tetani</i> T 3	6	1.56	100
<i>C. septicum</i>	6	1.56	100
<i>C. chauvoei</i> Okinawa	6	1.56	100
<i>C. perfringens</i> Hobbs 10	6	12.5	100
<i>Veillonella parvula</i> 10790	6	12.5	50
<i>Bacteroides fragilis</i> Ju-9-1	6	200	200
<i>Fusobacterium nucleatum</i> 2390	6	>200	>200
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	6	100	200
<i>Peptostreptococcus putridus</i> B 38	6	200	200
<i>Propionibacterium</i> P 11	6	100	>100
<i>P. acnes</i> P 15	6	100	>100
<u>Acid-fasts</u>			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ R _v	7	100	>100
<i>M. sp.</i> 607	8	>100	>100
<u>Fungi</u>			
<i>Trichophyton rubrum</i>	9	200	
<i>Aspergillus niger</i>	9	>200	
<i>Candida albicans</i>	9	>200	
<u>Mycoplasma</u>			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mac	10	100	>200
<i>M. gallisepticum</i>	10	3.13	25
<i>M. mycoides</i>	10	12.5	>100

Method

Preculture	Test
1. Chocolate broth	Chocolate agar
2. Tryptosoya broth	Eugon agar with 5% rabbit blood
3. Tryptosoya broth	Heart infusion agar
4. (Bacteria were suspended in TSB from agar slant)	Tryptosoya agar with 10% rabbit blood (Candle jar method)
5. Tryptosoya broth	Modified ARAKAWA agar
6. GAM medium	GAM agar
7. DUBOS' medium	DUBOS' medium (Eiken)
8. Nutrient broth with 3% glycerol	Nutrient agar with 3% glycerol
9. (Fungi were suspended in broth from slant)	Sabouraud agar
10. PPLO broth (Difco)	PPLO agar (Difco)

Fig. 2 Cumulative percentages of 232 clinical isolates of *E. coli* by increasing concentrations of AB-206, nalidixic acid, piroimidic acid and ampicillin tested on agar medium with bacterial inocula of two different sizes

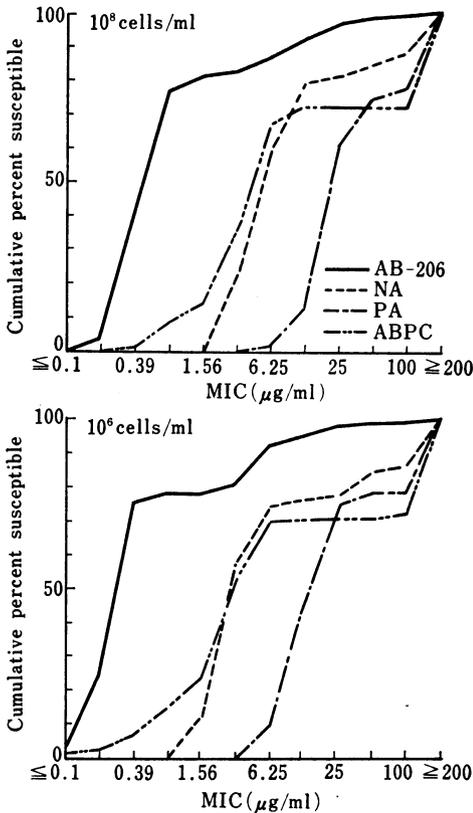
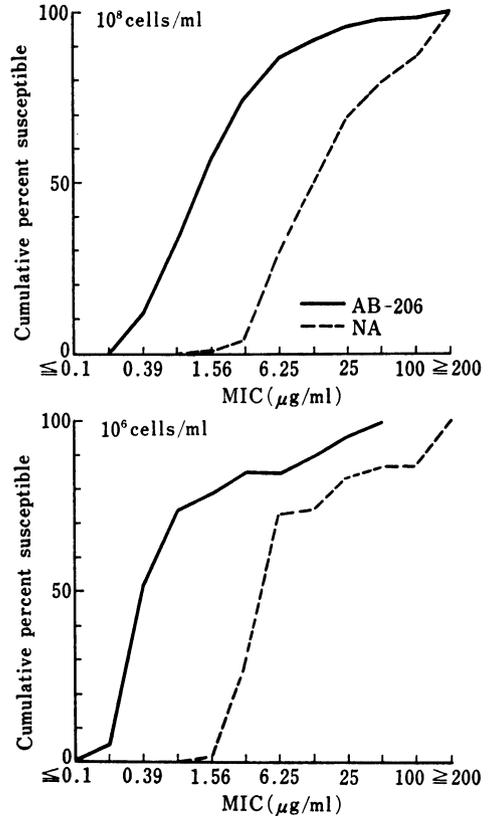


