

新しい合成化学療法剤 Cinoxacin に関する細菌学的評価

西野 武志・後藤 直正・西田 隆晴・原口 千恵・谷野 輝雄
京都薬科大学微生物学教室

今回、私どもは Cinoxacin (CINX) に関する細菌学的評価を Nalidixic acid (NA), Pipemidic acid (PPA), Miloxacin (MLX) を比較薬として検討し以下の成績を得た。

1. CINX は NA と同様グラム陰性菌群に対して抗菌スペクトラムを有し、その抗菌力は NA とほぼ同等で PPA, MLX より劣っていた。

2. 臨床分離株に対する感受性分布では、すべての菌種において MLX が優れた抗菌力を示し、次いで PPA, NA, CINX の順であった。

3. CINX の抗菌力に及ぼす諸因子の影響では *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* とともに馬血清添加、接種菌量で影響はみられず、培地 pH が酸性側の時に NA と同様抗菌力が良好となった。

4. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* を用いて殺菌作用を検討した結果、*P. aeruginosa* を除いて殺菌的に作用した。

5. *E. coli* に CINX を作用させた時の形態変化を観察したところ、NA 作用時に報告されている結果と同様、菌体は伸長化し溶菌も見られた。

6. マウス実験的感染症に対する治療効果を *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* を用いて検討したが、CINX は NA とほぼ同様の治療効果を示した。

はじめに

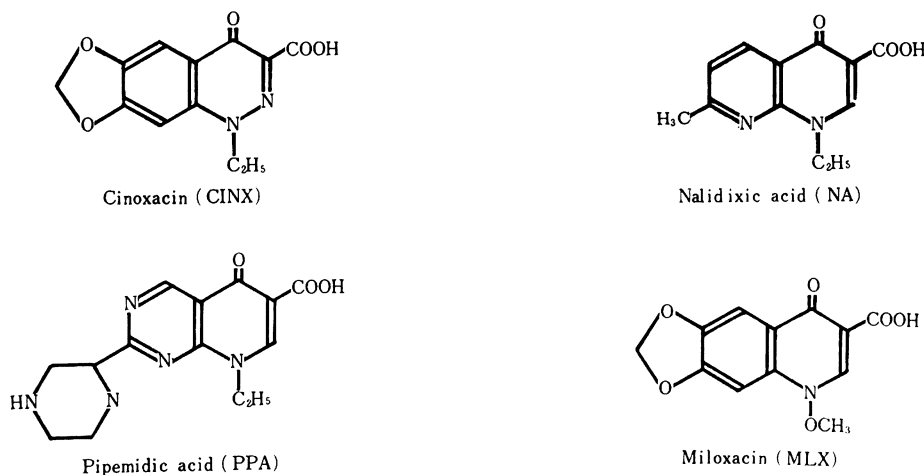
Cinoxacin は米国 Eli Lilly 社で合成された新しい化学療法剤である。本物質は化学名を 1-ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo [1, 3] dioxolo-[4, 5-g] cinnoline-3-carboxylic acid といい既知化学療法剤 Nalidixic acid の類縁化合物で分子式 $C_{12}H_{10}N_2O_5$ 、分子量 262.22、水に難溶の淡黄色結晶性粉末で

ある。その化学構造式は Fig. 1 に示すとおりである。

また本物質の抗菌力及び抗菌スペクトラムも Nalidixic acid とほぼ同程度であると言われている¹⁻⁷⁾。

今回、われわれは Cinoxacin の細菌学的評価について Nalidixic acid⁸⁾, Pipemidic acid^{9, 10)} および Miloxacin¹¹⁾ を比較薬として種々の細菌学的検討を行ない、二、三の知見を得たので報告する。

Fig. 1 Chemical structures



実験材料および実験方法

1. 使用薬

試験薬としては、Cinoxacin (CINX), Nalidixic acid (NA), Pipemidic acid (PPA) および Miloxacin (MLX) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

2. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対する試験管内抗菌力を、前培養に Tryptosoya broth (TSB: ニッスイ), 感受性測定に Heart infusion agar (HIA: ニッスイ) を用いて、日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法¹²⁾ に準じて求めた。なお *Streptococcus* 群, *Corynebacterium diphtheriae* については、10% 馬血液加 HIA を、嫌気性菌群の *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* には Thioglycollate 培地 (TGC: ニッスイ) を、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* には GC 培地 (ニッスイ) を用いた。

3. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離された *S. aureus* 54 株, *E. coli* 50 株, *K. pneumoniae* 43 株, *P. mirabilis* 24 株, *P. vulgaris* 25 株, *P. morgani* 26 株, *P. rettgeri* 12 株, *S. marcescens* 53 株, *P. aeruginosa* 51 株, *Haemophilus influenzae* 20 株および *Acinetobacter calcoaceticus* 20 株について、日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法¹²⁾ に準じて感受性測定を行った。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加, 接種菌量の影響について *E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1 を試験菌として Heart infusion broth (HIB: ニッスイ) を用いた液体希釈法 (37°C, 18~20 時間培養) により検討を行った。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

TSB で前培養した *E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1, *P. aeruginosa* E-2 を HIB に移し、対数期中期まで振盪培養し所定の濃度になるように薬剤を添加し以後、経時的に生菌数を測定した。

6. 形態変化の観察

CINX を *E. coli* K-12 に作用させた時の形態変化について検討を行った。即ち、スライドガラス上で薬を含ませたフィルム寒天を作製し、約 3 時間振盪培養を行なった対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し、これを寒天にかぶせ、パラフィンで封入した。これを 37°C 恒温装置付の位相差顕微鏡 (日本光学) により観察した。

7. マウス実験の感染症に対する治療効果

(a) *E. coli* 感染症に対する治療効果

臨床分離の *E. coli* KC-14 を Nutrient broth (NB: ニッスイ) に 37°C, 14 時間培養後、同培地で希釈し、6% Gastric mucin (Nutritional Biochemicals Corporation) と等量混合した。この菌液の 260 LD₅₀ を 1 群 10 匹の ddY 系♂マウス (16 ± 1 g) の腹腔内に接種し、感染 2 時間後 1 回 0.5% CMC に懸濁させた CINX, NA, PPA, MLX を経口投与した。その後 7 日間生死の観察を行ない生存率を求め LITCHFIELD-WILCOXON 法¹³⁾ によって ED₅₀ 値を算出した。

(b) *K. pneumoniae* 感染症に対する治療効果

臨床分離の *K. pneumoniae* を NB に 37°C, 18 時間培養後 NB で希釈した後、6% Gastric mucin と等量混合した。この菌液の 430 LD₅₀ を 1 群 10 匹のマウスの腹腔内に接種し、感染 2 時間後に 1 回, CINX, NA, PPA および MLX を経口投与した。

(c) *S. marcescens* 感染症に対する治療効果

臨床分離の *S. marcescens* T-55 を NB に 37°C, 18 時間振盪培養後 NB で希釈した後、6% Gastric mucin と等量混合した。この菌液の 300 LD₅₀ を 1 群 10 匹のマウス腹腔内に接種し感染 2 時間後に 1 回 CINX, NA, PPA および MLX を経口投与した。

(d) *P. aeruginosa* 感染症に対する治療効果

臨床分離の *P. aeruginosa* E-2 を *S. marcescens* の場合と同様に NB で 37°C, 14 時間培養後、NB で希釈し、6% Gastric mucin と等量混合した。この菌液の 23 LD₅₀ を 1 群 10 匹のマウス腹腔内に接種して、感染 2 時間後に 1 回 CINX, NA, PPA および MLX を経口投与した。

実験結果

1. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌群および陰性菌群に対する試験管内抗菌力について検討した結果は、Table 1, 2 に示すとおりである。CINX は *C. tetani*, *C. perfringens* など一部のグラム陽性菌群に感受性を示したが、他の菌種には NA 同様耐性であった。また、グラム陰性菌群に対しては NA とほぼ同等あるいは若干劣る感受性を示した。

2. 臨床分離株に対する感受性分布および感受性相関

臨床的に分離された *S. aureus* 54 株, *E. coli* 50 株, *K. pneumoniae* 43 株, *P. mirabilis* 24 株, *P. vulgaris* 25 株, *P. morgani* 26 株, *P. rettgeri* 12 株, *S. marcescens* 53 株, *P. aeruginosa* 51 株, *H. influenzae* 20 株, および *A. calcoaceticus* 20 株に対

Table 1 Antibacterial spectrum (Gram-positive bacteria) (10⁸ cells/ml)

Strains	CINX	NA	PPA	MLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-PJC	>100	>100	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	>100	>100	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	>100	>100	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	>100	>100	50	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	>100	>100	50	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80 (PC-R)	>100	>100	50	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>100	>100	>100	50
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	>100	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK*	>100	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I*	>100	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II*	>100	>100	100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III*	>100	>100	50	>100
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	>100	>100	25	25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25	12.5	6.25	3.13
<i>Bacillus anthracis</i>	25	12.5	6.25	1.56
<i>Clostridium tetani</i> **	0.19	12.5	12.5	1.56
<i>Clostridium perfringens</i> **	0.39	50	50	6.25

* Heart infusion agar supplemented with 10% horse blood

MIC ; µg/ml

** Thioglycollate medium

する感受性分布、累積分布および NA, PPA, MLX との相関関係を検討した結果を Fig. 2~56 に示した。

(a) *S. aureus* の場合

接種菌量が 10⁸ cells/ml の場合は、Fig. 2 に示すように CINX は、100% 近くの株が >100 µg/ml の耐性であり、NA では約 60% が 100 µg/ml、残りが >100 µg/ml の耐性であった。PPA は 25~100 µg/ml にほとんどの株が分布し、MLX は 6.25~25 µg/ml に分布した。10⁶ cells/ml の場合は Fig. 3 に示すように、10⁶ cells/ml に比較して感受性パターンにそれほど大きな変動は認められず、いずれの菌量の場合においても MLX>PPA>NA>CINX の順に優れていた。また Fig. 4~6 に示すように CINX と NA との間に相関関係が認められたが、他の PPA, MLX との間には認められなかった。

(b) *E. coli* の場合

10⁸ cells/ml の場合は Fig. 7 に示すように CINX と NA は、ほとんどの株が 1.56~12.5 µg/ml に分布したが、PPA では 0.39~3.13 µg/ml、MLX では 0.39~3.13 µg/ml に分布していた。10⁶ cells/ml の場合は Fig. 8 に示すように、10⁶ cells/ml と同様に MLX>PPA>NA=CINX の順に抗菌力が優れていた。また Fig. 9~11 に示すように CINX と NA との間に

