

Cinoxacin の *in vitro* 抗菌作用

俵 勝也・吉田 正・竹間盛夫・元川清司

塩野義製薬株式会社研究所

経口用合成抗菌剤 Cinoxacin (CINX) について *in vitro* 抗菌作用を検討し以下のよう
な成績を得た。

CINX はグラム陽性球菌および緑膿菌には無効であるが、腸内細菌群を主とするグラム
陰性菌に対し強い抗菌活性を示し、その抗菌力は Nalidixic acid と同等であった。

臨床分離株に対する感受性分布を検討した結果、CINX は 10^8 cells/ml の接種菌量時
において *E. coli* の 80% を 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下で、また *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* お
よび *C. freundii* の 70% を 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下で阻止した。

抗菌力におよぼす培地種類の影響としては、特に Nutrient agar において CINX の抗
菌力が強化される傾向のあることが認められた。また CINX の抗菌力は培地 pH がアル
カリ側になると低下した。

殺菌作用について *E. coli* の生菌数におよぼす影響を検討したところ、CINX は MIC 濃
度で殺菌作用を示した。CINX の殺菌力は短時間における作用から比較すると Nalidixic
acid よりは若干すぐれていた。また *E. coli* に対し 1/4 MIC 濃度以上の作用で菌細胞
の形態変化を誘起することが認められた。

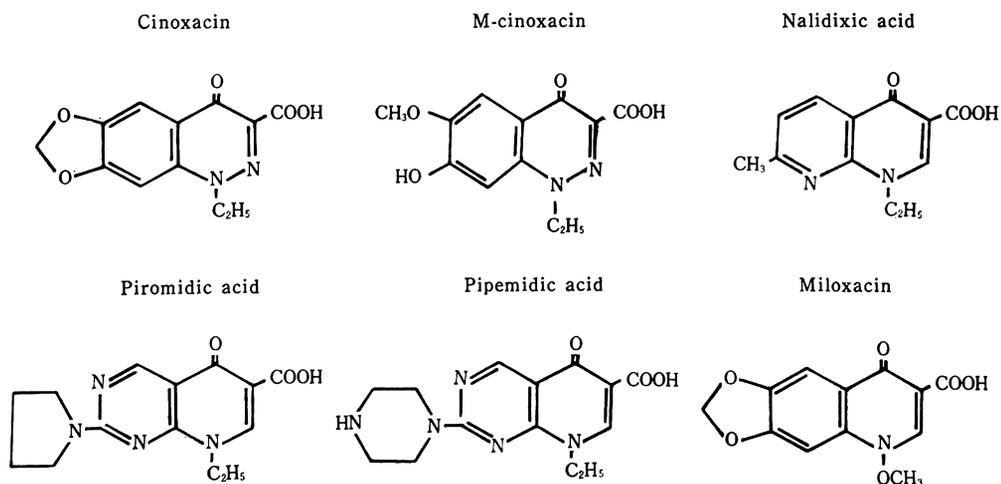
緒 言

Cinoxacin は Eli Lilly 社で開発された経口用合成抗菌剤
で Fig. 1 に示すような構造を有し、その化学名は 1-ethyl-1,
4-dihydro-4-oxo [1,3] dioxolo-[4,5-g] cinnoline-
3-carboxylic acid である。類縁の化学療法剤としては
Nalidixic acid,¹⁾ Oxolinic acid,²⁾ Piromidic acid,³⁾ Pipe-

midic acid⁴⁾ および AB-206 (Miloxacin)⁵⁾ 等が既に開発さ
れている。

Cinoxacin は腸内細菌群を主とするグラム陰性菌に有効で、
その抗菌力は Nalidixic acid と同等であることが報告⁶⁻¹¹⁾さ
れている。本報では Cinoxacin の *in vitro* 抗菌作用について
Nalidixic acid および Pipemidic acid と比較検討した成績
を報告する。

Fig. 1 Chemical structures of quinolone carboxylic acids



実験材料および方法

1. 使用薬剤

Cinoxacin (CINX, Eli Lilly 社製: Lot. No. B14-Y55-126) およびその代謝物 M-Cinoxacin (MCINX, Eli Lilly 社製: Lot. No. 498-B27-247), Nalidixic acid (NA, 第一製薬, 市販錠剤より抽出精製) および Pipemidic acid (PPA, 大日本製薬, 市販錠剤より抽出精製) をそれぞれ力価濃度で使用した。

2. 抗菌力試験

当研究所保存の標準菌株ならびに塩野義製薬株式会社臨床検査室で分離同定された臨床分離株を使用し、日本化学療法学会標準法¹²⁾に準じて MIC を測定した。増菌用培地には Trypto-soy broth (TSB, 栄研) を使用したが *Streptococci* および *Corynebacterium diphtheriae* については 5% 馬血清 (東洋血清 KK) を添加した MUELLER-HINTON broth (Difco) を使用した。感受性測定用培地には Sensitivity test agar (STA, 栄研) を使用し、*Streptococci* および *Corynebacterium diphtheriae* については同培地に 5% 馬血清を添加した。各試験菌株は増菌用培地で 37°C, 18~20 時間培養し、グラム陽性菌は 10^8 cells/ml, グラム陰性菌は 10^9 cells/ml の菌数が得られるものとし TSB で希釈してそれぞれ 10^8 cells/ml および 10^6 cells/ml の菌液を調製した。CINX および対照剤の NA, PPA はいずれも 0.1 N NaOH にて 10 mg/ml に溶解したのち水または培地を加えて希釈した。接種菌液は平板上に 1 白金耳 (約 1 μ l) を点滴接種し、37°C, 20~22 時間培養後 MIC 値を測定した。

3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

CINX の抗菌力におよぼす接種菌量, 培地 pH および馬血清添加の影響について *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* PR-4, *P. vulgaris* CN-329, *E. cloacae* ATCC 13047 および *S. aureus* 209 P JC-1 の各標準菌を試験菌とし TSB を使用した液体希釈法により NA と比較した。また培地種類の影響については同じ試験菌に対し Trypto-soy, MUELLER-HINTON, Heart infusion および Nutrient (以上すべて栄研) のそれぞれ broth または agar を用いた希釈法により NA と比較した。

さらに CINX の抗菌力におよぼす培地種類の影響について Nutrient agar (NTA), MUELLER-HINTON agar (MHA), Heart infusion agar (HIA), Sensitivity test agar (STA) および Trypto-soy agar (TSA) (以上すべて栄研) の 5 種類の培地を使用し、*E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* および *P. inconstans* の各

臨床分離株を試験菌として感受性を測定し、各培地間における感受性の累積分布の差異を NA および PPA と比較検討した。また培地 pH の影響について HIA 培地を pH を調製して使用し、*E. coli* および *P. vulgaris* の各臨床分離株を試験菌として感受性を測定し、各 pH 間における感受性分布の差異を NA, PPA と比較検討した。

4. 殺菌作用

(a) 生菌数におよぼす影響

E. coli NIHJ JC-2 を TSB にて 37°C, 18 時間前培養したのち同じく TSB にて再希釈し、さらに 2 時間静置培養して得られる 10^6 cells/ml の対数増殖期の菌液に CINX および対照剤の所定濃度の 10 倍濃度液を 1/10 容添加した。薬剤添加後は一定時間毎に各希釈系列より菌液の一部を採取し TSB にて希釈したのち HIA 培地を用いてコロニー数を測定した。なお殺菌作用の評価に際してはこの液体培地希釈系における培養 20 時間後の MIC を基準とした。

(b) 増殖曲線におよぼす影響

E. coli NIHJ JC-2 を使用し TSB にて 37°C, 18 時間前培養したのち TSB にて再希釈して 10^5 cells/ml の菌液とし、Biophotometer にて振盪培養後菌が対数増殖期途上の 10^7 cells/ml, すなわち $T=70\%$ に達した時に各薬剤の所定濃度の 100 倍濃度液を 1/100 容添加したのちの増殖曲線を記録した。なお、STA 培地を用いた希釈法により 10^7 cells/ml の接種菌量時における MIC を測定し、これを基準として殺菌作用を評価した。

5. 薬剤作用菌の形態変化

STA 培地を使用して各薬剤の 2 倍希釈系列を作製し、各濃度平板上に *E. coli* NIHJ JC-2 の対数増殖期にある 10^7 cells/ml の菌液を 1 白金耳接種してカバーガラスで被い、培養 2 時間後に位相差顕微鏡下でその形態を観察した。

6. 自然耐性菌出現頻度

E. coli, *K. pneumoniae* およびインドール陰性、陽性 *Proteus* 菌の標準菌株および臨床分離株を TSB にて 37°C, 18~20 時間前培養して得られる菌液を原液のまま、および 1/10, 1/100 に希釈した菌液とし、各菌に対する 10 MIC の薬剤濃度を含有せしめた HIA 培地上に 0.5 ml ずつ塗りひろげ、37°C, 48 時間培養したのちに生じたコロニー数を測定し、菌原液 1 ml あたりの耐性菌の出現頻度を算定した。

実験結果

1. 抗菌スペクトラム

Table 1 Antibacterial spectrum of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid
Inoculum size : 10⁶ cells/ml