Fig. 3 Cumulative percentages of 121 clinical isolates of *K. pneumoniae* inhibited by increasing concentrations of AB-206 and nalidixic acid tested on agar medium with bacterial inocula of two different sizes



るが、やはり ABPC に比べてすぐれた抗菌力を有していた。しかし *H. parahaemolyticus* に対しては AB-206 の抗菌力は NA に比べて強力であったが、ABPC より弱かった (Table 3)。

AB-206 はブドウ糖非醗酵性グラム陰性菌の中で *Pseudomonas* と並んで近年臨床において問題とされはじめた *Acinetobacter* に対しても抗菌力を有しており、MIC のピークは $3.13 \mu\text{g/ml}$ ($10^8/\text{ml}$)、 $0.78 \mu\text{g/ml}$ ($10^6/\text{ml}$) にあり、後者では GM に匹敵する強い抗菌活性を示した (Fig. 8)。

グラム陽性菌の内ではブドウ球菌が AB-206 に感受性を示し (Table 4)、AB-206 に対する MIC 分布のピークは $12.5 \mu\text{g/ml}$ にあった。

また AB-206 は一部の *Mycoplasma* に対しても抑制効果を示したので、*M. pneumoniae* の臨床分離株 63 株に対する抗菌活性を検討したが、大部分が $50\sim 100 \mu\text{g/}$

Fig. 4 Cumulative percentages of 80 clinical isolates of *P. mirabilis* inhibited by increasing concentrations of AB-206 and nalidixic acid tested on agar medium

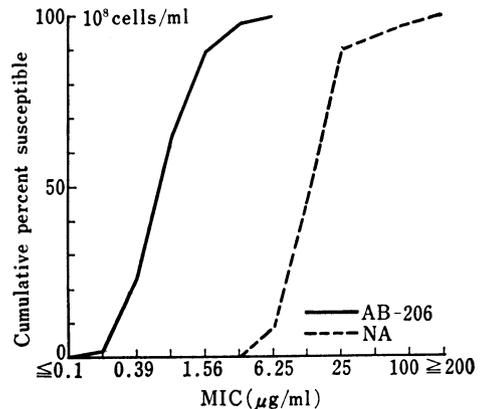


Fig. 5 Cumulative percentages of 52 clinical isolates of *S. marcescens* inhibited by increasing concentrations of AB-206, nalidixic acid, piromidic acid and ampicillin tested on agar medium with bacterial inocula of two different sizes

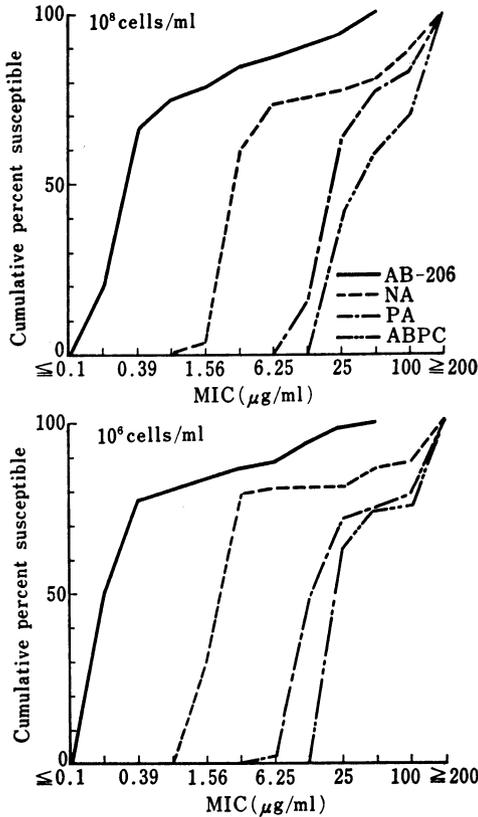


Fig. 6 Distribution of MICs of AB-206 for 146 fresh clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