相関関係が認められたが、他の PPA と MLX との間には認められなかった。

(c) *K. pneumoniae* の場合

10⁸ cells/ml の場合は、Fig. 12 に示すように CINX では ≥100 µg/ml と 12.5~25 µg/ml とに 2 峰性の分布を示した。NA では 6.25~25 µg/ml、PPA では 1.56~25 µg/ml、MLX では 0.19~3.13 µg/ml にほとんどの株が分布し本剤が最も抗菌力が劣っていた。10⁶ cells/ml の場合は Fig. 13 に示すように 10⁶ cells/ml の場合と同じで MLX>PPA>NA>CINX の順で抗菌力がすぐれていた。また、Fig. 14~16 に示すように CINX と NA の間に一部相関性が認められたが、CINX と PPA, MLX の間には認められなかった。

(d) *P. mirabilis* の場合

10⁸ cells/ml の場合は Fig. 17 に示すように CINX では 6.25~25 µg/ml に、NA では 3.13~12.5 µg/ml に、PPA では 3.13~6.25 µg/ml に、MLX では 0.19~0.78 µg/ml にほとんどすべての株が分布し MLX>PPA>NA>CINX の順で抗菌力が優れており、これは Fig. 18 に示すように 10⁶ cells/ml の場合も同様であった。CINX と NA, PPA, MLX との相関関係は Fig. 19~21 に示すように CINX と NA の間に認められた。

Table 2 Antibacterial spectrum (Gram-negative bacteria)

(10⁸ cells/ml)

Strains	CINX	NA	PPA	MLX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	3.13	1.56	0.78	0.39
<i>Neisseria meningitidis</i> *	3.13	0.78	0.78	0.39
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.25	12.5	1.56	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIH	12.5	3.13	1.56	0.39
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	25	25	6.25	1.56
<i>Salmonella typhi</i> T-287	25	12.5	3.13	0.78
<i>Salmonella typhi</i> O-901	12.5	12.5	1.56	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> A	6.25	3.13	1.56	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> B	25	25	1.56	0.78
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.5	12.5	1.56	0.78
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	6.25	3.13	1.56	0.78
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	12.5	12.5	1.56	0.78
<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	3.13	1.56	0.78
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	12.5	3.13	1.56	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5	6.25	3.13	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	12.5	6.25	3.13	0.78
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	12.5	12.5	3.13	3.13
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12.5	12.5	1.56	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10001	12.5	50	6.25	6.25
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	>100	25	50	3.13
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	50	12.5	12.5	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	25	6.25	6.25	0.78
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	12.5	6.25	3.13	0.78
<i>Proteus morgani</i> KONO	12.5	25	3.13	0.78
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	25	6.25	6.25	0.78
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	12.5	6.25	6.25	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	50	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	>100	>100	6.25	25

* GC Medium

MIC ; $\mu\text{g/ml}$ (e) *P. vulgaris* の場合

10⁸ cells/ml の場合は Fig. 22 に示すように CINX NA 共に 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に, PPA では 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$ に, MLX では 0.19~0.78 $\mu\text{g/ml}$ に大半の株が分布していた。10⁶ cells/ml の場合は, Fig. 23 に示すように 10⁸ cells/ml と大きな変動は見られなかった。相関関係も Fig. 24~26 に示すように CINX と NA の間に認められ CINX と MLX とでは認められなかった。

(f) *P. morgani* の場合

10⁸ cells/ml の場合は Fig. 27 に示すように CINX, NA 共に 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に, PPA では 1.56~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に, MLX では 0.19~0.78 $\mu\text{g/ml}$ に多くの株が分布し MLX>PPA>CINX \approx NA の順で抗菌力は優れていた。10⁶ cells/ml の場合も Fig. 28 に示す

ように, ほぼ同様であった。相関関係は Fig. 29~31 に示すように CINX と NA, PPA の間に認められ, MLX との間に認められなかった。

(g) *P. rettgeri* の場合

10⁸ cells/ml の場合は Fig. 32 に示すように CINX は約 80% の株が >100 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示し, NA では約 70% の株が >100 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示した。PPA では 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$, 12.5~50 $\mu\text{g/ml}$ の 2 峰性の分布を, MLX では 0.19~1.56 $\mu\text{g/ml}$, 6.25~25 $\mu\text{g/ml}$ の 2 峰性の分布を示した。10⁶ cells/ml では Fig. 33 に示すように, CINX, NA 共に >100 $\mu\text{g/ml}$ の耐性株がそれぞれ約 40%, 約 50% と減少し, CINX では 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に約 60% が, NA では 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に約 50% の株が分布した。PPA, MLX では大きな変動は認められなかった。相関関係は Fig.

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Staphylococcus aureus* 54 strains (10^8 cells/ml)

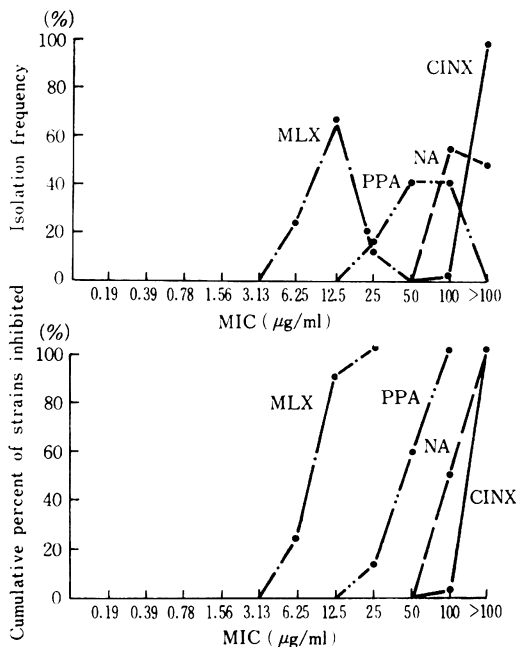


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Staphylococcus aureus* 54 strains (10^6 cells/ml)

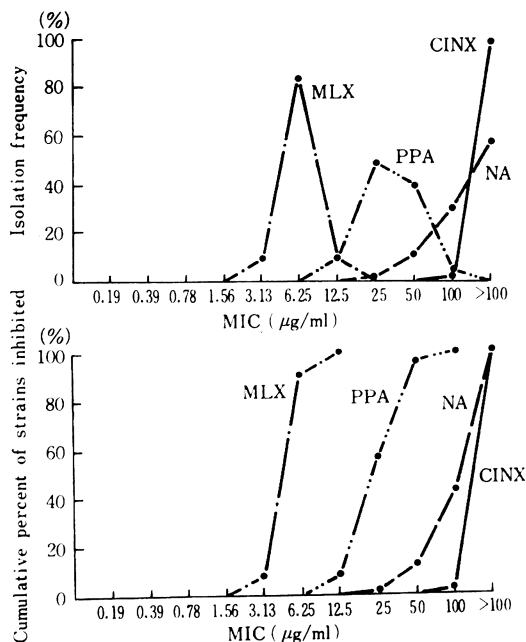


Fig. 4 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Staphylococcus aureus* 54 strains

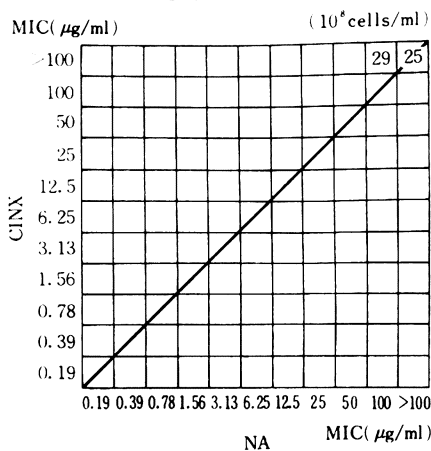


Fig. 5 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Staphylococcus aureus* 54 strains

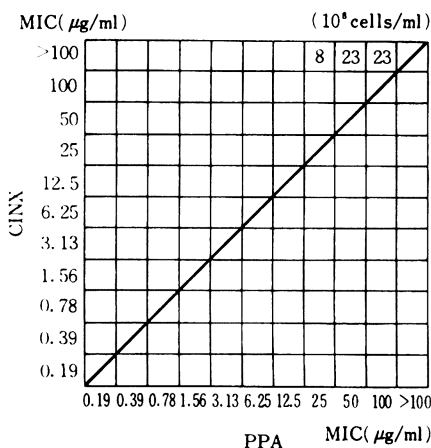


Fig. 6 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Staphylococcus aureus* 54 strains

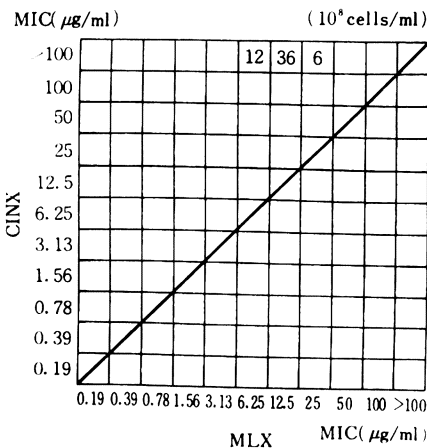


Fig. 17 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus mirabilis* 24 strains (10^8 cells/ml)

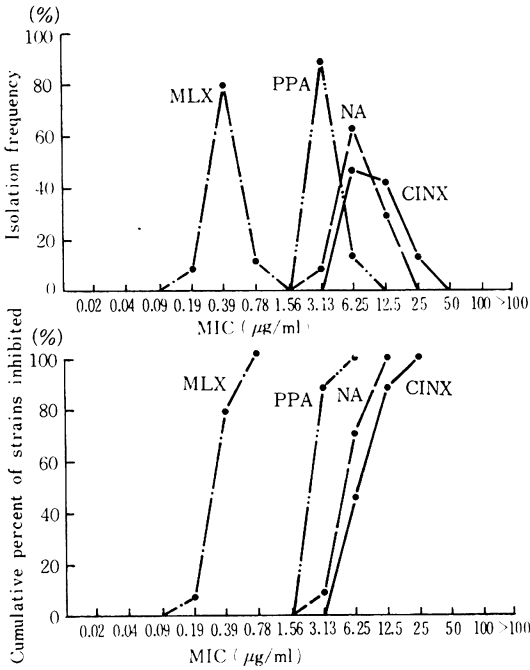


Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus mirabilis* 24 strains (10^6 cells/ml)