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CINX	NA	PPA
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	>100	100	12.5
<i>S. aureus</i> SMITH	>100	25	12.5
<i>S. aureus</i> TERASHIMA	>100	25	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	>100	50	50
<i>S. aureus</i> ATCC 9144	>100	25	25
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	>100	50	25
<i>S. aureus</i> C-14	>100	25	100
<i>S. aureus</i> C-36	>100	50	50
<i>S. aureus</i> 077	>100	100	50
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	100	50	25
<i>B. subtilis</i> PCI 219	6.25	3.13	6.25
<i>B. anthracis</i>	6.25	6.25	6.25
<i>B. cereus</i> IFO 3001	25	12.5	12.5
<i>S. pyogenes</i> C-203*	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> I*	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> II*	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> III*	>100	>100	>100
<i>S. faecalis</i> *	>100	>100	>100
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	>100	>100	>100
<i>C. diphtheriae</i> Tront*	>100	—	12.5
<hr/>			
<i>E. coli</i> H	0.78	0.78	0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	6.25	1.56
<i>E. coli</i> mutafloa	3.13	1.56	0.78
<i>E. coli</i> ATCC 1175	3.13	3.13	1.56
<i>E. coli</i> ST-0208	3.13	3.13	1.56
<i>E. coli</i> 377	3.13	6.25	1.56
<i>E. coli</i> 73	100	>100	12.5
<i>K. pneumoniae</i>	3.13	3.13	1.56
<i>S. sonnei</i> OHARA	3.13	1.56	1.56
<i>S. flexneri</i> B ₁	3.13	6.25	1.56
<i>S. typhi</i>	3.13	1.56	1.56
<i>S. paratyphi</i> A	3.13	1.56	0.78
<i>S. typhimurium</i>	3.13	0.78	1.56
<i>C. freundii</i> IFO 12681	12.5	3.13	1.56
<i>P. mirabilis</i> PR-4	6.25	12.5	3.13
<i>P. morgani</i> Mor-9	6.25	6.25	3.13
<i>P. vulgaris</i> CN-329	6.25	3.13	1.56
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	3.13	3.13	1.56
<i>P. rettgeri</i> Ret-6	6.25	12.5	6.25
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	6.25	6.25	1.56
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	12.5	3.13	3.13
<i>P. aeruginosa</i> Denken	>100	>100	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	50	50	12.5

Medium : Sensitivity test agar (STA)

* STA with 5% horse serum

Table 2 Antibacterial spectrum of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid
Inoculum size : 10⁸ cells/ml

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CINX	NA	PPA
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	>100	100	25
<i>S. aureus</i> SMITH	>100	50	25
<i>S. aureus</i> TERASHIMA	>100	25	50
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	>100	100	100
<i>S. aureus</i> ATCC 9144	>100	50	25
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	>100	50	50
<i>S. aureus</i> C-14	>100	50	>100
<i>S. aureus</i> C-36	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> 077	>100	100	>100
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	>100	50	100
<i>B. subtilis</i> PCI 219	12.5	6.25	6.25
<i>B. anthracis</i>	12.5	6.25	6.25
<i>B. cereus</i> IFO 3001	25	12.5	50
<i>S. pyogenes</i> C-203*	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> I*	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> II*	>100	>100	>100
<i>S. pneumoniae</i> III*	>100	>100	>100
<i>S. faecalis</i> *	>100	>100	>100
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	>100	>100	>100
<i>C. diphtheriae</i> Tront*	>100	—	25
<i>E. coli</i> H	1.56	0.78	0.78
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.25	6.25	1.56
<i>E. coli</i> mutaflo	6.25	3.13	1.56
<i>E. coli</i> ATCC 1175	3.13	6.25	1.56
<i>E. coli</i> ST-0208	3.13	3.13	1.56
<i>E. coli</i> 377	6.25	6.25	1.56
<i>E. coli</i> 73	>100	>100	25
<i>K. pneumoniae</i>	3.13	3.13	3.13
<i>S. sonnei</i> OHARA	3.13	1.56	1.56
<i>S. flexneri</i> B ₁	3.13	6.25	1.56
<i>S. typhi</i>	3.13	3.13	1.56
<i>S. paratyphi</i> A	3.13	3.13	1.56
<i>S. typhimurium</i>	3.13	1.56	1.56
<i>C. freundii</i> IFO 12681	12.5	12.5	1.56
<i>P. mirabilis</i> PR-4	12.5	12.5	6.25
<i>P. morganii</i> Mor-9	6.25	6.25	3.13
<i>P. vulgaris</i> CN-329	6.25	3.13	3.13
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	6.25	3.13	3.13
<i>P. rettgeri</i> Ret-6	6.25	12.5	12.5
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	6.25	25	3.13
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	12.5	3.13	6.25
<i>P. aeruginosa</i> Denken	>100	>100	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	100	50	25

Medium : Sensitivity test agar (STA)

* STA with 5 % horse serum

Table 3 Antibacterial spectrum of the major cinoxacin metabolite

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	10^8 cells/ml	10^9 cells/ml
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	>100	>100
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	>100	>100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	>100	>100
<i>E. coli</i> ATCC 1175	>100	>100
<i>K. pneumoniae</i>	>100	>100
<i>C. freundii</i> IFO 12681	>100	>100
<i>P. mirabilis</i> PR-4	>100	>100
<i>P. vulgaris</i> CN-329	>100	>100
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	>100	>100
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	>100	>100
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	>100	>100

Medium : Sensitivity test agar (STA)

グラム陽性菌 20 株およびグラム陰性菌 23 株に対する CINX の抗菌力を NA および PPA と比較した成績は Table 1, 2 に示したとおりである。 10^8 cells/ml の接種菌量時においては CINX はグラム陽性菌のうち *Bacillus* のみに感受性を示し、その MIC 値は 12.5~25.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。*S. aureus* に対しては NA および PPA のみが比較的弱い感受性を示した。

CINX は大部分のグラム陰性菌に対して強い抗菌活性を示した。各菌種毎の MIC 値をみると *E. coli* に対しては臨床由来の耐性菌を除いて 1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$, *K. pneumoniae* に対し 3.13 $\mu\text{g/ml}$, *Shigella* および *Salmonella* に対し 3.13 $\mu\text{g/ml}$, *Proteus* spp. および他の腸内細菌類に対しては 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。*P. aeruginosa* に対しては CINX は抗菌力を示さなかった。これらグラム陰性菌に対する CINX の抗菌力は NA のそれと同程度であったが PPA と比較すると 2~4 倍劣っている成績が得られた。

次に CINX の代謝物 M-Cinnoxacin (MCINX) についてグラム陽性菌 2 株, グラム陰性菌 10 株に対する抗菌力を測定した。その結果 Table 3 に示すように本代謝物は全く抗菌活性を示さなかった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床的に分離された *E. coli* 200 株, *K. pneumoniae* 195 株, *P. mirabilis* 40 株, インドール陽性 *Proteus* 112 株, *Enterobacter* 67 株, *C. freundii* 40 株, *S. marcescens* 40 株および *S. aureus* 40 株, 合計 734 株に対する CINX の感受性分布を NA および PPA と

比較した。その結果は Fig. 2~12 に示した。

(a) *E. coli* 200 株

接種菌量が 10^8 cells/ml の場合 CINX は 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する感受性の分布を示した。対照剤のうち NA は CINX と同様に 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ のピークを示したが, PPA は 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$ のピークを示した。また 10^6 cells/ml の場合 CINX および NA はともに 3.13 $\mu\text{g/ml}$ のピークを示したのに対し PPA は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 2)。

(b) *K. pneumoniae* 195 株

接種菌量が 10^8 cells/ml の場合, CINX および NA はともに 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ の感受性ピークを示したのに対し PPA は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であった。 10^6 cells/ml の場合には CINX および NA はともに 6.25 $\mu\text{g/ml}$ のピークを示したのに対し PPA は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 3)。

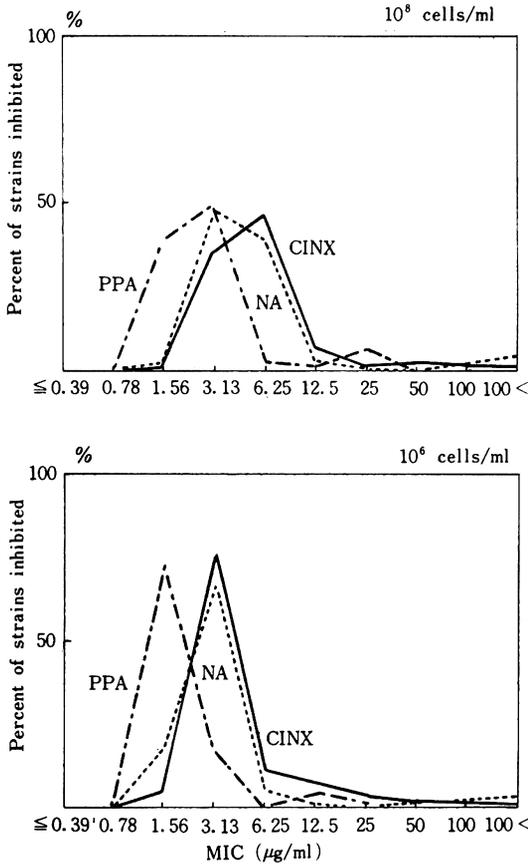
(c) *P. mirabilis* 40 株

接種菌量が 10^8 cells/ml の場合, CINX および NA の感受性ピークはともに 25 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し PPA は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。また 10^6 cells/ml の場合 CINX および NA は 12.5 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれピークを示した (Fig. 4)。

(d) インドール陽性 *Proteus* 112 株

P. vulgaris 40 株に対しては 10^8 cells/ml の接種菌量の場合 CINX の感受性のピークは 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し NA は 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。 10^6 cells/ml の場合 CINX および

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates *E. coli* (200 strains)