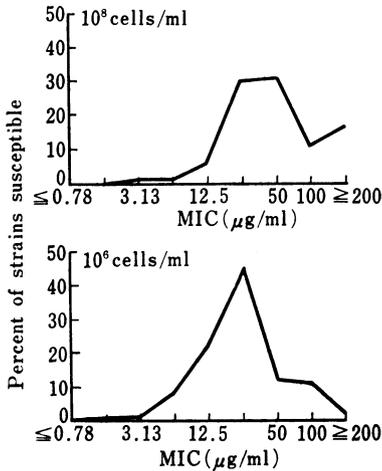


Fig. 7 Distribution of MICs of AB-206, nalidixic acid and ampicillin for 63 fresh clinical isolates of *Haemophilus influenzae*

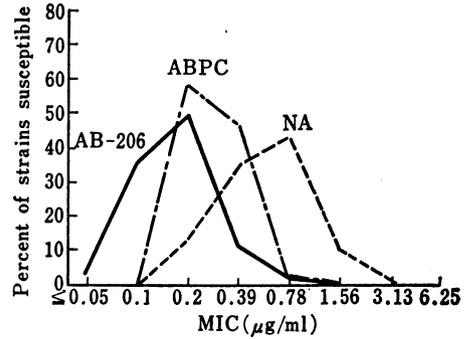
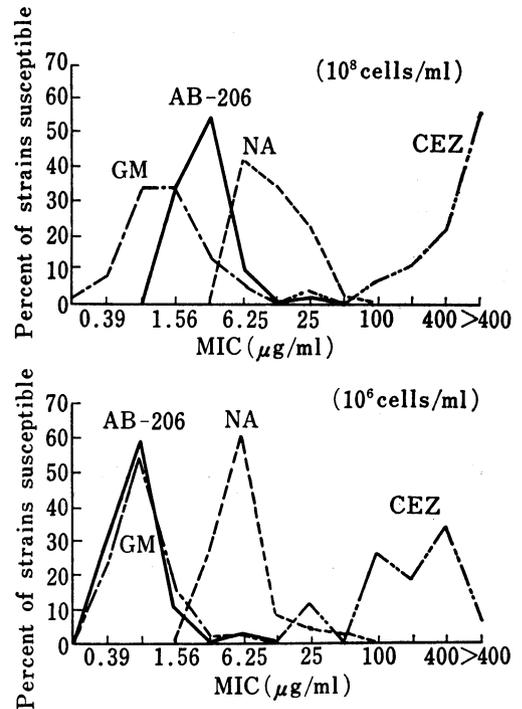


Fig. 8 Distribution of MICs of AB-206, nalidixic acid, ceftazolin and gentamicin for 50 fresh clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*



ml の MIC を示した (Fig. 9)。

以上のように AB-206 の臨床分離株に対する抗菌活性は標準株に対する成績とよく相関しており、腸内細菌の *E. coli* や *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* に対し、また *Haemophilus* に対して強い抗菌活性を示した。このほか NA が抗菌力を有しない *P. aeruginosa* や *Staphylococcus* にも比較的強い抗菌活性を認めた。

Table 3 Susceptibility of clinical isolates of *H. parainfluenzae* and *H. parahaemolyticus* to AB-206, nalidixic acid and ampicillin

		No. of isolates with MIC ($\mu\text{g/ml}$) at :								
		0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5
<i>H. parainfluenzae</i> (11 strains)	AB-206		5	4	2					
	N A				3	5		2	1	
	ABPC		1	4	3	3				
<i>H. parahaemolyticus</i> (7 strains)	AB-206				1	4	2			
	N A							1	5	1
	ABPC		3	4						

Table 4 Susceptibility of clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* to AB-206 and nalidixic acid