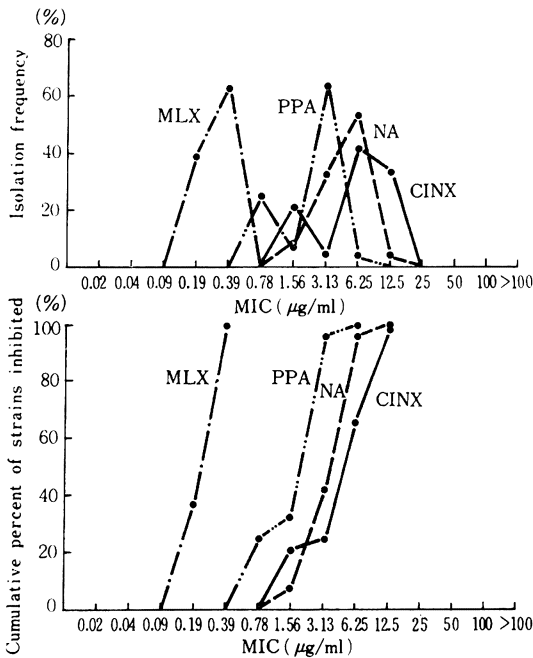


Fig. 19 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Proteus mirabilis* 24 strains

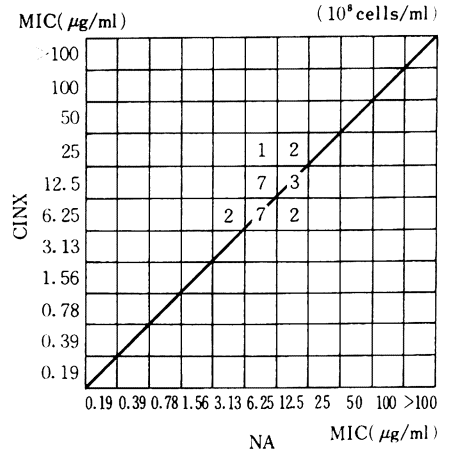


Fig. 20 Correlogram of MICs between CINX and PPA. *Proteus mirabilis* 24 strains

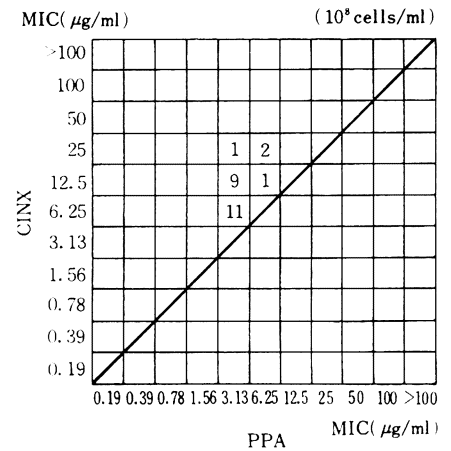


Fig. 21 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Proteus mirabilis* 24 strains

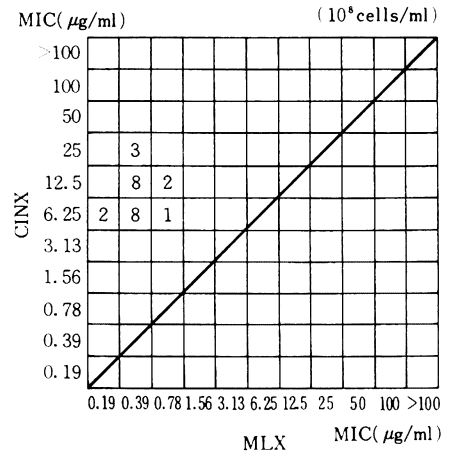


Fig. 22 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus vulgaris* 25 strains (10^8 cells/ml)

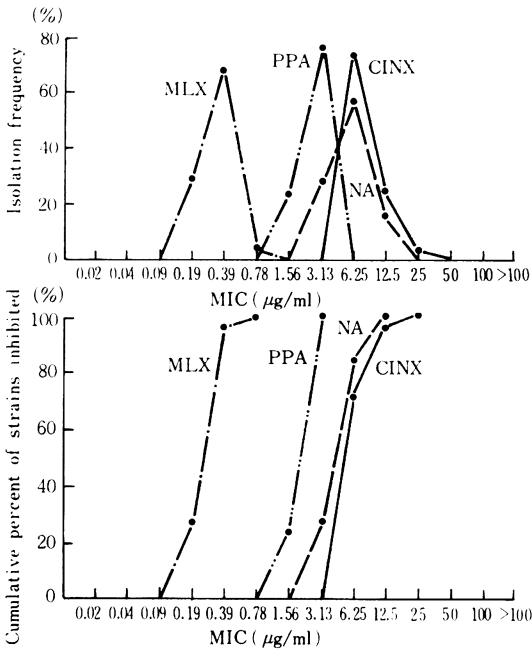


Fig. 23 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus vulgaris* 25 strains (10^6 cells/ml)

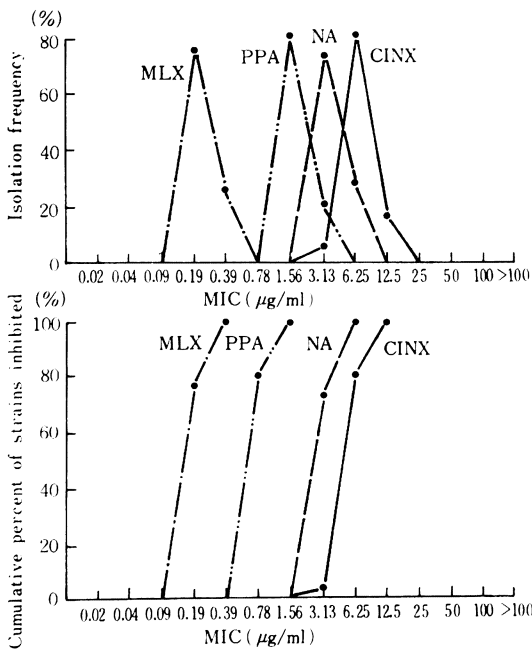


Fig. 24 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Proteus vulgaris* 25 strains

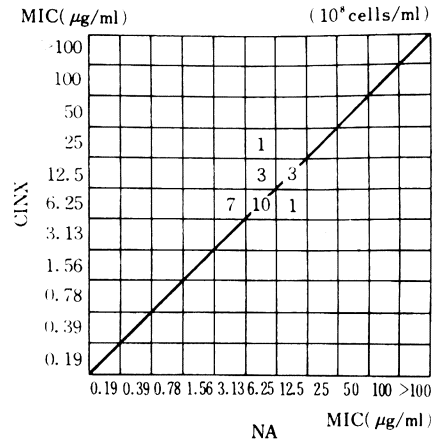


Fig. 25 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Proteus vulgaris* 25 strains

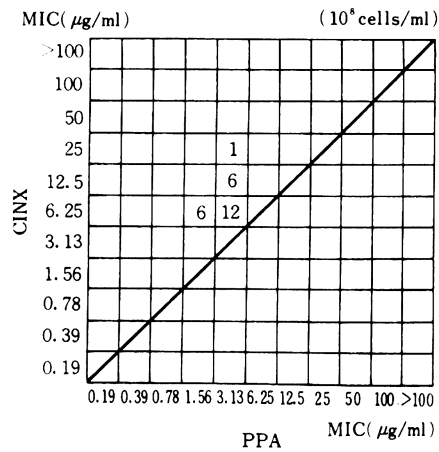


Fig. 26 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Proteus vulgaris* 25 strains

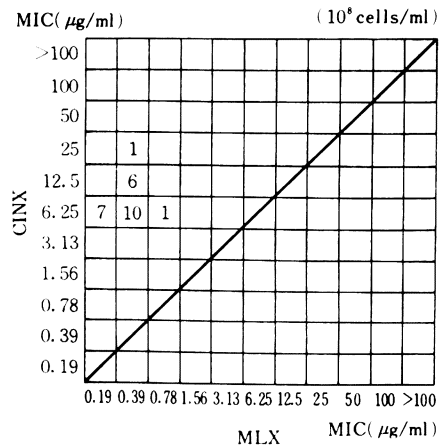


Fig. 27 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus morganii* 26 strains (10⁸ cells/ml)

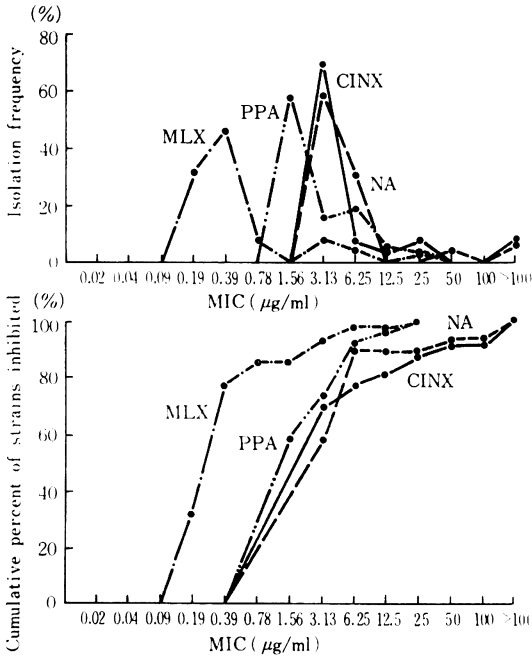


Fig. 28 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus morganii* 26 strains (10⁶ cells/ml)

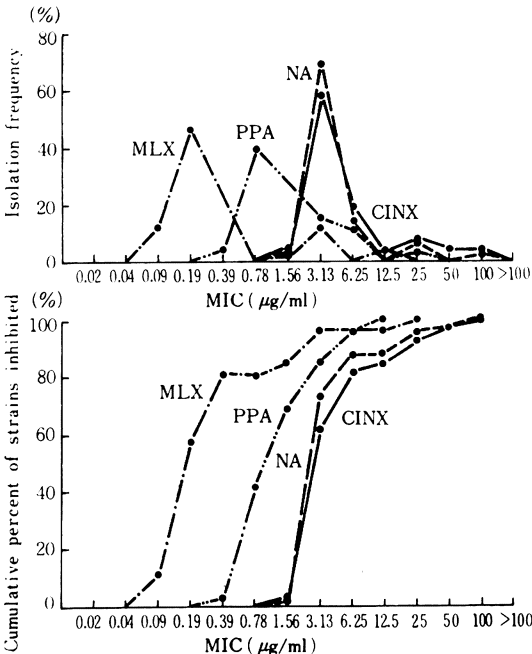


Fig. 29 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Proteus morganii* 26 strains

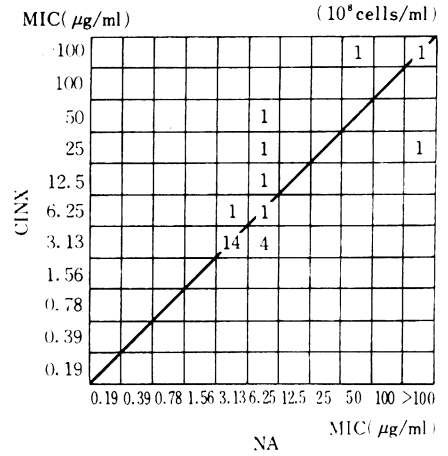


Fig. 30 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Proteus morganii* 26 strains