NA はともに 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を示した (Fig. 5)。

P. rettgeri 32 株に対しては 10^8 cells/ml の場合 CINX の感受性は 6.25~100 $\mu\text{g/ml}$ の幅広い分布を示した。これに対し NA は 3.13~50 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 1.56~25 $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれ同様に幅広い感受性の分布を示した (Fig. 6)。

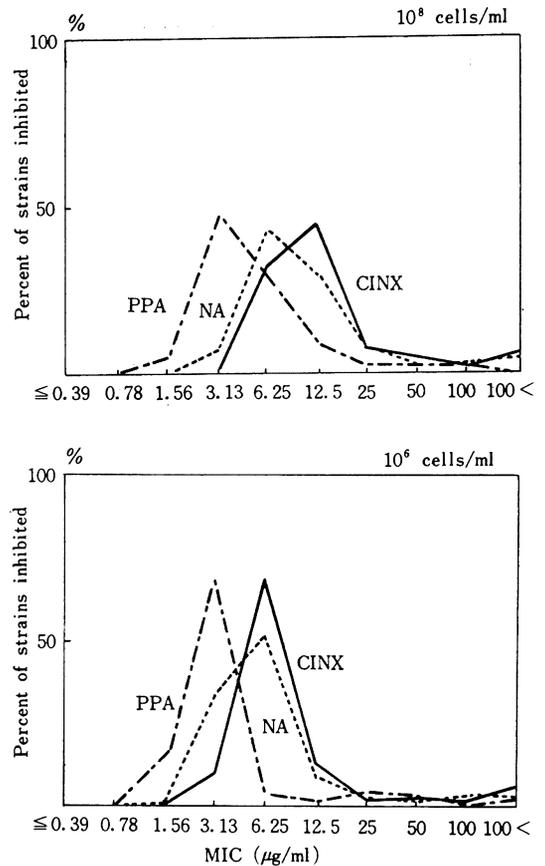
P. inconstans 40 株に対しては 10^8 cells/ml の場合 CINX は 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ の感受性のピークを示したのに対し NA および PPA はともに 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 7)。

(e) *Enterobacter* 67 株

E. aerogenes 28 株に対する CINX の感受性ピークは 10^8 cells/ml の場合 NA と同じく 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ を示したが PPA は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 8)。

E. cloacae 39 株に対して CINX は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ および 50 $\mu\text{g/ml}$ の 2 峰性のピークを示したが NA は 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 9)。

Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates *K. pneumoniae* (195 strains)



(f) *C. freundii* 40 株

10^8 cells/ml の場合 CINX の感受性ピークは 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し NA は 12.5 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を示した (Fig. 10)。

(g) *S. marcescens* 40 株

10^8 cells/ml の場合 CINX の感受性は 12.5~>100 $\mu\text{g/ml}$ の幅広い分布を示したのに対し NA は 6.25~>100 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 3.13~>100 $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれ幅広い分布を示した (Fig. 11)。

(h) *S. aureus* 40 株

10^8 cells/ml の場合 CINX は大部分の菌株に対し >100 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示した。一方 NA は 100 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 50~100 $\mu\text{g/ml}$ の感受性のピークを示した (Fig. 12)。

以上の各臨床分離株に対する感受性分布の成績から明らかのように抗菌活性では PPA が最もすぐれており CINX および NA に比べると総じて 2~4 倍強い抗菌力を示した。

CINX の各臨床分離株に対する累積感受性分布につ

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. mirabilis* (40 strains)

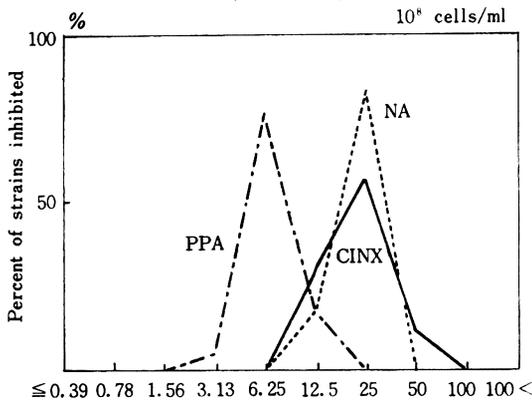
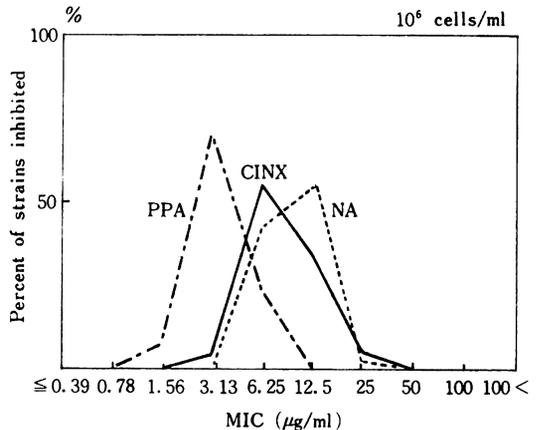
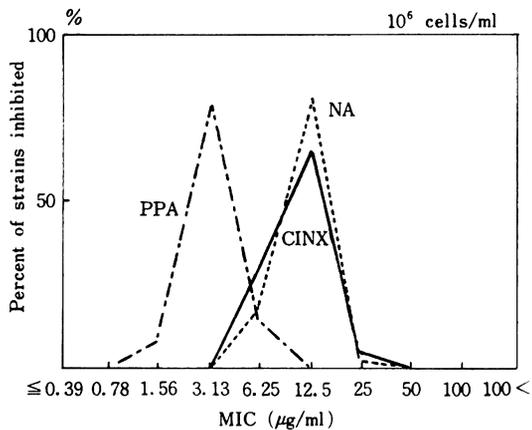
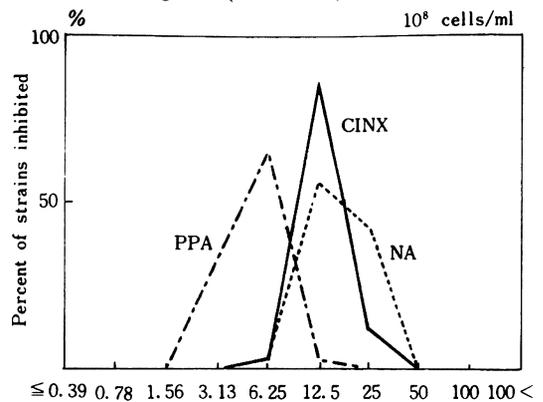


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. vulgaris* (40 strains)



いて 10^8 cells/ml の接種菌量の場合を Fig. 13 に、 10^6 cells/ml の場合を Fig. 14 にそれぞれ総括して示した。MIC 分布からみると *E. coli* が最も低濃度域にあり 80% の菌株が $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値を示した。また *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* および *C. freundii* では 70% の菌株が $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値を示した。グラム陰性菌中では *S. marcescens* の感受性が最も劣っていた。

3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

6 種の標準菌株を使用し接種菌量、培地種類、培地 pH ならびに馬血清添加の抗菌力におよぼす影響について CINX と NA とを比較した。

接種菌量の増加による抗菌力の変動については TSB を用いた液体希釈法により検討したが CINX, NA とともに一部の菌株において 1/2 程度抗菌力が低下することを認めただけで大きな影響は受けなかった (Table 4)。

培地種類の影響について液体希釈法で検討した成績では CINX の場合、培地間における抗菌力の変動が全く認められなかったのに対し、NA では一部の菌株に 2~

4 倍程度の幅で抗菌力に差異のあることが認められた。寒天希釈法で検討した成績では CINX の場合各試験菌株に対しては NTA 培地での抗菌力が最も強く、他の培地では 2~4 倍劣っていることが認められた。NA の場合には菌株毎に感受性の高い培地の種類が異なり、いずれも他の培地との間に 2~4 倍の抗菌力の変動のあることが認められた (Table 5)。

培地 pH の影響については TSB を用いた希釈により検討したが CINX および NA はともに培地 pH が 8 以上の場合には抗菌力の低下することが認められた (Table 6)。

馬血清添加の影響については同じく TSB を用いた希釈法により検討した。CINX および NA の抗菌力は 10% 添加では全く影響されないが 50% ではともに 1/2~1/4 に抗菌力の低下することが認められた (Table 7)。

次に 4 種の臨床分離株を試験菌とし、CINX, NA および PPA の抗菌力におよぼす培地種類の影響を別途に検討した。すなわち 5 種類の培地をえらび寒天希釈法に

Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. rettgeri* (32 strains)

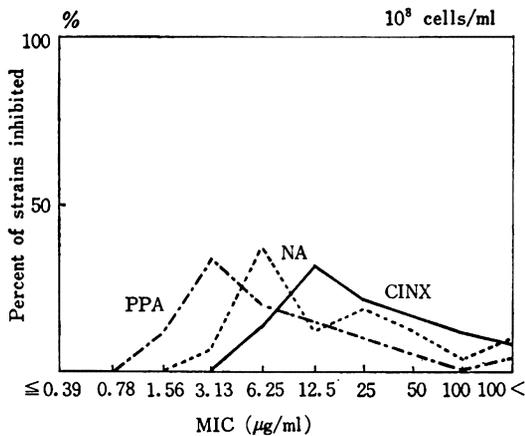


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates *P. inconstans* (40 strains)