	No. of strains	Drug	No. of isolates with MIC ($\mu\text{g/ml}$) at :							
			3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	
<i>S. aureus</i>	38	AB-206 N A		6	32					38
<i>S. epidermidis</i>	21	AB-206 N A		8	13		1	1		19

Table 5 Influence of agar medium and medium pH on the MIC of AB-206

Test organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	Agar				pH				
	HIA	TSA	N A	MHA	5	6	7	8	9
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	0.78
<i>E. coli</i> O-111	0.39	0.39	0.20	0.39	0.20	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>K. pneumoniae</i> GN 45	0.10	0.10	0.10	0.10	0.025	0.05	0.10	0.10	0.78
<i>K. pneumoniae</i> 10031	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>P. mirabilis</i> GN 2425	0.20	0.20	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.39	0.78
<i>P. vulgaris</i> HX 19	0.20	0.10	0.20	0.05	0.10	0.10	0.20	0.20	0.78
<i>S. aureus</i> 6538	6.25	6.25	6.25	3.13	0.78	1.56	6.25	6.25	>50
<i>B. subtilis</i> 6633	0.39	0.20	0.20	0.20	0.05	0.10	0.39	0.39	1.56

Fig. 9 Distribution of MICs of AB-206 and nalidixic acid for 63 fresh clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*

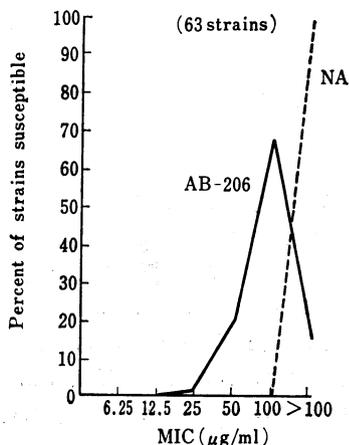


Table 6 Influence of the addition of human serum (Moni-Trol I) on the MIC of AB-206

Serum content (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>P. vulgaris</i> HX 19	<i>S. aureus</i> 6538
50	—	0.78	25.0
25	0.39	0.39	6.25
10	0.39	0.39	6.25
None	0.39	0.39	6.25

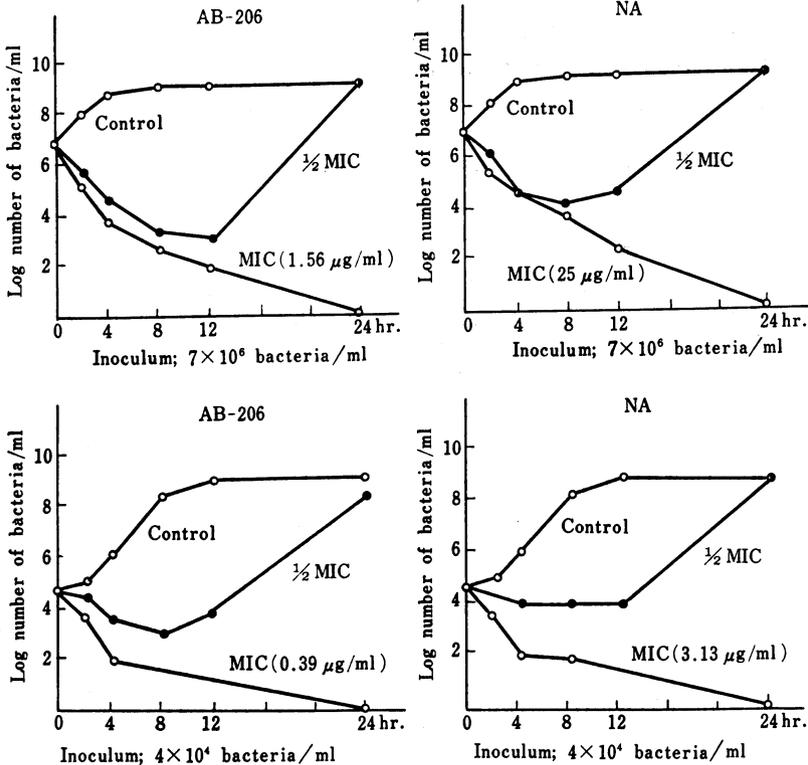
3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす各種培地, pH, 血清, 接種菌量の影響について検討した。培地の種類と pH の影響については, 用いた 4 培地上ではいずれも MIC はほぼ一致したが, 培地 pH はアルカリ側において MIC 値が上昇する