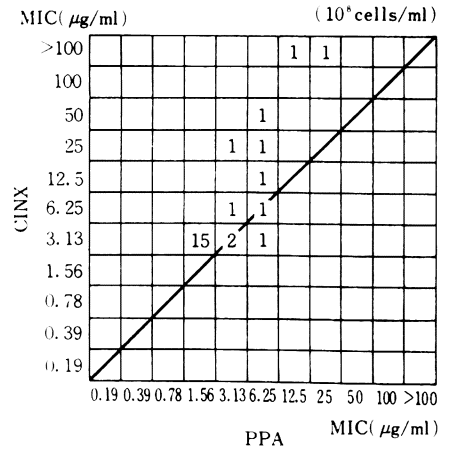


Fig. 31 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Proteus morganii* 26 strains

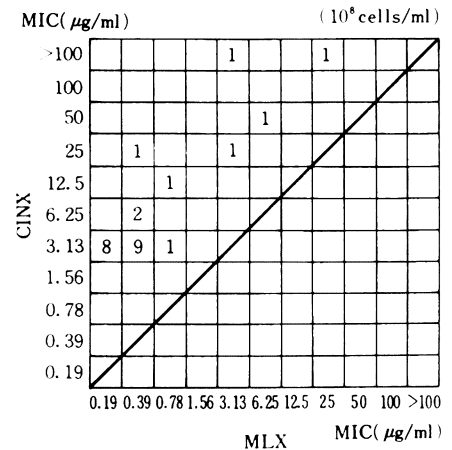


Fig. 32 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus rettgeri* 12 strains (10^8 cells/ml)

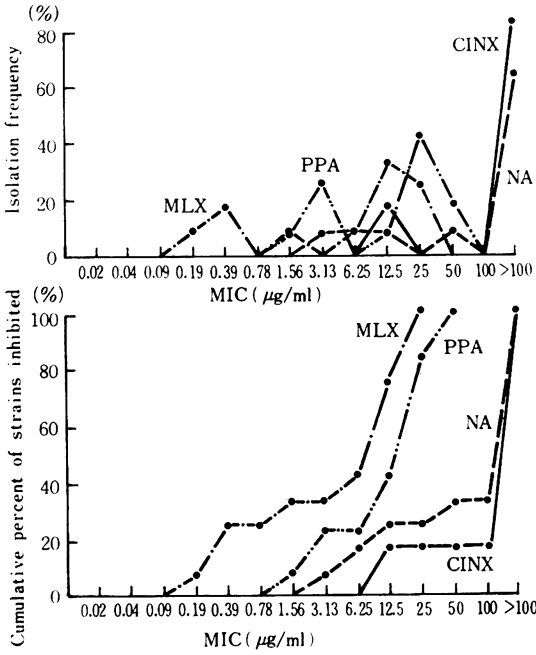


Fig. 33 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus rettgeri* 12 strains (10^6 cells/ml)

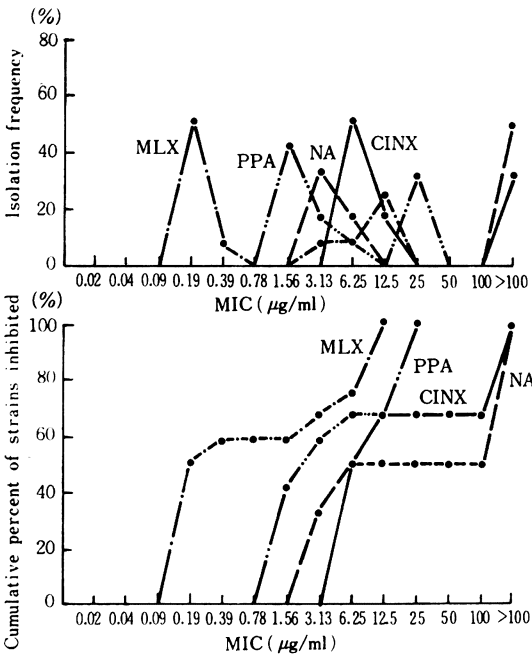


Fig. 34 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Proteus rettgeri* 12 strains

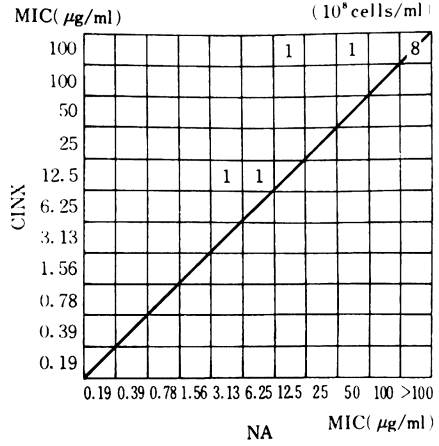


Fig. 35 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Proteus rettgeri* 12 strains

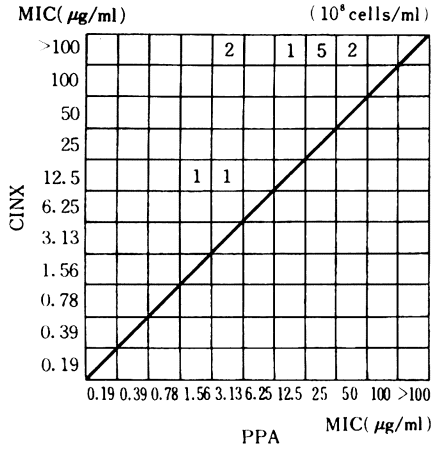


Fig. 36 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Proteus rettgeri* 12 strains

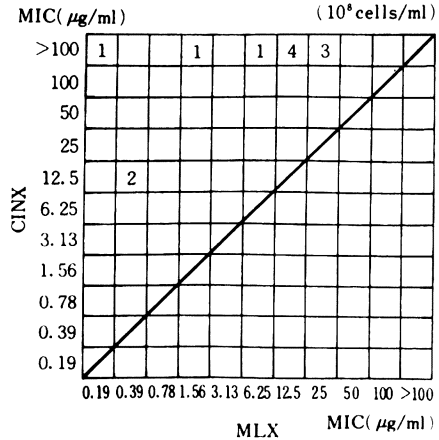


Fig. 42 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Pseudomonas aeruginosa* 51 strains (10^8 cells/ml)

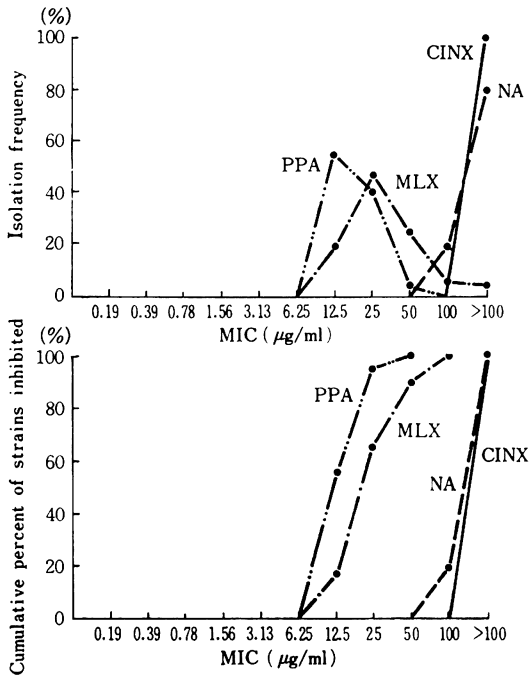


Fig. 44 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Pseudomonas aeruginosa* 51 strains

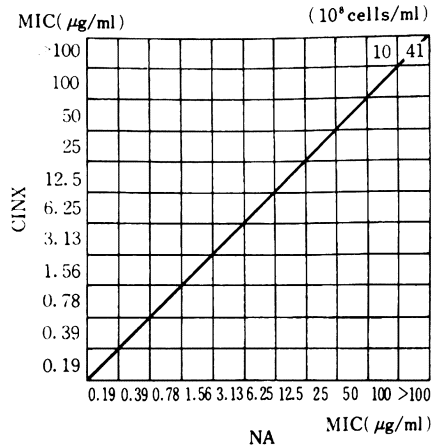


Fig. 45 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Pseudomonas aeruginosa* 51 strains

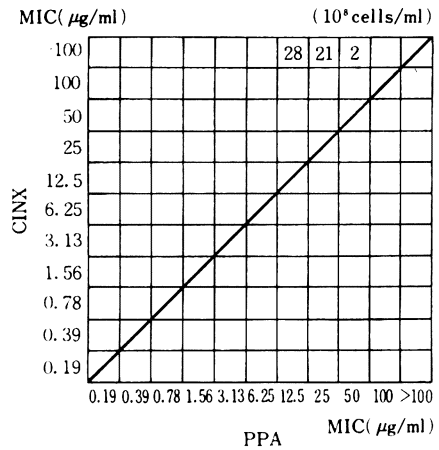


Fig. 43 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Pseudomonas aeruginosa* 51 strains (10^6 cells/ml)

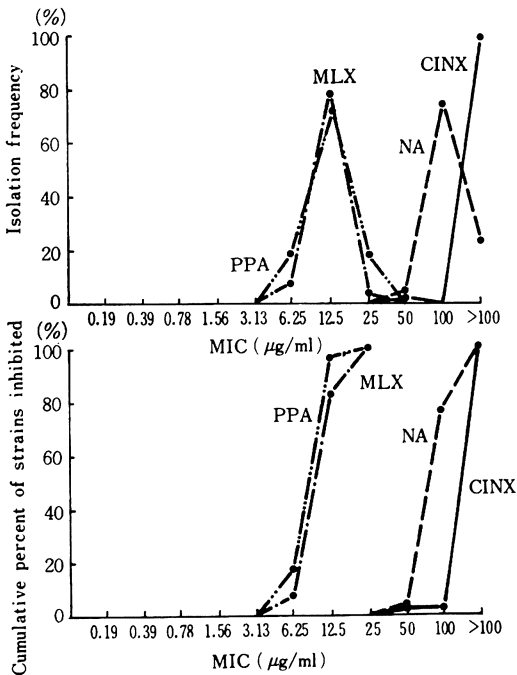


Fig. 46 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Pseudomonas aeruginosa* 51 strains

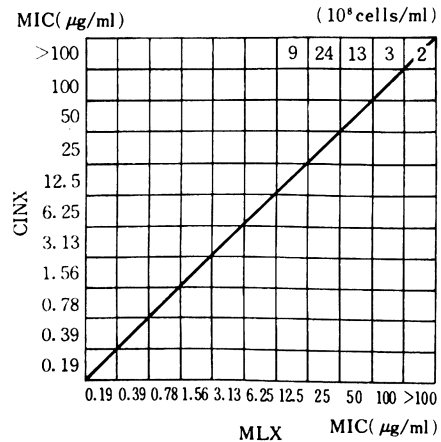


Fig. 47 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Haemophilus influenzae* 20 strains (10^8 cells/ml)