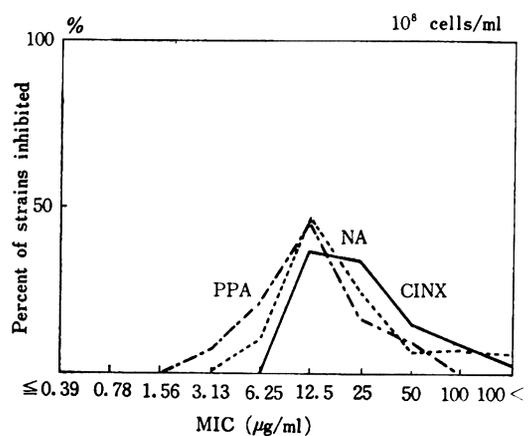


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates *E. aerogenes* (28 strains)

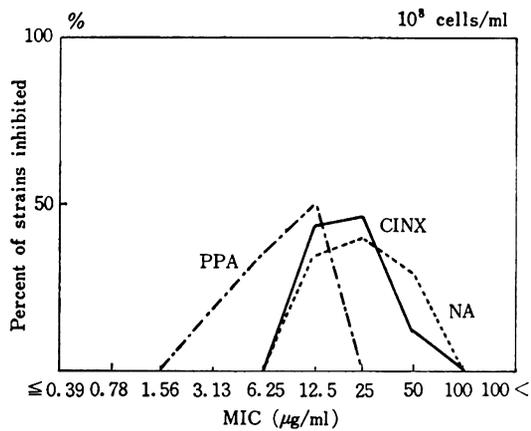


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates *E. cloacae* (39 strains)

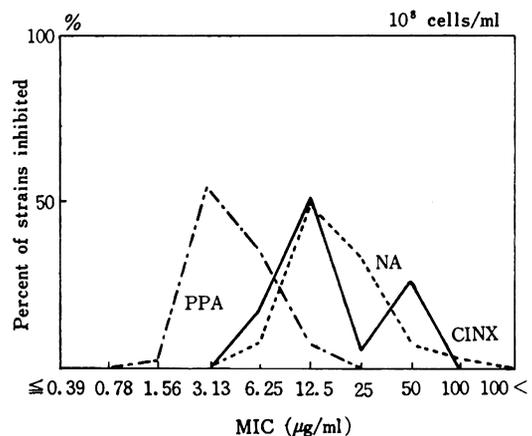


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates *C. freundii* (40 strains)

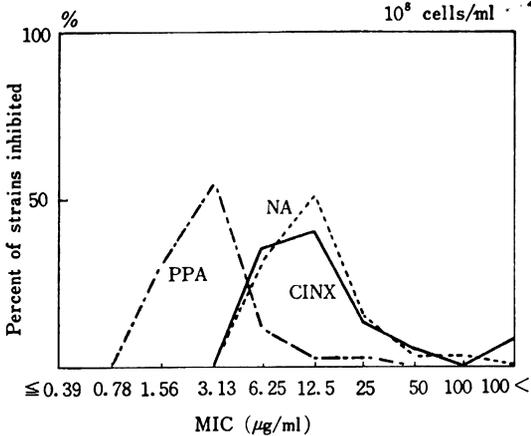


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. marcescens* (40 strains)

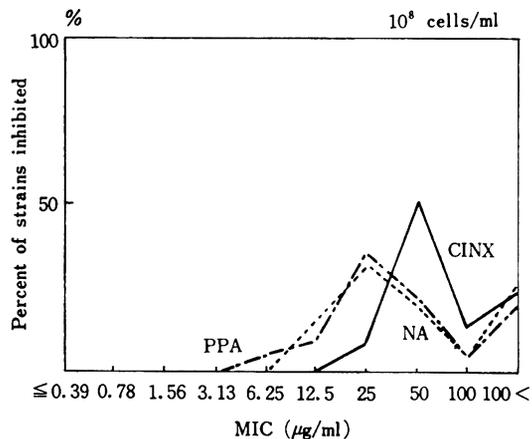
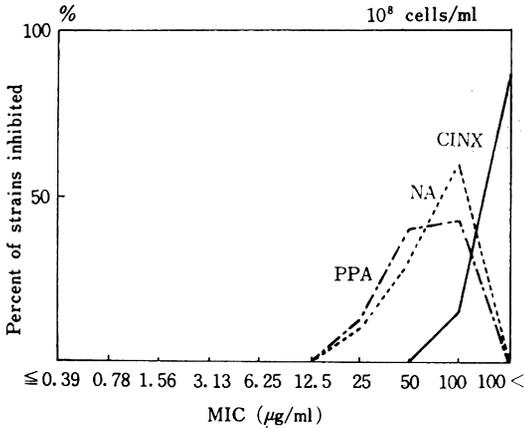


Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates *S. aureus* (40 strains)



より 10^8 cells/ml の接種菌量時における 3 剤の感受性分布をもとめ、抗菌力の順位を指標として各培地間で比較した。

E. coli 22 株においては Fig. 15 に示すように HIA 培地, STA 培地および TSA 培地を使用した場合の 3 剤の抗菌力は $PPA > CINX = NA$, MHA 培地では $PPA > NA > CINX$ の順位となりいずれも抗菌力において PPA が優位であったが, NTA 培地のみは $PPA = CINX = NA$ となり 3 剤間に抗菌力の差異が認められなかった。*P. mirabilis* 22 株の場合は Fig. 16 に示すように HIA および STA 培地において $PPA > CINX = NA$, NTA および TSA 培地において $PPA > CINX > NA$, MHA 培地において $PPA > NA > CINX$ となりいずれの培地においても PPA の抗菌力がすぐれていた。*P. vulgaris* 22 株の場合には Fig. 17 に示すように, HIA 培地では $PPA > NA = CINX$, STA 培地で

Table 4 Effect of inoculum size on antibacterial activity of cinoxacin and nalidixic acid

Organism	Broth dilution MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	CINX			NA		
	10^{4*}	10^6	10^8	10^4	10^6	10^8
<i>E. coli</i> JC-2	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25
<i>K. pneumoniae</i>	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>P. mirabilis</i> PR-4	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>P. vulgaris</i> CN-329	3.13	3.13	6.25	3.13	3.13	3.13
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	25.0
<i>S. aureus</i> JC-1	100	200	200	100	100	200

Medium : Trypto-soy broth (TSB, Eiken)

* Inoculum size : Final population in TSB

Table 5 Effect of media on antibacterial activity of cinoxacin and nalidixic acid

Organism	Agar dilution MIC ($\mu\text{g/ml}$)								Broth dilution MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	CINX				NA				CINX				NA			
	TS	MH	HI	NT	TS	MH	HI	NT	TS	MH	HI	NT	TS	MH	HI	NT
<i>E. coli</i> JC-2	3.13	12.5	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	1.56	3.13	1.56
<i>K. pneumoniae</i>	6.25	6.25	6.25	3.13	6.25	6.25	12.5	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	3.13
<i>P. mirabilis</i> PR-4	6.25	6.25	6.25	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25	25	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>P. vulgaris</i> CN-329	6.25	6.25	6.25	3.13	3.13	1.56	6.25	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047									3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> JC-1									200	200	200	200	100	50	100	200

Media : TS=Trypto-soy (Eiken)

MH=MUELLER-HINTON (Eiken)

HI=Heart infusion (Eiken)

NT=Nutrient (Eiken)

Inoculum size : 10^8 cells/ml (Final population)

Table 6 Effect of medium pH on antibacterial activity of cinoxacin and nalidixic acid

Organism	Broth dilution MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	CINX			NA		
	6.0	7.0	8.0	6.0	7.0	8.0
<i>E. coli</i> JC-2	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>K. pneumoniae</i>	1.56	3.13	6.25	0.78	1.56	3.13
<i>P. mirabilis</i> PR-4	1.56	6.25	12.5	12.5	25	25
<i>P. vulgaris</i> CN-329	1.56	1.56	12.5	3.13	3.13	6.25
<i>E. cloacae</i> ATCC 13049	6.25	3.13	12.5	6.25	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> JC-1	100	200	400	50	100	400

Medium : Trypto-soy broth (Eiken)

Inoculum size : 10^6 cells/ml (Final population)

Table 7 Effect of horse serum on antibacterial activity of cinoxacin and nalidixic acid

Organism	Broth dilution MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	CINX			NA		
	0%	10%	50%	0%	10%	50%
<i>E. coli</i> JC-2	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	25
<i>K. pneumoniae</i>	1.56	3.13	6.25	1.56	3.13	6.25
<i>P. mirabilis</i> PR-4	6.25	6.25	25	25	25	50
<i>P. vulgaris</i> CN-329	3.13	3.13	6.25	3.13	3.13	6.25
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	25
<i>S. aureus</i> JC-1	200	200	>200	100	100	>200

Medium : Trypto-soy broth (Eiken)

Inoculum size : 10^8 cells/ml (Final population)

は PPA=NA>CINX となり PPA の抗菌力がすぐれていたが NTA, MHA および TSA の各培地では PPA=NA=CINX となり 3 剤間の抗菌力に特に差異が認められなかった。 *P. inconstans* 22 株の場合には Fig. 18 に示すように STA 培地では PPA>CINX=NA となり PPA 優位の抗菌力順位を示したが, HIA 培地では PPA=CINX=NA, MHA 培地では NA>PPA=CINX となり PPA と CINX との抗菌力に差異が認められず, NTA 培地では CINX=NA>PPA, TSA 培地では NA>CINX>PPA となり CINX の抗菌力が PPA より若干優位となる結果が得られた。

以上の成績からこれら臨床分離株に対する 3 剤の抗菌力を培地間で比較した場合, STA または HIA 培地における PPA の抗菌力は概して CINX および NA よりも 2~4 倍強いという成績を示したのに対し, 他の培地では *E. coli* およびインドール陽性 *Proteus* におい