Table 7 Influence of inoculum size on the MIC of AB-206 and nalidixic acid

Test organism	Original bacterial number (10 ⁸ /ml)	Drug	MIC (μg/ml)					
			Dilution					
			10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.05	AB-206 N A	0.78 6.25	0.39 6.25	0.39 6.25	0.10 3.13	— —	— —
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	15	AB-206 N A	12.5 200	12.5 200	12.5 200	6.25 200	6.25 200	6.25 200
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	12.3	AB-206 N A	0.39 6.25	0.20 1.56	0.20 1.56	0.20 1.56	0.20 1.56	0.10 1.56
<i>E. coli</i> O-111	7.6	AB-206 N A	0.78 12.5	0.78 6.25	0.39 6.25	0.39 6.25	0.39 6.25	0.39 3.13
<i>P. mirabilis</i> GN 2425	10	AB-206 N A	1.56 50	0.39 25	0.39 12.5	0.39 6.25	0.39 6.25	0.39 6.25
<i>P. vulgaris</i> HX 19	4.8	AB-206 N A	0.20 6.25	0.20 6.25	0.20 6.25	0.20 1.56	0.10 1.56	0.10 1.56
<i>K. pneumoniae</i> GN 45	8.2	AB-206 N A	0.39 1.56	0.20 1.56	0.20 0.78	0.10 0.78	0.10 0.78	0.10 0.78
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	5	AB-206 N A	1.56 25	0.78 12.5	0.78 12.5	0.78 6.25	0.39 1.56	0.20 0.78

Fig. 10 Bactericidal activity of AB-206 and nalidixic acid on *E. coli* 055



傾向を示した (Table 5)。

培地への Moni-Trol I 血清添加の影響 (Table 6) は、25% 添加までは認められなかった。50% では MIC 値は 2~4 倍に上昇した。

接種菌量の影響 (Table 7) は比較した NA 同様、一部の β -ラクタム系抗生剤のような大きな MIC の変動はなく、むしろ影響を受けにくい部類の薬剤に属すると考えられた。

4. 殺菌作用

AB-206 は Fig. 10 に見られるように *E. coli* 055 株の高および低接種菌量に対し、1/2 MIC では 8~12 時間まで菌数を減少させたが、24 時間後には再増殖を認めた。しかし MIC 濃度においてはより急激な菌数の減少と菌の消失が見られ、24 時間後も再増殖が認められず、完全に殺菌的であった。

5. 耐性獲得様式

AB-206 と NA の薬剤耐性獲得様式の比較検討の結果は Fig. 11 に示した。*E. coli* NIHJ では AB-206, NA いずれも継代 2 日目より耐性が上昇し、*P. vulgaris* HX 19 では NA に対し継代 2 日目より、AB-206 に対しては 3 日目より上昇した。継代 10 日間で *E. coli* NIHJ に対する AB-206, NA の耐性値はそれぞれ 25 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ に上昇した。また、*P. vulgaris* HX 19 に対する耐性は、おのおの 12.5 $\mu\text{g/ml}$, >400 $\mu\text{g/ml}$ へ上昇した。このように NA の耐性獲得は比較的早いのが、AB-206 の場合はゆるやかな段階的パターンを示した。

6. 血清蛋白との結合と不活化

AB-206 のヒト (Moni-Trol I), マウス, ラット, ウシ血清との結合率を NA と比較して, Table 8 に示す。AB-206 は NA に比較してヒトとウシ血清において低い結合率であり, マウス, ラットではほぼ一致していた。

AB-206 のヒト血清による不活化率を NA と比較して Table 9 に示す。AB-206 は NA に比べて血清 100% および 50% 条件下においてより低い不活化率であり, 結合率が NA よりも低いことに由来するものと考えられる。