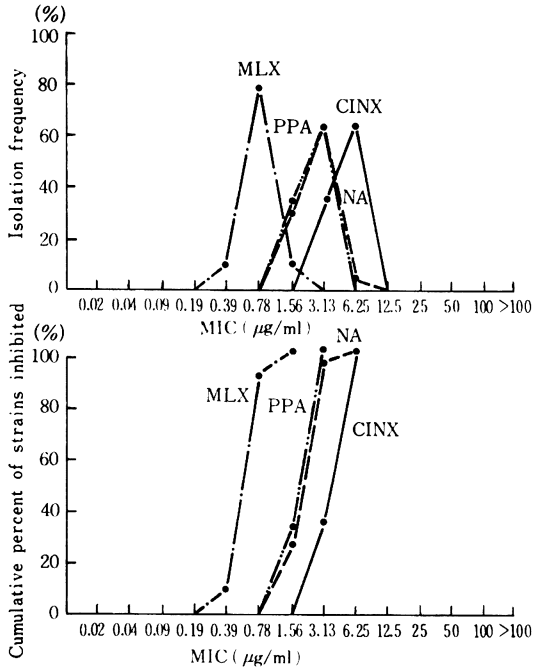


Fig. 48 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Haemophilus influenzae* 20 strains (10^6 cells/ml)

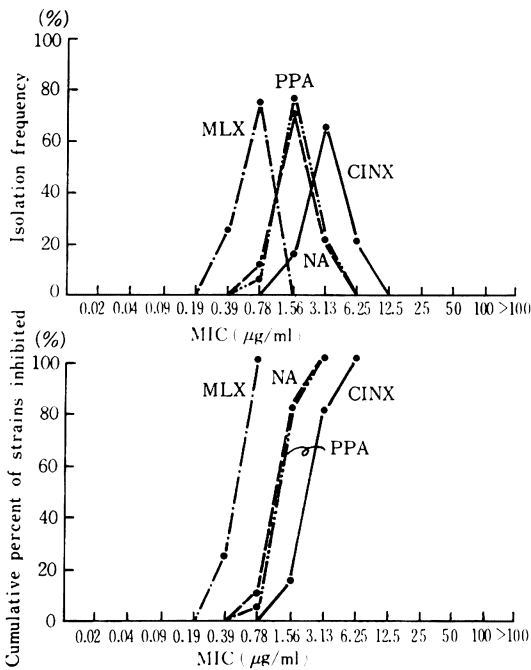


Fig. 49 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Haemophilus influenzae* 20 strains

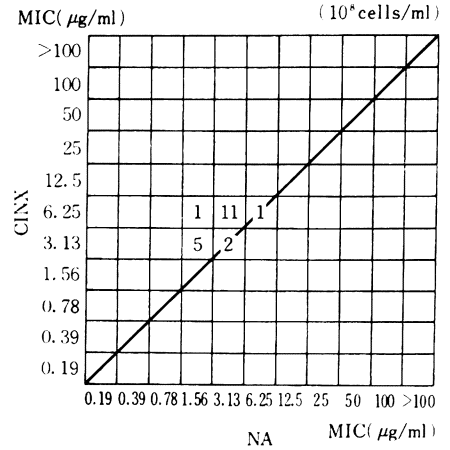


Fig. 50 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Haemophilus influenzae* 20 strains

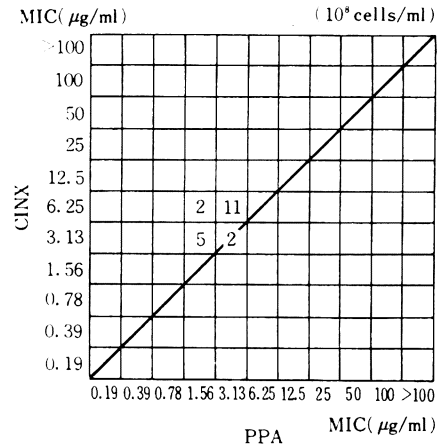


Fig. 51 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Haemophilus influenzae* 20 strains

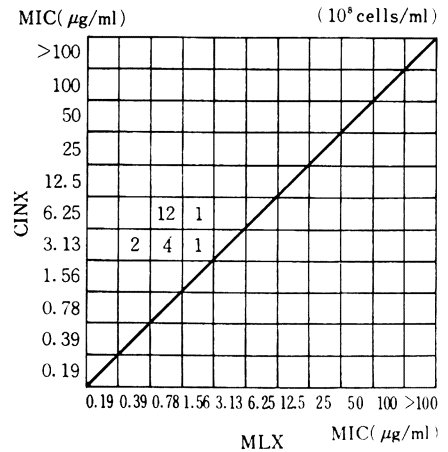


Fig. 52 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Acinetobacter calcoaceticus* 20 strains (10^8 cells/ml)

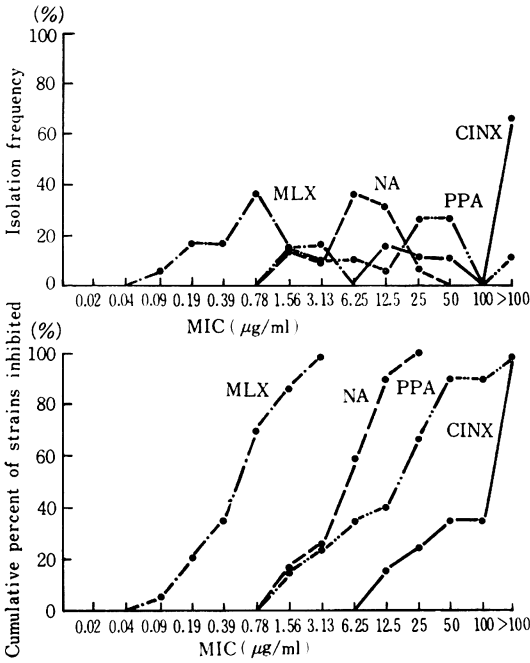


Fig. 53 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Acinetobacter calcoaceticus* 20 strains (10^6 cells/ml)

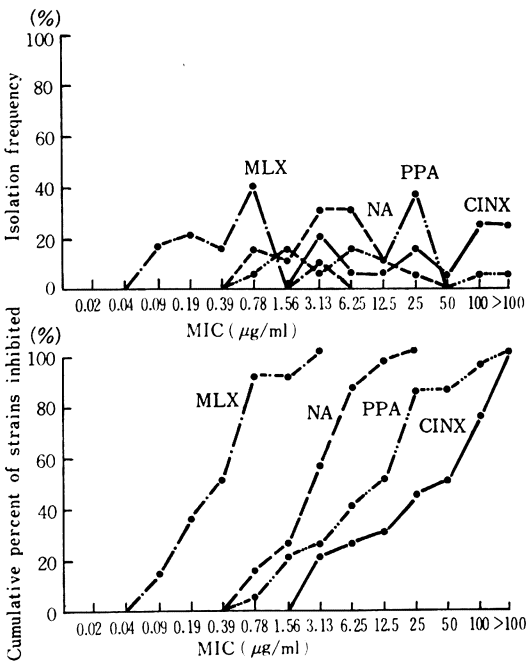


Fig. 54 Correlogram of MICs between CINX and NA: *Acinetobacter calcoaceticus* 20 strains

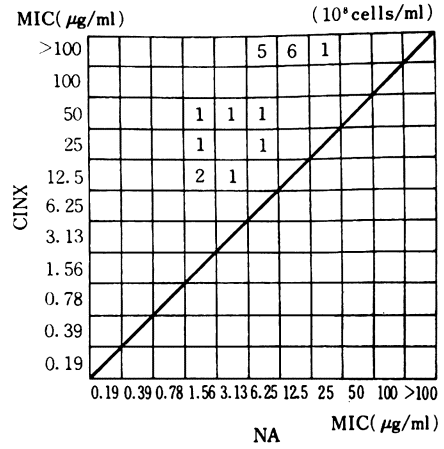


Fig. 55 Correlogram of MICs between CINX and PPA: *Acinetobacter calcoaceticus* 20 strains

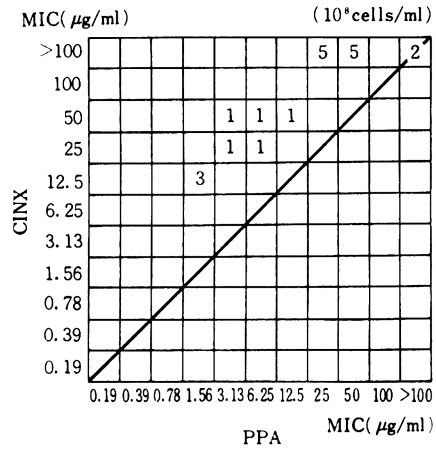


Fig. 56 Correlogram of MICs between CINX and MLX: *Acinetobacter calcoaceticus* 20 strains

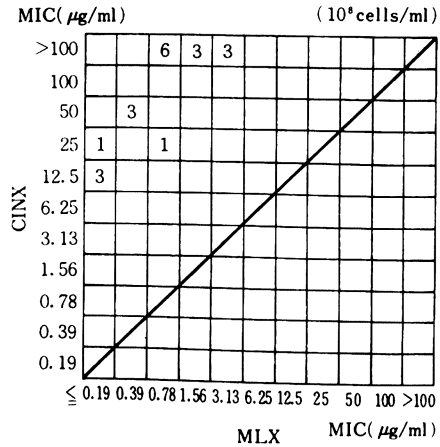


Table 3 Effect of medium pH on the antibacterial activity

Organism	Medium pH	CINX	NA	PPA	MLX
<i>E. coli</i> NIH JC-2	6.0	3.13	3.13	6.25	1.56
	7.0	3.13	6.25	3.13	1.56
	8.0	12.5	12.5	3.13	1.56
<i>K. pneumoniae</i>	6.0	1.56	0.78	12.5	0.19
	7.0	3.13	1.56	6.25	0.39
	8.0	12.5	6.25	3.13	1.56

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 4 Effect of horse serum on the antibacterial activity

Organism	Horse serum (%)	CINX	NA	PPA	MLX
<i>E. coli</i> NIH JC-2	50	12.5	12.5	1.56	1.56
	10	6.25	3.13	0.78	1.56
	0	6.25	3.13	0.78	1.56
<i>K. pneumoniae</i>	50	12.5	6.25	1.56	0.39
	10	6.25	3.13	1.56	0.39
	0	6.25	1.56	1.56	0.19

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 5 Effect of inoculum size on the antibacterial activity