てこれら 3 剤の抗菌力順位に変化が生じ, 特に NTA 培地にその傾向が著しく, *P. inconstans* に対しては CINX の抗菌力が PPA のそれよりも若干勝っていることが認められた。

また特に CINX について培地間における抗菌力の差異を, 各臨床分離菌種ごとに感受性分布から比較すると, *E. coli* では NTA 培地, *P. mirabilis* では NTA, MHA および TSA 培地, *P. vulgaris* では NTA および MHA 培地, *P. inconstans* では NTA 培地を用いた場合が, それぞれその他の培地におけるよりも 2 倍程度すぐれた抗菌力を示す結果が得られた。

次に CINX, NA および PPA の抗菌力におよぼす培地 pH の影響について同じく臨床分離株を試験菌として使用し MIC 値のピークを指標として比較した。 *E. coli* 22 株においては Fig. 19, *P. vulgaris* 22 株においては Fig. 20 にそれぞれ示すように, CINX お

Fig. 15 Effect of media on antibacterial activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid
E. coli (22 strains)

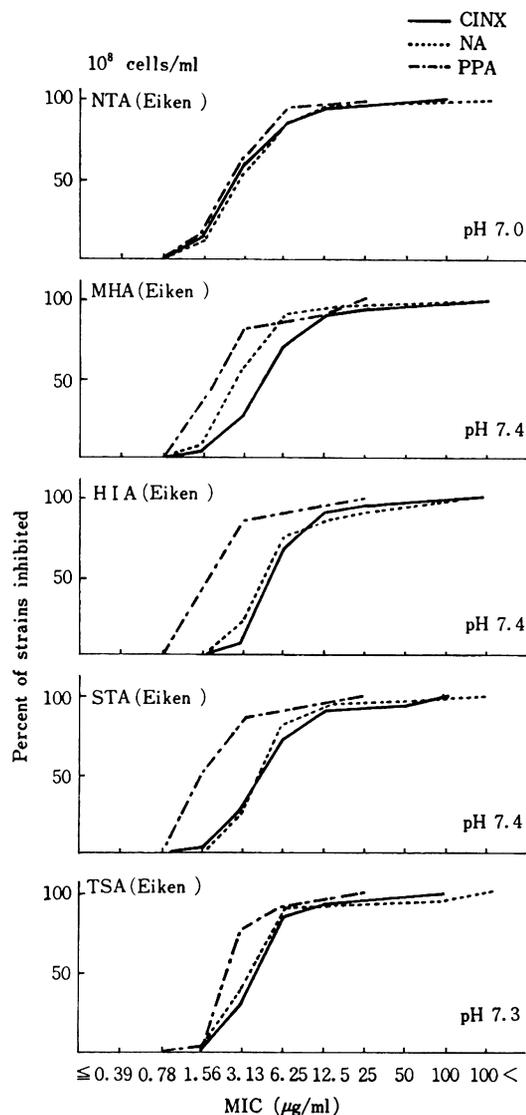
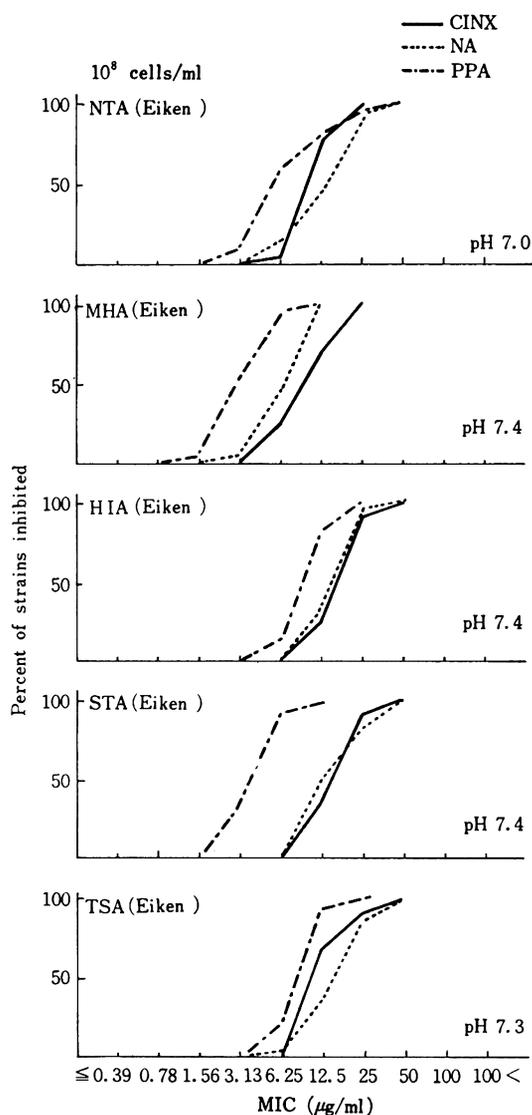


Fig. 16 Effect of media on antibacterial activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid
P. mirabilis (22 strains)



よび NA はともにアルカリ側で抗菌力が低下するのに対し、PPA では逆に酸性側で抗菌力の低下することが認められた。

4. 殺菌作用

(a) 生菌数におよぼす影響

対数増殖期の *E. coli* NIHJ JC-2 を TSB にて培養し CINX, NA および PPA を作用させた場合の殺菌作用について生菌数の変化を経時的に検討した成績は Fig. 21 に示した通りである。この液体希釈系列におけ

る各薬剤の MIC は CINX および NA がともに 12.5 µg/ml, PPA は 6.25 µg/ml であった。これらの MIC を基準として各薬剤の殺菌作用を比較すると、CINX の場合 4 MIC 濃度では約 2 時間後、2 MIC および MIC 濃度では 4 時間後にいずれも殺菌率が 99.9% に達し再増殖は認められなかった。また 1/2~1/4 MIC 濃度においては 4 時間まで生菌数が減少したが 6 時間以後には再増殖が認められた。NA では 4~2 MIC 濃度および MIC 濃度において 4 時間後に殺菌率が

Fig. 17 Effect of media on antibacterial activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid *P. vulgaris* (22 strains)

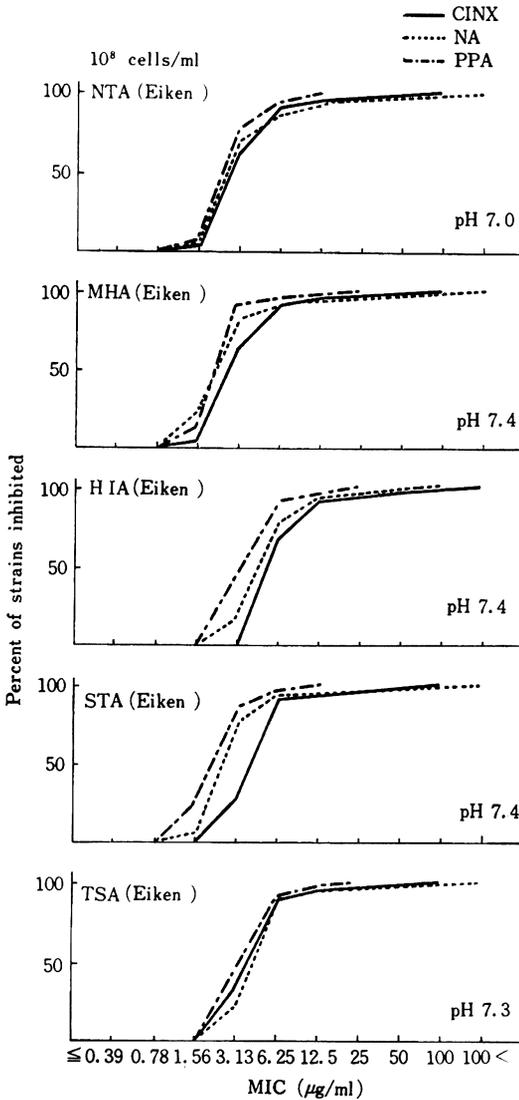
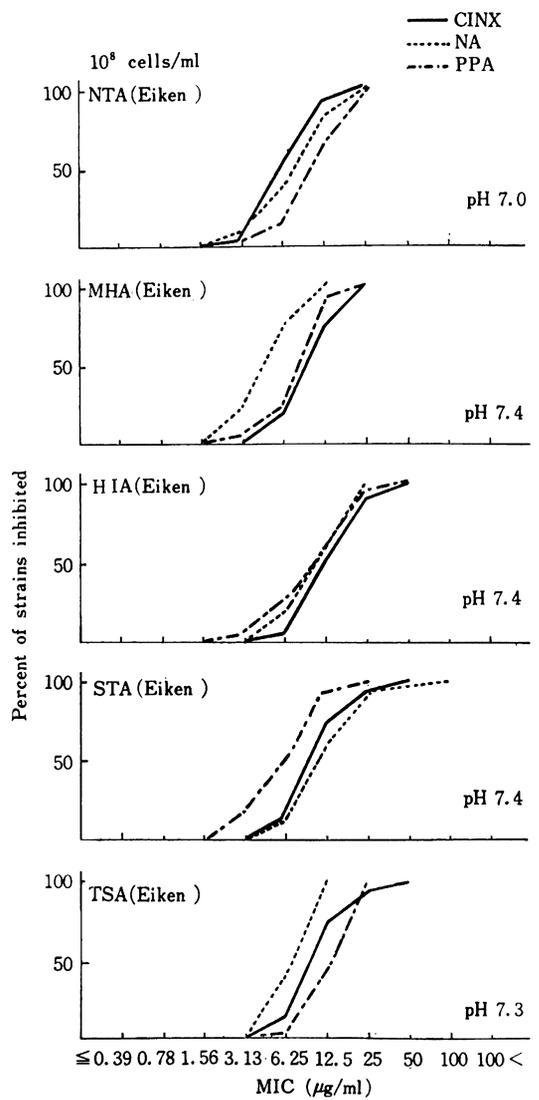