7. 感染防禦効果

マウスの全身感染症における AB-206 と NA の防禦

Table 8 Binding rate of AB-206 and nalidixic acid with serum protein

	Protein binding rate (%)			
	Moni-Trol I	Mouse	Rat	Bovine
AB-206	86	75	86	85
NA	96	76	88	93

Table 9 Inhibition of antibacterial activity of AB-206 and nalidixic acid by human serum

Drug	Inactivation rate (%)			
	Serum (%)			
	100	50	20	10
AB-206	51.4	44.4	31.9	20.8
NA	71.8	67.6	32.4	19.1

Fig. 11 Development of resistance to AB-206 and nalidixic acid *in vitro*

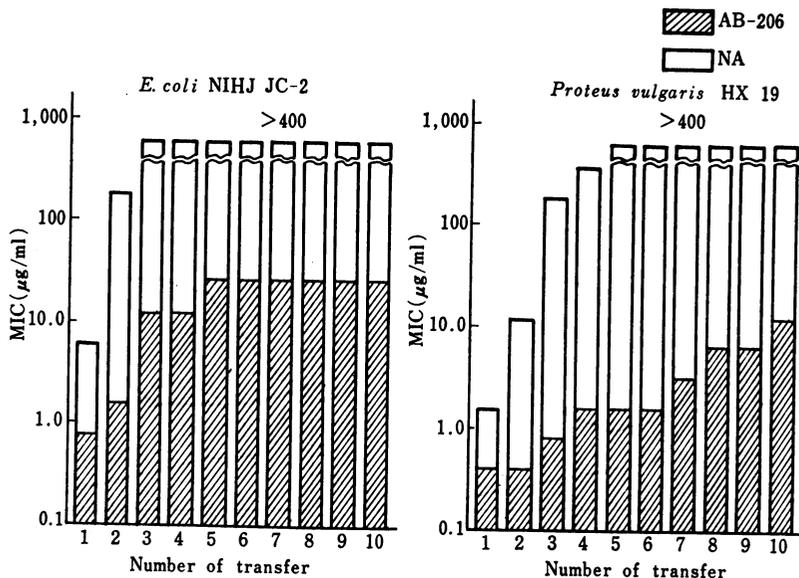


Table 10 Chemotherapeutic effect of AB-206 and nalidixic acid on experimental infections in mice

Organism	Inoculum size (mouse)	×LD ₅₀	Time (hr.) of administration after infection	In vitro MIC (μg/ml)		In vivo total ED ₅₀ (mg/kg)		
				AB-206	Nalidixic acid	AB-206	Nalidixic acid	
<i>E. coli</i>	O-111 No. 34	5×10 ⁶	5	0.5, 6	0.39	3.13	7.2	22
		6×10 ⁶	20	1	0.78	6.25	26	82
	No. 37	5×10 ⁷	500	0.5, 6 0.5, 3, 7 0.5, 6	0.78	12.5	21 30 7.2	72 81 46
<i>K. pneumoniae</i>	No. 18 No. 26	5×10 ⁵	5	0.5, 6	1.56	12.5	23	72
		3×10 ⁶	10	0.5, 6	3.13	12.5	14	21
<i>P. mirabilis</i>	GN 2425 No. 25	7×10 ⁶	20	0.5, 6	0.39	25	22	56
		5×10 ⁵	6	0.5, 6	0.78	12.5	11	36
<i>P. vulgaris</i>	KS	5×10 ⁵	4	0.5, 6	0.39	3.13	22	62
		5×10 ⁶	40	0.5, 6			26	116
<i>S. marcescens</i>	No. 72 No. 74	2×10 ⁷	20	0.5, 6	0.39	3.13	8.8	56
		2×10 ⁷	16	0.5, 6	0.39	3.13	11.4	56
<i>P. aeruginosa</i>	T	4×10 ⁴	20	0.5, 6	12.5	100	100	>200
		2×10 ⁵	100	0.5, 6			118	>200
<i>S. pyogenes</i>	A-1	2×10 ⁸	100	0.5, 6, 23	100	>100	>300	>300