Organism	Inoculum size (cells/ml)	CINX	NA	PPA	MLX
<i>E. coli</i> NIH JC-2	3.6×10^7	3.13	6.25	1.56	0.78
	3.6×10^6	3.13	3.13	1.56	0.39
	3.6×10^5	3.13	3.13	1.56	0.09
	3.6×10^4	3.13	3.13	1.56	0.09
<i>K. pneumoniae</i>	2.9×10^7	3.13	3.13	3.13	0.39
	2.9×10^6	3.13	3.13	3.13	0.19
	2.9×10^5	3.13	1.56	1.56	0.19
	2.9×10^4	0.78	0.78	1.56	0.09

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

34~36 に示すように CINX と NA では共に $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ を示す株が 8 株認められた。CINX と PPA, MLX の間に相関関係は見られなかった。

(h) *S. marcescens* の場合

10^8 cells/ml の場合は Fig. 37 に示すように CINX では $6.25 \sim >100 \mu\text{g/ml}$, NA では $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$, PPA では $0.78 \sim >100 \mu\text{g/ml}$, MLX では $0.39 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ と広く分布していた。 10^6 cells/ml の場合も Fig. 38 に示すように 10^8 cells/ml とほぼ同様であった。相関関係は Fig. 39~41 に示すように CINX と NA の間に共に $>100 \mu\text{g/ml}$ を示す株が 15 株, CINX と PPA では 4 株, CINX と MLX では 1 株認められた。

(i) *P. aeruginosa* の場合

10^8 cells/ml の場合は Fig. 42 に示すように CINX では、すべての株が $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性であり, NA では、すべての株が $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ の耐性であった。MLX では $12.5 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ に, PPA では $12.5 \sim 50$

$\mu\text{g/ml}$ に多くの株が分布した。

10^8 cells/ml の場合は Fig. 43 に示すように若干の変動は見られたが、ほぼ 10^8 cells/ml の場合と同様であった。相関関係も Fig. 44~46 に示すように CINX と NA の間で 41 株が共に $>100 \mu\text{g/ml}$ を示したが, CINX と MLX では 2 株のみが $>100 \mu\text{g/ml}$ であった。CINX と PPA では相関関係は全く認められなかった。

(j) *H. influenzae* の場合

10^8 cells/ml の場合は Fig. 47 に示すとおり CINX は $3.13 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ に, PPA, NA では $1.56 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ に, MLX では $0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ にすべての株が分布した。 10^6 cells/ml の場合は Fig. 48 に示すように大きな変動は見られず 10^8 cells/ml と同様に $\text{MLX} > \text{PPA} = \text{NA} > \text{CINX}$ の順で抗菌力が優れていた。また CINX と NA, PPA の間に相関関係が見られた (Fig. 49~51)。

(k) *A. calcoaceticus* の場合

10^8 cells/ml の場合は Fig. 52 に示すように CINX では $12.5 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に, NA は $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ に, PPA は $1.56 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に, MLX は $0.09 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ に広く分布していた。 10^6 cells/ml の場合も Fig. 53 に示すようにほぼ同様の結果が得られ, 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml の両方において $\text{MLX} > \text{NA} > \text{PPA} > \text{CINX}$ という抗菌力の優れた順序は変らなかった。また, Fig. 54~56 に示すように, 相関関係は CINX と NA, MLX の間に認められなかったが, CINX と PPA の間に共に $>100 \mu\text{g/ml}$ の感受性を示す株が 2 株見られた。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

E. coli NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1 を用いて抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加, 接種菌量の影響について検討した結果を Table 3~5 に示した。す