Fig. 18 Effect of media on antibacterial activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid *P. inconstans* (22 strains)



99.9% に達し再増殖は認められなかった。また 1/2 MIC 濃度では 6 時間まで生菌数の減少が認められた。 PPA の場合には 4 MIC 濃度では約 2 時間ではほぼ 99.9%， 2 MIC 濃度では 4 時間， MIC 濃度では 6 時間後にいずれも 99.9% 以上の殺菌率を示し， 1/2 MIC 濃度では 6 時間まで生菌数が減少した。

(b) 増殖曲線におよぼす影響

Biophotometer を使用し， *E. coli* NIHJ JC-2 の TSB 培地における対数増殖期途上に各薬剤を添加して

増殖曲線に対する影響を検討した結果は Fig. 22 に示したとおりである。増殖曲線の推移を基準 MIC から比較すると CINX (MIC=3.13 µg/ml) 添加後の増殖曲線は 25 µg/ml， すなわち 8 MIC 濃度以上によって降下を示し再増殖は認められなかった。これに対し CINX と同じ MIC 値を示した NA では 50 µg/ml， すなわち 16 MIC 濃度， また PPA (MIC=1.56 µg/ml) では 12.5 µg/ml， すなわち 8 MIC 濃度以上の添加によってそれぞれ増殖曲線の降下することが認められた。

Fig. 19 Effect of medium pH on antibacterial activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid *E. coli* (22 strains)

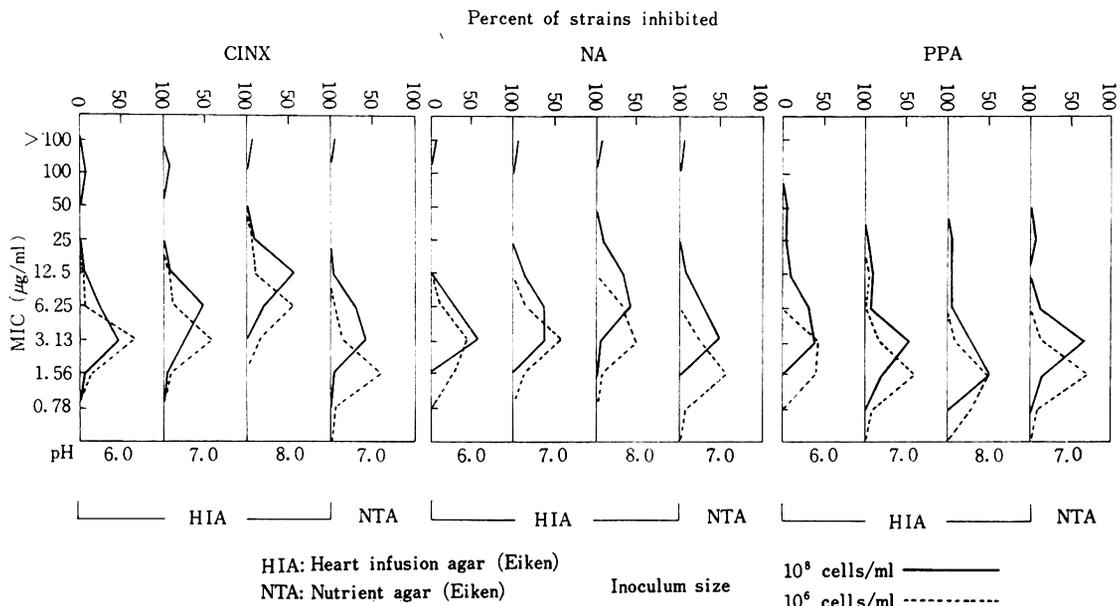
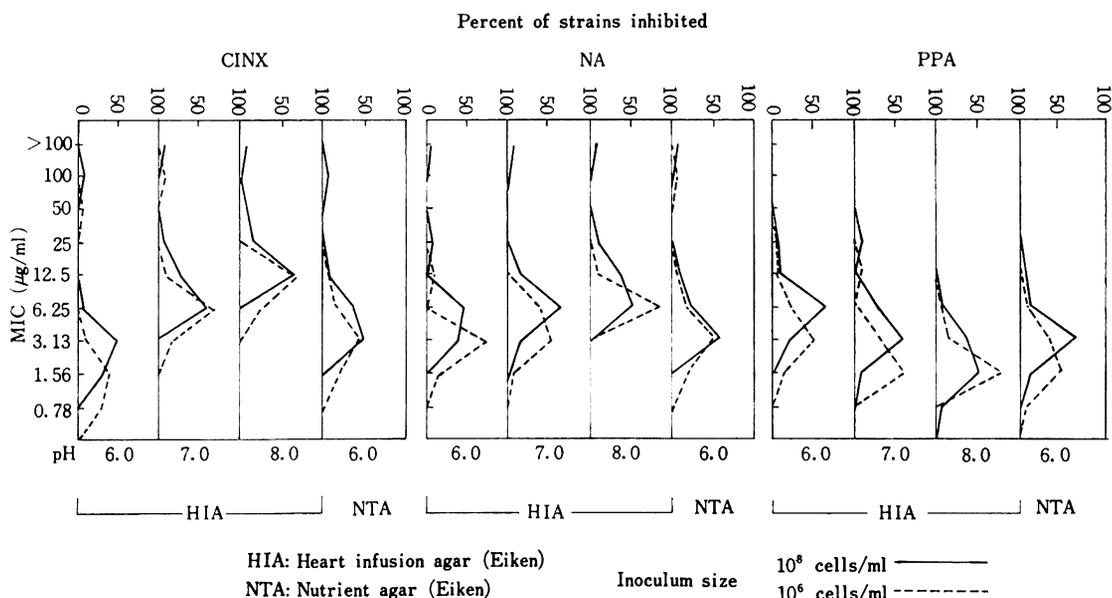


Fig. 20 Effect of medium pH on antibacterial activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid *P. vulgaris* (22 strains)



5. 薬剤作用菌の形態変化

CINOX, NA および PPA を *E. coli* NIHJ JC-2 に対し STA 培地上で 50~0.39 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 2 時間作用させた場合の形態変化を位相差顕微鏡下で観察し

た。Photo 1, 2 に示すようにこれら 3 剤の作用によって生じる菌の形態変化の像はすべて同一であった。すなわち作用濃度の高低に順じて菌細胞の cytoplasm の一部が欠損したと推定される vacuolation 像から、菌細

Fig. 21 Bactericidal activity of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid on *E. coli* NIHJ JC-2

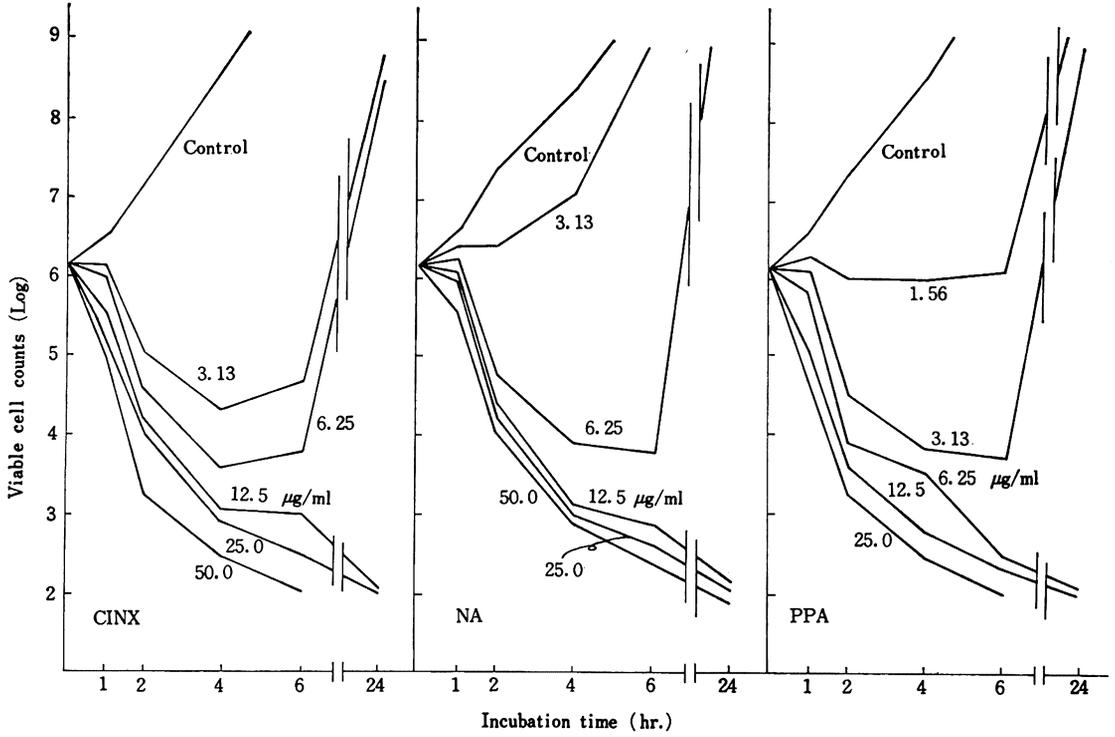


Fig. 22 Influence of cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid on the growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2