効果を Table 10 に示す。AB-206 はグラム陰性菌のいずれにも有効であり、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* 2種, *S. marcescens* に対し 7.2~30 mg/kg の ED₅₀ 値を示し、NA に比べて 1/4~1/2 の値つまり NA の 2~4 倍抗菌力がすぐれていた。また *E. coli* No. 34 を用いた検討から薬剤の 1 回投与によっても、2 および 3 回分割投与に匹敵する ED₅₀ 値を示した。

AB-206 は NA と異なり *P. aeruginosa* に対しても有効であった。一方 *in vitro* で無効の *S. pyogenes* に対しては NA 同様、3 回投与でも無効であった。

III. 考 察

AB-206 はこれまでの実験結果よりこれらの類縁化学療法剤の中でもっとも抗菌活性の強いものに属し、*in vitro* 抗菌活性は *Enterobacteriaceae* に対して NA の 8~16 倍、PA の 16~32 倍強いことが明らかとなったが、さらに *Haemophilus* や *Pseudomonas*, グラム陽性菌の *Staphylococcus*, 嫌気性菌の *Clostridium* などにも抗菌力を示し、NA や PA に比べてより広い抗菌スペクトラムを有することは、今後の臨床使用にあたって大きな利点といえる。AB-206 の抗菌活性が殺菌的であり、かつ菌量や培地の pH でさほど大きな影響を受けず、血清蛋白による不活化も NA に比べれば少ないことは、抗菌力の強さに加えて好ましい点といえる。しかし *in vitro* での強い抗菌力もマウスにおいては NA との活性比が 2~4 倍へと縮小することは統報において示されるように、マウス、ラットでの AB-206 の血清中

濃度が NA に比べて約 1/2 の高さであることに起因すると思われる。

近年、臨床においては起因菌としてグラム陰性桿菌の分離頻度が増加していることはよく知られているが、1975 年群馬大学附属病院での分離菌 1358 株中の約 50% が *Klebsiella*, *E. coli* と *Pseudomonas* で占められ⁹⁾、さらに尿路感染症ではこれらのほかに *Serratia* と *Enterobacter* が¹⁰⁾ 呼吸器感染症では *Haemophilus* が多い¹¹⁾ と報告されている。また病巣分離のグラム陰性桿菌の半数以上が多剤耐性化しており、プラスミド由来とされている。一方、NA 耐性を伝達するプラスミドはいまだ見いだされず、逆に NA は菌の間の耐性伝達を阻害すると報告されている¹²⁾。AB-206 もこれまでのデータによって同様の特性が類推され、さらにこれらのグラム陰性菌に強い抗菌活性を有することによって、今後の臨床効果に良好な成績を期待させるものである。

IV. 結 論

AB-206 (5, 8-dihydro-5-methoxy-8-oxo-2H-1, 3-dioxolo-[4, 5-g]quinoline-7-carboxylic acid) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性を検討した。

1. AB-206 はグラム陰性菌の内、腸内細菌群, *Haemophilus* 属や *Neisseria* 属に対しきわめて強い抗菌活性を示し、*in vitro* ではナリジクス酸の 8~16 倍、ピロミド酸の 32~64 倍強かった。さらに AB-206 は緑膿菌や *Acinetobacter* のブドウ糖非酸酵性菌、ブドウ球菌、一部の嫌気性菌などにも抗菌活性を有し、これらの

対照薬に比べてより強く、かつ広い抗菌スペクトラムを有していた。

2. AB-206 の抗菌活性は培地の種類, pH (6~8), 接種菌量などによる影響をほとんど受けず, またヒト血清との結合率および不活化率は共にナリジクス酸のそれらより小さい。

3. マウスを用いた実験感染系に対する AB-206 の治療効果は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* (2種), *S. marcescens* に対し, AB-206 は感染後 1, 2 または 3 回投与により, ナリジクス酸の 1/4~1/2 の ED₅₀ 値を示し, *in vivo* においては 2~4 倍強い活性であった。また 1 回投与でも 2 および 3 回分割投与に匹敵する ED₅₀ 値を示した。AB-206 は緑膿菌の感染にも防禦効果を示したが, *in vitro* で抗菌活性を有しない溶連菌には 300 mg/kg の投与でも防禦効果を示さなかった。