Fig. 57 Effect of CINX on viability of *E. coli* NIH JC-2

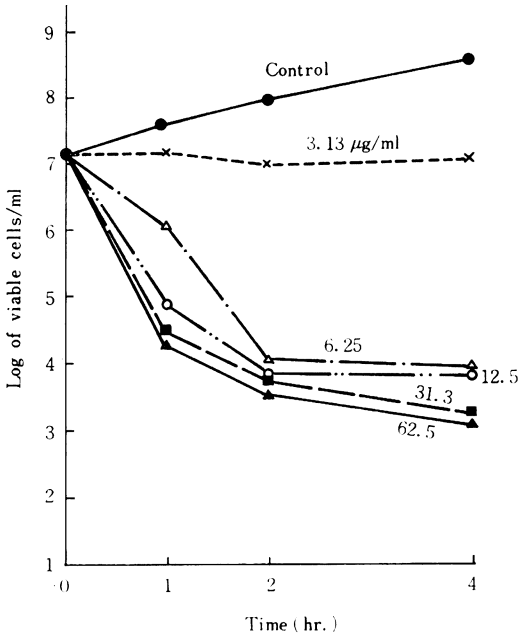


Fig. 58 Effect of NA on viability of *E. coli* NIH JC-2

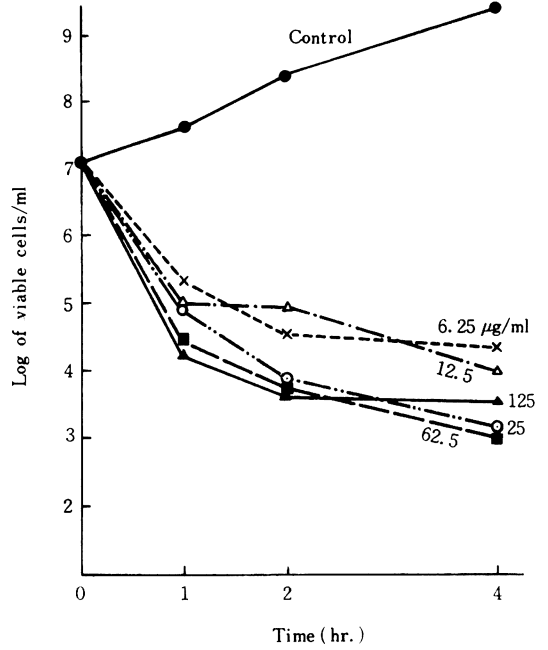


Fig. 59 Effect of MLX on viability of *E. coli* NIH JC-2

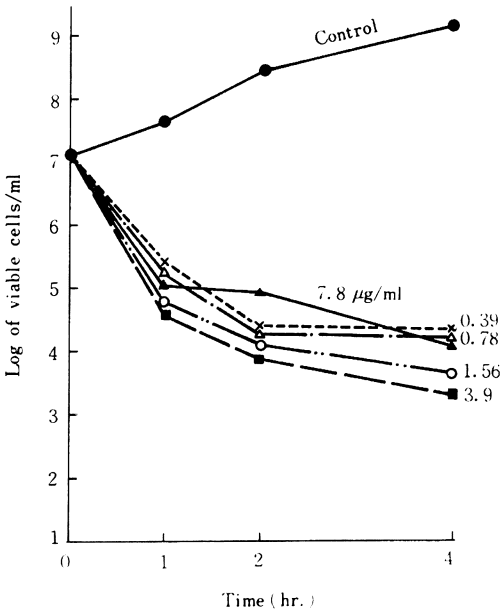


Fig. 60 Effect of PPA on viability of *E. coli* NIH JC-2

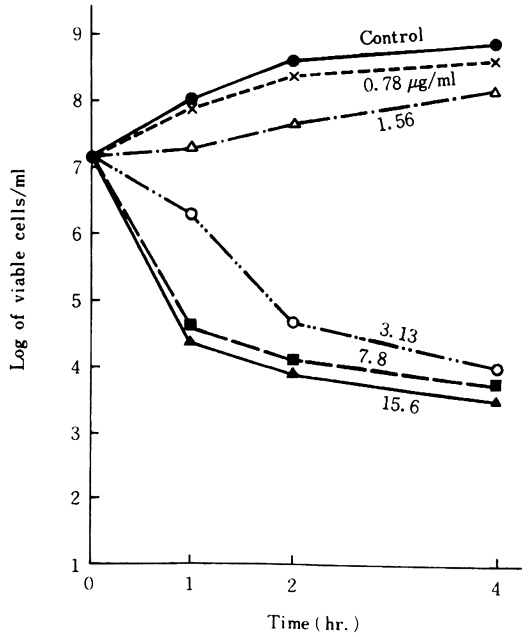


Fig. 61 Effect of CINX on viability of *K. pneumoniae* KC-1

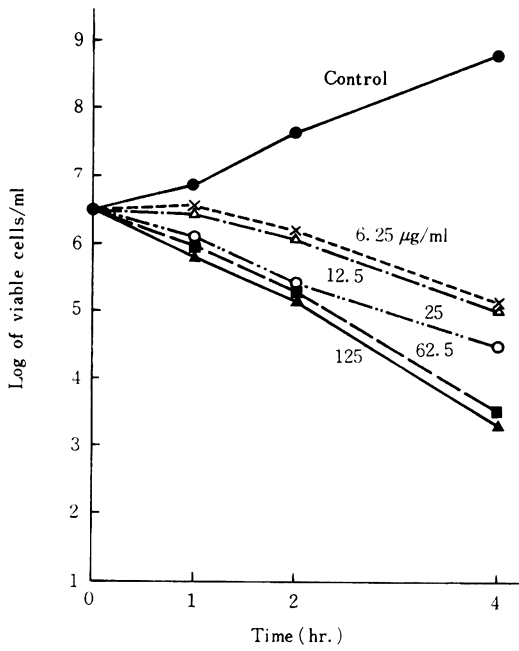


Fig. 62 Effect of NA on viability of *K. pneumoniae* KC-1

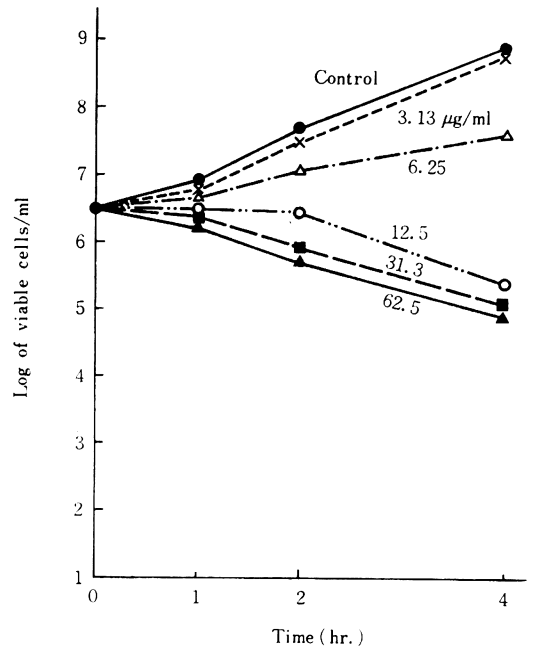


Fig. 63 Effect of PPA on viability of *K. pneumoniae* KC-1

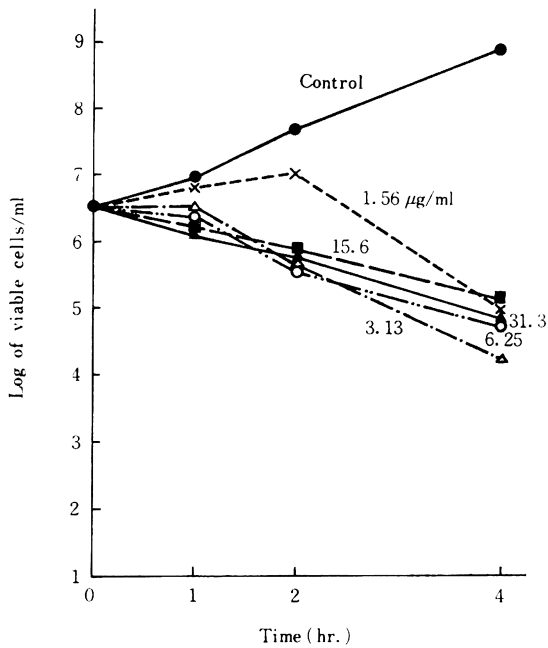


Fig. 64 Effect of MLX on viability of *K. pneumoniae* KC-1

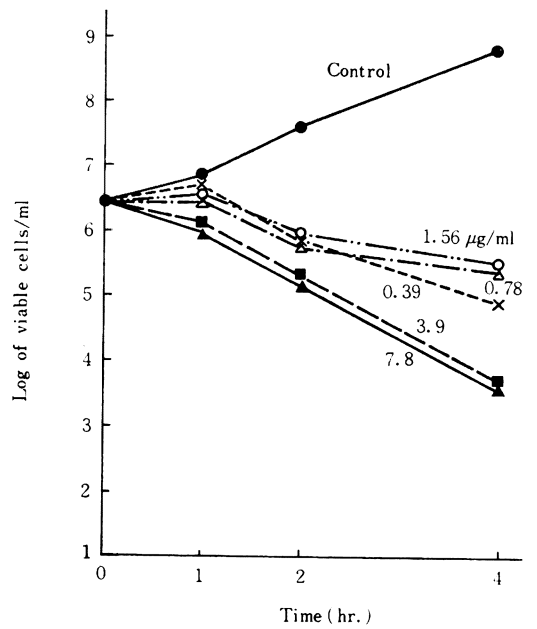


Fig. 65 Effect of CINX and NA on viability of *P. aeruginosa* E-2

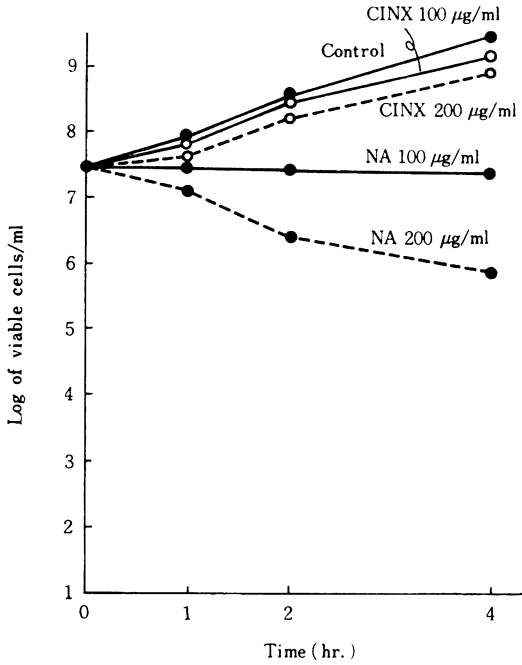


Fig. 66 Effect of PPA on viability of *P. aeruginosa* E-2

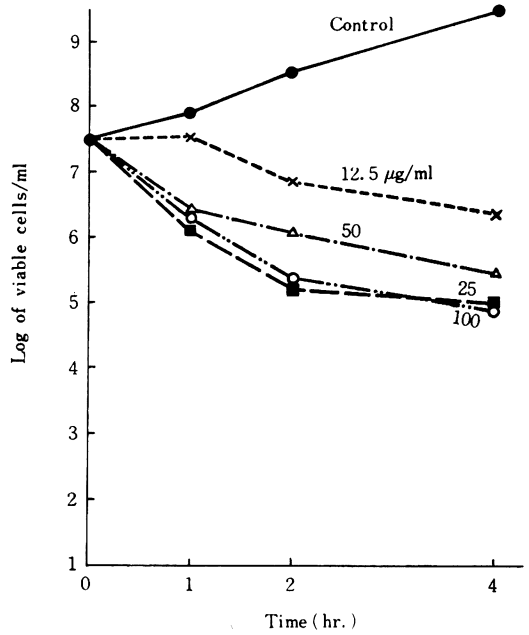
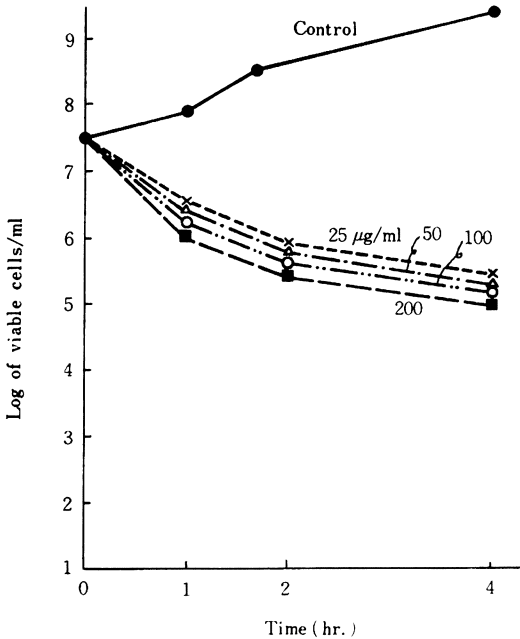


Fig. 67 Effect of MLX on viability of *P. aeruginosa* E-2



なわち培地 pH の影響では CINX, NA および MLX では酸性側で抗菌力がやや高まる傾向にあった。しかし PPA の場合、アルカリ側で抗菌力が良くなった。馬血清添加の場合 4 剤ともあまり大きな影響を受けなかった。また接種菌量では、菌量が多くなって 4 剤ともほとんど影響を受けなかった。

4. 増殖曲線に及ぼす影響

(a) *E. coli* NIH JC-2 について

大腸菌の増殖曲線に及ぼす影響は Fig. 57~60 に示すように CINX では MIC 濃度 (最小発育阻止濃度) 以上で殺菌性が見られたが, NA, MLX では MIC 濃度の 1/2 でも殺菌性が見られた。また PPA では MIC 濃度の 2 倍から殺菌性が見られた。また NA や MLX の高濃度で反転現象 (EAGLE's effect) が見られた。

(b) *K. pneumoniae* KC-1 について

Fig. 61~64 に示すように CINX, PPA, MLX では MIC 濃度 (12.5 µg/ml) の 1/2 でも殺菌性が見られ, NA では MIC 濃度 (6.25 µg/ml) の 2 倍から殺菌性が認められた。また PPA, MLX の一部の濃度で EAGLE's effect を認めた。

(c) *P. aeruginosa* E-2 について

Fig. 65~67 に示すように, CINX では 200 µg/ml の作用時にも殺菌性は見られず, NA では 200 µg/ml で

Photo. 1 Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* K-12
CINX : 3.13 $\mu\text{g/ml}$

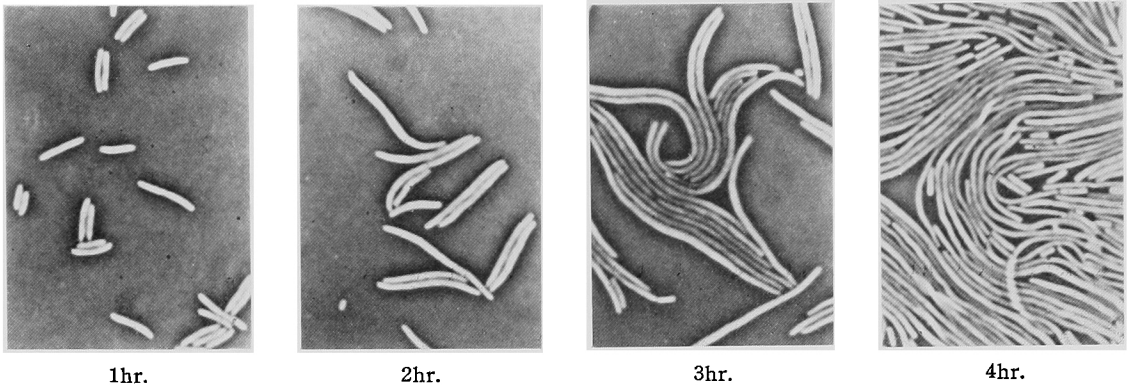


Photo. 2 Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* K-12
CINX . 6.25 $\mu\text{g/ml}$

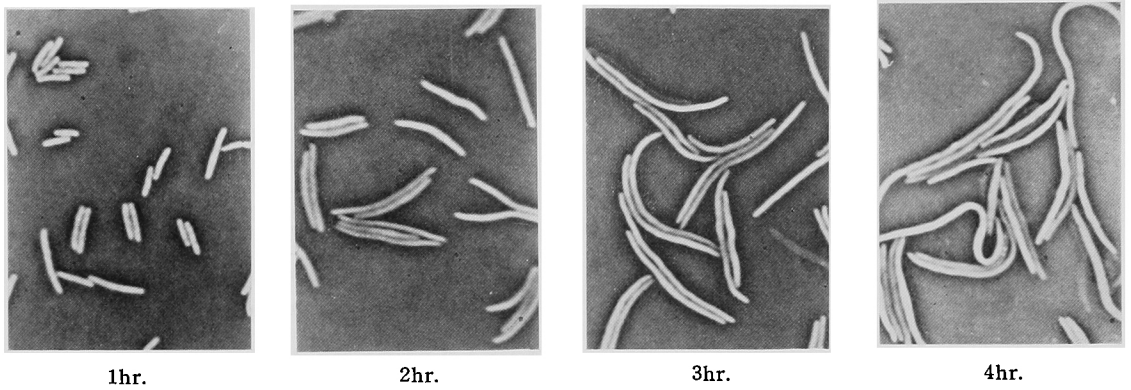


Photo. 3 Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* K-12
CINX 31.25 $\mu\text{g/ml}$