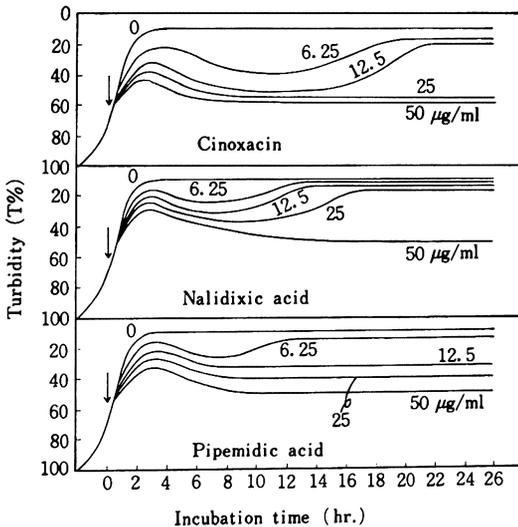


Fig. 23 Morphology of *E. coli* treated with cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid

Inoculum: One loopful of 10^7 cells/ml

Medium: Sensitivity test agar

MIC: CINOX 3.13 µg/ml NA 3.13 µg/ml

PPA 1.56 µg/ml

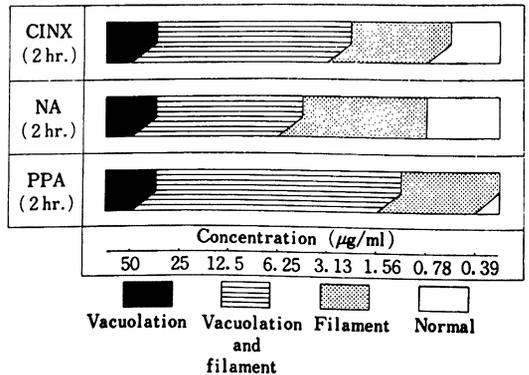
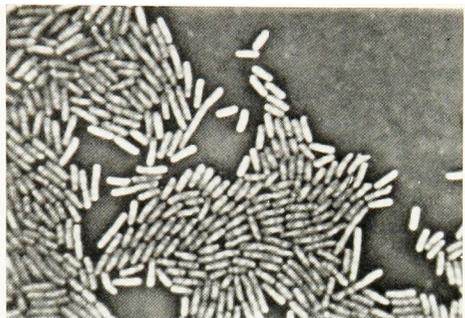
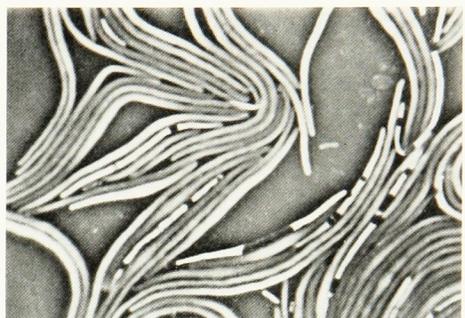


Photo. 1 Phase contrast photomicrographs of *E. coli* NIHJ JC-2
Treatment : CINX, 2 hours on sensitivity test agar
MIC : 3.13 $\mu\text{g/ml}$

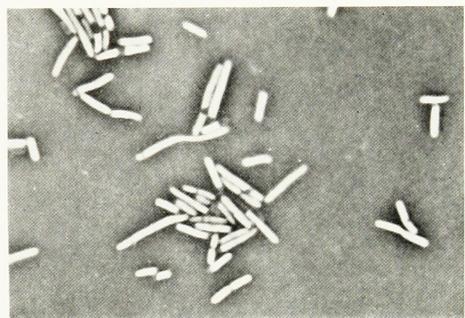
0 (Control)



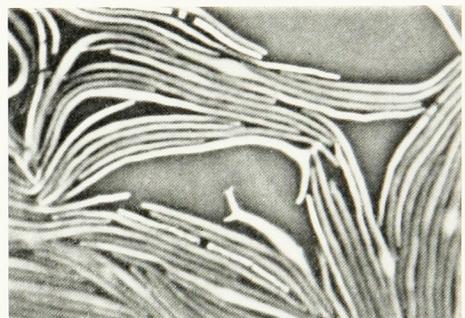
6.25 $\mu\text{g/ml}$



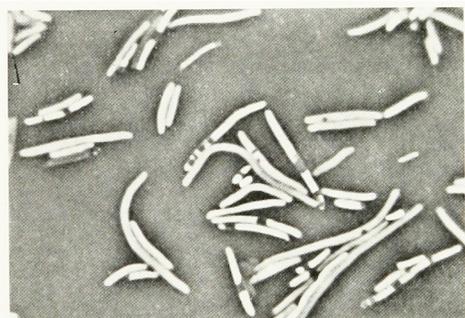
50 $\mu\text{g/ml}$



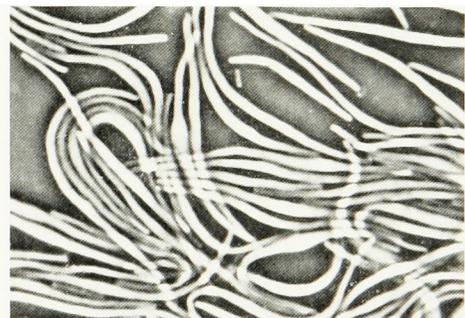
3.13 $\mu\text{g/ml}$



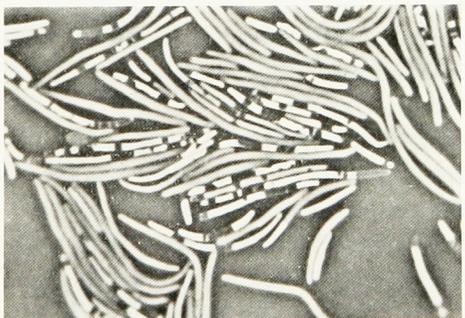
25 $\mu\text{g/ml}$



1.56 $\mu\text{g/ml}$



12.5 $\mu\text{g/ml}$



0.78 $\mu\text{g/ml}$

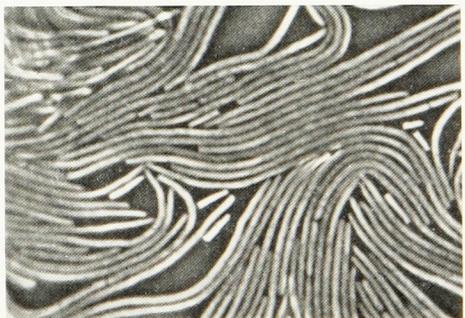
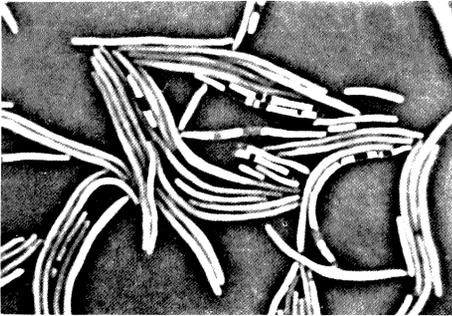
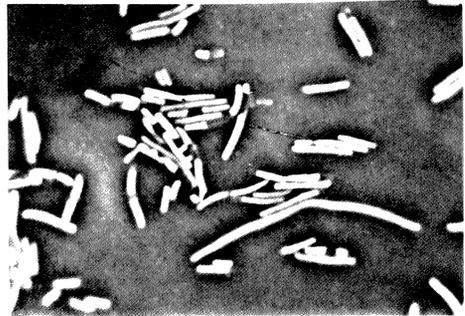
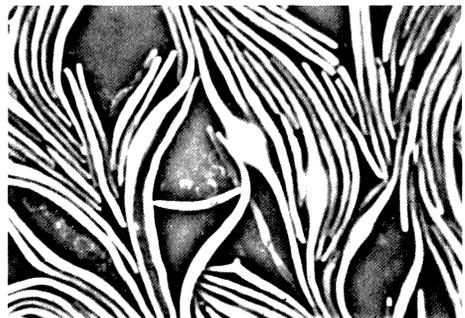


Photo. 2 Phase contrast photomicrographs of *E. coli* NIHJ JC-2
 Treatment : NA and PPA, 2 hours on sensitivity test agar
 MIC : NA 3.13 $\mu\text{g/ml}$ PPA 1.56 $\mu\text{g/ml}$

NA 25 $\mu\text{g/ml}$ PPA 25 $\mu\text{g/ml}$ NA 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PPA 6.25 $\mu\text{g/ml}$ NA 1.56 $\mu\text{g/ml}$ PPA 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 

胞が長軸方向に伸長した filament 像へと変化することが認められた。これらの形態変化を各薬剤毎に 10^7 cells/ml 接種時の MIC を基準にして比較すると、Fig. 23 に示すように CINX (MIC=3.13 $\mu\text{g/ml}$) の場合には 50 $\mu\text{g/ml}$, すなわち 16 MIC 濃度作用下では菌は vacuolation 像のみを示し, 8 MIC~MIC 濃度では vacuolation 像と filament 像とが混在し, 1/2 MIC 濃度では filament 像のみを示し, 1/4 MIC 濃度ではきわめて小数の菌が正常形態に復帰した。これに対し NA では CINX と同じ MIC 値を示すにもかかわらず

ならず MIC 濃度では filament 像のみとなり, 1/4 MIC 濃度ではすべて正常形態を示した。また PPA では MIC と形態変化濃度との関係は CINX と同じパターンを示した。

6. 自然耐性菌出現頻度

E. coli, *K. pneumoniae* および *Proteus* spp. の標準菌株および臨床分離株の一部について CINX, NA および PPA に対する自然耐性菌の出現頻度を 10 MIC を選択濃度として検討した成績は Table 7 に示したとおりである。*E. coli* においては 3 剤のいずれに対しても