(本研究は昭和 47 年 4 月から 52 年 7 月までに行なわれた。)

文 献

- 1) LESHER, G. Y.; E. J. FROELICH, M. D. GRUETT, J. H. BAILEY & R. P. BRUNDAGE: 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1063~1065, 1962
- 2) TURNER, F. J.; S. M. RINGEL, J. F. MARTIN, P. J. STORINO, J. M. DALY & V. S. SCHWARTZ: Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent I. *In vitro* and *in vivo* activity. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy-1967*: p 475~479, 1968
- 3) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & Y. TAKASE: Piromidic acid, a new antibacterial agent: Antibacterial properties. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy-1970*, p. 117~122, 1971
- 4) WICK, W. E.; A. PRESTON, W. A. WHITE & R. S. GORDEE: Compound 64716, a new synthetic antibacterial agent. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 4: 415~420, 1973
- 5) OGAWA, H.; T. AKIMOTO & S. NAKAZAWA: A new antibacterial agent, DB-2563. Abstracts of 14th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy at San Francisco 95, 1974
- 6) STILWELL, G.; K. HOLMES & M. TURCK: *In vitro* evaluation of a new quinolone antibacterial. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 7: 483~485, 1975
- 7) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. TAKASE, A. MINAMI, K. NAKATA, S. INOUE, M. ISHIYAMA & Y. KUBO: Pipemidic acid, a new antibacterial agent against *Pseudomonas aeruginosa*: *In vitro* properties. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 8: 132~138, 1975
- 8) MIC測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について, *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 9) 三橋 進, 伊予部 志津子: 化学療法の新しい考え方特集 薬剤耐性菌。臨床と研究 54: 2091~2095, 1977
- 10) 石神襄次: 化学療法の新しい考え方特集 尿路感染症。臨床と研究 54: 2133~2137, 1977
- 11) 原 耕平, 浅井貞宏, 中富昌夫, 森 信興, 斉藤厚, 藤原恒夫: 化学療法の新しい考え方特集 呼吸器感染症。臨床と研究 54: 2119~2125, 1977
- 12) BOUCK, N. & E. A. ADELBERG: Mechanism of action of nalidixic acid on conjugating bacteria. *J. Bacteriol.* 102: 688~701, 1970

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF A NEW CHEMOTHERAPEUTIC
AGENT, AB-206AKIO IZAWA, YOHKO KISAKI, KENJI IRIE, YASUKO EDA
and TOSHIKI KOMATSUResearch and Development Center, Pharmaceuticals Division,
Sumitomo Chemical Co., LTD.SHINJURO NAMIKI, TAKASHI MIZUTANI, TAKATOSHI NAGATE,
KUNIO KANGOURI, and SADAFUMI OHMURA

Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., LTD.

AB-206, 5,8-dihydro-5-methoxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo [4,5-g] quinoline-7-carboxylic acid, is a novel chemotherapeutic agent. Its *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities were investigated and the results were as follows ;

AB-206 had very potent antibacterial activities on *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* and *Neisseria* in gram-negatives and the inhibitory activities of AB-206 on these bacteria were 8~16 times more potent than those of nalidixic acid and 32~64 times than those of piromidic acid. Moreover, since AB-206 was active on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* in glucose-non-fermenting bacteria, *Staphylococci* and some of anaerobes, AB-206 had the more potent antibacterial activities and wider spectrum than the reference drugs such as nalidixic acid and piromidic acid.

The antibacterial activities of AB-206 were little influenced by changing medium, pH (6~8) and inoculum size. Binding rate of AB-206 with human serum and inactivating rates of AB-206 by addition of human serum were less than those of nalidixic acid.

In vivo antibacterial activities were investigated by using systemic infections of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* and *S. marcescens* in mice. The values of ED₅₀ in AB-206 on these experimental infections were 1/4~1/2 of those of nalidixic acid by oral administration in one, two or three divided doses. The values of ED₅₀ by single administration of AB-260 were almost equal to these of ED₅₀ of total administration in two and three divided doses. AB-206 did not show the protecting activity on the infection of *Streptococcus pyogenes* which was insusceptible to AB-206 *in vitro*.