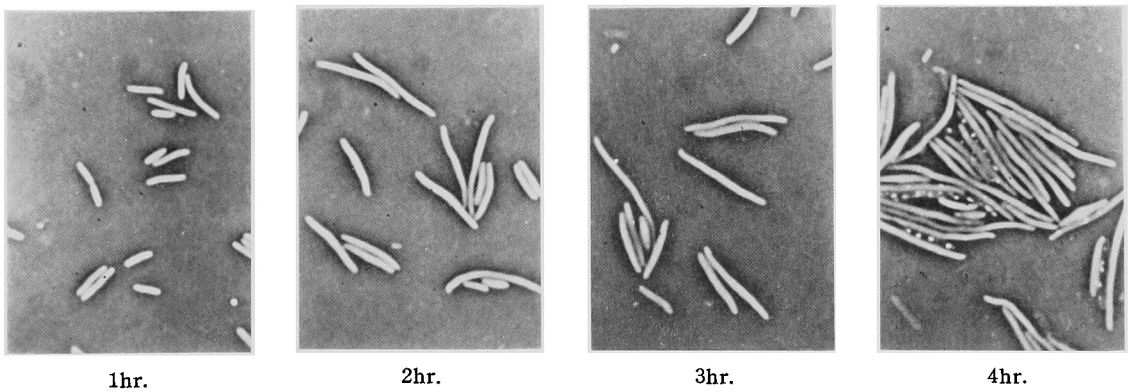


Table 6 Protecting effect of CINX, NA, PPA and MLX against experimental *Escherichia coli* KC-14 infection in mice

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse)
	10 ⁵	10 ⁶		
CINX	6.25	6.25	8.0 × 10 ⁴ (260 LD ₅₀)	0.36 (0.28-0.46)
NA	12.5	6.25		0.27 (0.21-0.34)
PPA	1.56	1.56		0.50 (0.29-0.76)
MLX	0.78	0.78		0.15 (0.11-0.19)

() : 95% confidence limits

Table 7 Protecting effect of CINX, NA, PPA and MLX against experimental *Klebsiella pneumoniae* infection in mice

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse)
	10 ⁵	10 ⁶		
CINX	12.5	6.25	8.8 × 10 ⁸ (430 LD ₅₀)	2.60 (1.97-3.43)
NA	6.25	3.13		3.00 (2.31-3.90)
PPA	3.13	1.56		2.80 (2.07-3.78)
MLX	0.78	0.39		0.98 (0.80-1.21)

() : 95% confidence limits

Table 8 Protecting effect of CINX, NA, PPA and MLX against experimental *Serratia marcescens* T-55 infection in mice

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse)
	10 ⁵	10 ⁶		
CINX	12.5	6.25	5.0 × 10 ⁶ (300 LD ₅₀)	1.10 (0.63-1.93)
NA	3.13	1.56		0.80 (0.55-1.16)
PPA	1.56	0.78		0.32 (0.11-0.90)
MLX	1.56	0.78		0.38 (0.24-0.60)

() : 95% confidence limits

Table 9 Protecting effect of CINX, NA, PPA and MLX against experimental *P. aeruginosa* E-2 infection in mice

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse)
	10 ⁵	10 ⁶		
CINX	>100	>100	1.1 × 10 ⁹ (23 LD ₅₀)	11.58(5.03-26.63)
NA	>100	100		6.02(3.17-11.44)
PPA	25	12.5		5.20(1.73-15.60)
MLX	50	12.5		1.66(0.98- 2.82)

() : 95% confidence limits

弱い殺菌性が認められた。PPA, MLX 共に MIC 濃度 (それぞれ 12.5, 25 $\mu\text{g/ml}$) で殺菌性が見られた。

5. 形態変化の観察

CINX の 3.13, 6.25, 31.25 $\mu\text{g/ml}$ を *E. coli* K-12 に作用させた時の形態変化を位相差顕微鏡で観察したところ Photo. 1~3 に示すようにいずれの濃度においても菌の伸長化が見られたが、3.13 $\mu\text{g/ml}$ 作用時が最も顕著であった。また 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用では溶菌した細胞に顆粒様の構造が認められた。

6. マウス実験の感染症に対する治療効果

(a) *E. coli* 感染症に対する治療効果

E. coli KC-14 に対する治療効果を Table 6 に示した。すなわち CINX の ED₅₀ 値は 0.36 mg/mouse で PPA の 0.50 mg/mouse より優れていたが NA の 0.27 mg/mouse, MLX の 0.15 mg/mouse より劣っていた。

(b) *K. pneumoniae* 感染症に対する治療効果

K. pneumoniae KC-1 感染症に対する治療効果は Table 7 に示すとおりである。CINX, NA, PPA 3

剤共に治療効果は変わらず、MLX が ED₅₀ 値も 3 倍程度小さく最も効果が高かった。

(c) *S. marcescens* 感染症に対する治療効果

S. marcescens T-55 感染症に対する治療効果は Table 8 に示すように MLX=PPA>NA>CINX の順で優れていた。しかし CINX は MIC 値が NA に比べて 4 倍劣るにもかかわらず、ED₅₀ 値は NA と大きな差が認められなかった。

(d) *P. aeruginosa* 感染症に対する治療効果

P. aeruginosa E-2 感染症に対する治療効果は Table 9 に示すように CINX が最も劣っていた。NA, PPA はほぼ同等で MLX が最も優れていた。

総括および考察

米国 Eli Lilly 社で合成された新しい化学療法剤 CINX に関する細菌学的評価を既知化学療法剤 NA, PPA および MLX を比較薬として検討を行なった。その結果、本剤は *C. tetani*, *C. perfringens* などの一部のグラム陽性菌群に対して感受性を示したが、その

他のグラム陽性菌には NA, PPA 同様に無効であった。グラム陰性菌に対しては、すべての菌種について、NA とほぼ同等かまたは劣る結果が得られた。臨床分離の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* 群, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *A. calcoaceticus* に対する感受性分布について検討した結果、すべての菌種について NA と同等あるいは劣る結果が得られた。また、NA との間に相関関係が認められたが MLX とは認められなかった。抗菌力に及ぼす諸因子の影響では *E. coli*, *K. pneumoniae* にさほど大きな影響を与えなかった。

抗菌作用形式では CINX は *E. coli*, *K. pneumoniae* で最小発育阻止濃度 (MIC) 以上で殺菌性が見られたが *P. aeruginosa* に対しては 200 $\mu\text{g/ml}$ 作用時にも殺菌性は見られなかった。マウス実験的感染症に対する治療効果では *P. aeruginosa* を除く *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* については NA とほぼ同等の効果が得られた。*P. aeruginosa* については 4 剤中最も劣っていたが、MIC 値が $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性であるにもかかわらず ED_{50} 値は NA に比べて、それ程劣ってはいなかった。

このように CINX は *in vitro*, *in vivo* において NA とほぼ同等の抗菌力および治療効果を示した。しかし CINX は NA に比べて非常に高い尿中排泄が見られると報告されている¹⁴⁾。今回、私共が行なった *in vivo* の実験はすべて腹腔内感染による敗血症死によるものであり、尿路に於ける局所感染実験系の必要性があると思われた。そこで *P. mirabilis* を用いラットの上行性腎盂腎炎の実験モデルで CINX の治療効果について検討を行なったところ、CINX は NA, PPA に比べて優れた治療効果を示した。なお詳細については次報において報告¹⁵⁾するが、動物種が異なれば尿中排泄も変化する可能性もあり今後、更に多くの検討をする必要があると思われる。

文 献

1) WICK, W. E.; D. A. PRESTON, W. A. WHITE & R. S. GORDEE: Compound 64716, a new synthetic antibacterial agent. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 4(14): 415~420, 1973

2) LUMISH, R. M. & C. W. NORDEN: Cinoxacin. *In vitro* antibacterial studies of a new synthetic organic acid. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7(2): 159~163, 1975

3) KURTZ, S. & M. TURCK: Notes: *In vitro* activity of cinoxacin, an organic acid antibacterial. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7(3): 370~373, 1975

4) GIAMARELLOU, H. & G. G. JACKSON: Antibacterial activity of cinoxacin *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7(5): 688~692, 1975

5) JONES, R. N. & P. C. FUCHS: *In vitro* antimicrobial activity of cinoxacin against 2,968 clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 10(1): 146~149, 1976

6) GORDON, R. C.; L. I. STEVENS, C. E. EDMISTON, Jr. & K. MOHAN: Comparative *in vitro* studies of cinoxacin, nalidixic acid, and oxolinic acid. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 10(6): 918~920, 1976

7) MÅRDH, P.-A.; S. COLLEEN & K.-E. ANDERSSON: Studies on cinoxacin. 1. *In vitro* activity of cinoxacin, as compared to nalidixic acid, against urinary tract pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 3: 411~416, 1977

8) 中沢昭三, 中村敬子, 丹羽能子, 余公元子: 新化学療法剤 Nalidixic acid に関する細菌学的研究。 *Chemotherapy* 13: 139~145, 1965

9) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, A. MINAMI, K. NAKATA & N. KUROBE: Pipemidic acid. Its activities against various experimental infections. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 9: 569~574, 1976

10) 中沢昭三, 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: 2647~2658, 1975

11) 西野武志, 尾花芳樹, 和田美智, 故中澤昭三: 新合成化学療法剤 AB-206 に関する細菌学的評価。 *Chemotherapy* 26 (S-4): 27~40, 1978

12) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974

13) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99~113, 1949

14) HOLMES, D. H.; P. W. ENSMINGER & R. S. GORDEE: Cinoxacin: Effectiveness against experimental pyelonephritis in rats. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 6(4): 432~436, 1974

15) 後藤直正, 堀賢司, 西野武志, 谷野輝雄: ラット実験的尿路感染症モデルにおける Cinoxacin, Nalidixic acid ならびに Pipemidic acid の治療効果の検討。 *Chemotherapy* 28(S-4): 37~41, 1980

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF CINOXACIN,
A NEW SYNTHETIC ANTIMICROBIAL AGENT

TAKESHI NISHINO, NAOMASA GOTO, TAKAHARU NISHIDA,
CHIE HARAGUCHI and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cinoxacin (CINX), a new synthetic antimicrobial agent, were compared with those of nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA) and miloxacin (MLX). The following results were obtained.

1. The antibacterial activity of CINX against gram negative bacteria was similar to that of NA and inferior to those of PPA and MLX.
2. In sensitivity distribution of clinical isolates, MLX showed the strongest activity and PPA, NA and CINX followed in this order.
3. Antibacterial activity of CINX against *E. coli* and *K. pneumoniae* was not affected by addition of horse serum or inoculum size but it became stronger, as similar tendency as NA, in acidic condition of medium pH.
4. CINX showed bactericidal activity against *E. coli* and *K. pneumoniae* but not against *P. aeruginosa*.
5. In morphological study, CINX, similarly to NA, caused in *E. coli* filamentous form and lysed cells.
6. In therapeutic effect studies on experimental intraperitoneal infections caused by *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *P. aeruginosa*, CINX showed similar effect to NA.