Table 8 Frequency of natural resistant mutants to cinoxacin, nalidixic acid and pipemidic acid

Organism	CINX	NA	PPA
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	$<8.3 \times 10^{-9}$	$<8.3 \times 10^{-9}$	$<8.3 \times 10^{-9}$
<i>E. coli</i> EC-49*	$<6.6 \times 10^{-9}$	$<6.6 \times 10^{-9}$	$<6.6 \times 10^{-9}$
<i>K. pneumoniae</i>	8.9×10^{-7}	5.6×10^{-7}	$<1.1 \times 10^{-6}$
<i>K. pneumoniae</i> KI-67*	$<1.4 \times 10^{-8}$	1.6×10^{-7}	$<1.4 \times 10^{-8}$
<i>P. mirabilis</i> PR-4	2.0×10^{-7}	8.6×10^{-8}	$<2.8 \times 10^{-9}$
<i>P. mirabilis</i> Pm-83*	1.4×10^{-7}	2.1×10^{-6}	$<4.7 \times 10^{-9}$
<i>P. morgani</i> Mor-94	5.5×10^{-6}	8.2×10^{-6}	9.1×10^{-7}
<i>P. morgani</i> Mor-55*	3.3×10^{-7}	$<3.3 \times 10^{-9}$	$<3.3 \times 10^{-9}$
<i>P. vulgaris</i> CN-329	1.5×10^{-6}	7.7×10^{-7}	3.1×10^{-7}
<i>P. vulgaris</i> Pv-53*	5.7×10^{-7}	6.4×10^{-7}	2.1×10^{-6}
<i>P. rettgeri</i> Ret-6*	3.6×10^{-6}	5.6×10^{-7}	$<5.5 \times 10^{-9}$
<i>P. rettgeri</i> Ret-27*	8.3×10^{-7}	5.0×10^{-6}	$<8.3 \times 10^{-9}$
<i>P. inconstans</i> In-36*	1.6×10^{-6}	3.1×10^{-6}	6.2×10^{-7}
<i>P. inconstans</i> In-39*	2.3×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.3×10^{-6}

* Clinical isolates

耐性菌の出現は認められなかった。*K. pneumoniae* においては NA および CINX に対して耐性菌の出現が低頻度に認められた。*Proteus* spp. においては CINX および NA に対し比較的高頻度に耐性菌が出現したが特に *P. inconstans* にその傾向が著明であった。これら自然耐性菌の出現頻度を3剤間で比較すると PPA に対して最も少なく、CINX と NA とはほぼ同頻度であった。

考 察

キノロンカルボン酸系抗菌剤については一般に培地種類および培地 pH 等の抗菌力におよぼす影響が大きいと考えられている。今回我々が *E. coli* およびインドール陰、陽性 *Proteus* の臨床分離株を用いて CINX, NA および PPA の抗菌力に対する培地種類の影響を感受性の累積分布について検討した成績からは次のような興味ある知見が得られた。すなわちこれら3剤の抗菌力の順位を指標として比較すると化学療法学会標準法による HIA 培地または STA 培地を使用した場合にはいずれの菌種の場合にも PPA の抗菌力は CINX に比べると2~4倍すぐれているという結果が得られたのに対し、*E. coli* およびインドール陽性 *Proteus* においては他の培地のうち特に NTA 培地を使用した場合に PPA 優位の抗菌力順位に顕著な変化の生じることが認められた。すなわち NTA 培地を使用した場合 *E. coli* および *P. vulgaris* に対しては CINX の抗菌力が PPA とほとんど同一となり、*P. inconstans* に対して

は CINX の抗菌力が PPA よりも若干すぐれている結果が得られた。これは各菌種に対する感受性分布からみて NTA 培地における CINX の抗菌力が HIA 培地または STA 培地よりも常に2倍程度強化されていることによるものと考えられるが、NA および PPA では NTA 培地における抗菌力と HIA または STA 培地における抗菌力との間に特に顕著な差異は認められなかった。

また CINX には培地 pH がアルカリ側になると抗菌力が低下する性質のあることから、NTA 培地 (pH 7.0) にみられる本剤の抗菌力の強化現象が他の培地 (pH 7.3~7.4) との pH 値の差に起因していることも考えられる。しかしながら実験結果に示したように *E. coli* および *P. vulgaris* の臨床分離株の感受性分布について pH 7.0 に調製した HIA 培地と NTA 培地とを比較した場合、明らかに後者における感受性の方が高い結果が得られた。従って NTA 培地の組成成分が CINX の抗菌力を強化する作用を有する可能性が大である。このように CINX に対するグラム陰性菌の感受性が NTA 培地で高まることについては KURTZ 等⁸⁾ によっても報告されている。以上の知見からキノロンカルボン酸系抗菌剤の *in vitro* 抗菌力は測定用培地の種類によっては意外に複雑な応答を示すものといえよう。

E. coli に対する殺菌作用について生菌数の経時変化を検討した結果 CINX の殺菌作用は4 MIC 濃度における殺菌作用時間が早く、かつ 1/4 MIC 濃度においても生菌数の減少が認められたことからみて同じ MIC 値を示す NA よりも若干すぐれていると考えられる。さ

らに Biophotometer による薬剤添加後の増殖曲線の推移からも同様の結果が得られた。CINX の殺菌作用については GIAMARELLOU 等⁹⁾も *E. coli* およびインドール陰、陽性 *Proteus* を用いて 90% killing に要する MBC を比較した結果 NA の殺菌作用よりもすぐれていることを報告している。

CINX の尿中代謝物¹³⁾である M-Cinoxacin, すなわち 1-ethyl-1, 4-dihydro-7-hydroxy-6-methoxy-4-oxo-3-cinnoline carboxylic acid については全く抗菌活性を示さないことが認められた。

以上の諸成績からみて CINX の *in vitro* 抗菌作用は NA とほとんど同等であることが明らかとなった。しかしながら CINX の特性として WICK 等⁶⁾, HOLMES 等¹⁴⁾, および松浦等¹⁵⁾は本剤投与後の血中, 尿中濃度がきわめて高いことを報告しており, これによって本剤の *in vivo* 抗菌活性が NA よりもすぐれていることを認めている。従って, 尿路感染症に対する CINX の治療効果は十分期待されるものと考ええる。

謝 辞

本研究において多大の御協力をいただいた当研究所の砂川則雄, 山本喜代表の両氏に深謝いたします。

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. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 475~479, 1967.
- 3) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & Y. TAKASE : Piromidic acid, a new antibacterial agent. Antibacterial properties. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 117~122, 1970.
- 4) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. TAKASE, A. MITANI, K. NAKATA, S. INOUE. M. ISHIYAMA & Y. KUBO : Pipemidic acid, a new antibacterial agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *In vitro* properties. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 8 : 132~138, 1975
- 5) 井沢昭雄, 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, 神群邦男, 大村貞文 : 新化学療法剤 AB-206 の抗菌作用. *Chemotherapy* 26. Suppl. 4 : 48~59, 1978
- 6) WICK, W. E.; D. A. PRESTON, W. A. WHITE & R. S. GORDEE : Compound 64716, a new synthetic antibacterial agent. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 4 : 415~420, 1973
- 7) LUMISH, R. M. & C. W. NORDEN : Cinoxacin : *In vitro* antibacterial studies of a new synthetic organic acid. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7 : 159~163, 1975
- 8) KURTZ, S. & M. TURCK : *In vitro* activity of cinoxacin, an organic acid antibacterial. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7 : 688~692, 1975
- 9) GIAMARELLOU, H. & G. G. JACKSON : Antibacterial activity of cinoxacin *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7 : 688~692, 1975
- 10) 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
- 11) GORDON, R. C.; L. I. STEVENS, C. E. EDMISTON & K. MOHAN : Comparative *in vitro* studies of cinoxacin, nalidixic acid and oxolinic acid. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 10 : 918~920, 1976
- 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) 坂野俊行, 増田佐智子, 天野為之 : Cinoxacin 投与ヒト尿中代謝物の定量法. *Chemotherapy* 28(S-4) : 139~142, 1980
- 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) 松浦真三・三和秀明・深尾 孝 : Cinoxacin の *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 28(S-4) : 66~72, 1980

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CINOXACIN

KATSUYA TAWARA, TADASHI YOSHIDA, MORIO TAKEMA
and KIYOSHI MOTOKAWA

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

The *in vitro* activity of cinoxacin, a new synthetic organic acid with a cinnoline as its basic ring structure, was compared with that of nalidixic acid and pipemidic acid.

Cinoxacin showed effective *in vitro* activity against members of the family *Enterobacteriaceae*, but negligible activity against *Pseudomonas aeruginosa* and gram-positive cocci. The antibacterial activity of cinoxacin was similar to that of nalidixic acid, but slightly lower than that of pipemidic acid.

Minimal inhibitory concentrations of cinoxacin were determined by agar dilution method for 734 clinical isolates of 11 species of pathogenic bacteria. *Escherichia coli* was the most susceptible group of organisms. Eighty percent of the isolates were inhibited by 6.25 $\mu\text{g/ml}$ of cinoxacin with inoculum of 10^8 cells per ml. Seventy percent of *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii* were inhibited by 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

Most strains of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Proteus inconstans* were found to be more susceptible to cinoxacin in Nutrient agar than in other media.

Cinoxacin showed bactericidal effect at minimal inhibitory concentration against *E. coli* in broth dilution test. Relative to nalidixic acid, cinoxacin showed slightly greater bactericidal activity.