

Cinoxacin の *in vivo* 抗菌作用

松浦 真三・三和 秀明・深尾 孝

塩野義製薬株式会社研究所

新しく合成された経口用抗菌剤 Cinoxacin の実験的マウス腹腔内感染ならびにラットの上行性尿路感染に対する治療効果について、Nalidixic acid および Pipemidic acid を対照薬として比較検討を行なった。

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* によるマウスの腹腔内感染において Cinoxacin の治療効果は、Nalidixic acid および Pipemidic acid とほぼ同程度であったが、*Enterobacter* や *Serratia marcescens* の一部に対しては Pipemidic acid の効果がやや優れていた。

E. coli および *Proteus mirabilis* によるラットの上行性尿路感染に対して Cinoxacin は Nalidixic acid および Pipemidic acid よりも明らかに優れた治療効果を示した。

ラットに経口投与後の Cinoxacin の血漿中、腎組織内濃度および尿中回収率はいずれも対照薬に比べて優れており、ラットの尿路感染における本剤の良好な結果によく反映していた。

序 文

Cinoxacin (CINX) は、米国 Eli Lilly 社の研究所において開発されたキノロンカルボン酸系抗菌剤で、主としてグラム陰性菌に有効であり、*in vitro* の抗菌力は Nalidixic acid (NA) とほぼ同程度ではあるが、経口投与後の尿中濃度は NA に比して高く、しかも長時間持続する¹⁾ことから尿路感染症治療薬としてその効果が期待されている。

本報では、CINX の *in vivo* 抗菌作用、特に各種のグラム陰性病原細菌の腹腔内接種によるマウス全身感染症、ならびに *E. coli* および *P. mirabilis* によるラットの尿路感染症に対する治療効果について、NA および Pipemidic acid (PPA) を対照薬として比較検討した成績について報告する。

実験材料および方法

1) 使用薬剤

CINX (Eli Lilly), NA (日局 9) および PPA (大日本製薬) を使用した。PPA は市販錠剤より抽出精製し、その力価は無水物の量として表現した。これらの薬剤は水に難溶のため、水に溶解する際には 0.2 N の水酸化ナトリウムを添加し、動物に経口投与する場合には 5% アラビアゴム液に懸濁した。

2) 使用菌株

実験に使用した各種のグラム陰性菌は、当研究所保存株および国立大阪病院より分与された尿路感染患者由来

の新鮮分離株合わせて 18 株である。これらの菌株は、10% に非働化牛血清を加えた Heart Infusion Broth (HIB; 栄研) に 10^{8-9} CFU/ml の菌濃度に懸濁し、 -80°C で凍結保存した。

3) MIC の測定

増菌用に Tryptsoy Broth (TSB; 栄研)、感受性測定用に Heart Infusion Agar (HIA; 栄研) を使用し、日本化学療法学会標準法²⁾に従って最小発育阻止濃度を測定した。

4) 感染および治療試験

i) マウス腹腔内感染: SLC-ICR の 5 週齢雌マウス、体重 18~22 g を 1 群 8 匹として用いた。凍結保存の菌液を温浴中で速やかに融解し、それぞれの毒力に応じて HIB で適宜希釈した後、5% ムチン (American Laboratories Inc.) に懸濁して 0.5 ml を腹腔内に接種した。菌接種 1 および 5 時間後の 2 回、薬剤を経口投与し、7 日後の生存率から Probit 法によって 50% 有効量 (ED_{50}) を求め、1 回の投与量で表現した。

ii) ラット上行性尿路感染: SLC-SD の 6 週齢雌ラット、体重 140~160 g を使用した。Thiopental-Na (ミドリ十字) と Pentobarbital-Na (Pitman-Moore) の 2:1 混液で麻酔した後、下腹部の毛を刈り、アルコール綿で十分消毒して開腹し膀胱を露出した。次に膀胱

の頂点を切開して菌液を含んだ Cutina LE (Dehydtag, Henkel, 西独) のディスクを挿入し, その切口を縫合糸で縛って閉じ, 外側から軽く膀胱を圧してディスクをつぶしてから元の位置に膀胱を戻した後, 腹部の傷口をミヘル針で縫合した。膀胱内に挿入する Cutina LE のディスクは, 軟膏製造の原料として用いられる脂肪酸グリセライドの混合ベレットで, 直径および高さが約 2 mm の円筒型をなし, 使用に際し UV 照射によって滅菌した。 *E. coli* EC-2 では 1×10^6 CFU/ml, *P. mirabilis* 434 では 4×10^5 CFU/ml に調製した菌液中にディスクを約 2 時間浸した後, 実験に供した。更に, 感染を促進させる目的から, FRIED 等の報告³⁾に従って Oxamide ($H_2NCOCONH_2$) を 1% に含む特殊飼料を作製 (オリエンタル酵母) し, 感染後 2 日間はこれを与え, その後普通飼料に戻した。薬剤による治療は, *E. coli* 感染系では感染の翌日から朝夕 2 回 3 日間経口投与によって行なったが, *P. mirabilis* 感染系では更に感染 6 時間後の投与をこれに加えた。最終投薬の翌日, 即

ち感染 4 日後にラットを屠殺し, 両腎を摘出してホモジナイズした試料, および膀胱から採取した尿試料について 10 倍希釈系を作製し, ドリガルスキー改良培地 (BTB ; 栄研) による定量培養を行ない, 腎 1 g 当りまたは尿 1 ml 当りの生菌数を求めた。1 群 6~7 匹のラットを用い, 場合によっては 2, 3 回の繰返し実験を行ない, 腎内および尿中の生菌数が 10^4 CFU 以下の場合を有効と判定し, 各投与量における有効率から Logit 法⁴⁾によって ED_{50} ならびに信頼限界 (95%) を算出した。

5) 体液内および腎内濃度の測定

マウスについては薬剤 50 mg/kg を経口投与後, 0.5, 1, 2, 3, 5 時間目に採血し血漿を遠心分離した。ラットについては 25 mg/kg を経口投与後, 0.5, 1, 2, 3 時間目に断頭瀉血し採血した後, 腎を摘出しリン酸緩衝液 (1/10 M, pH: 7.0) を加えてホモジナイズし, 高速遠心によって上清を分離した。また, 一部のラットについては, メタボリックケージ内で投薬 5 時間までの尿を採集した。各試料中の薬剤濃度は, *E. coli*

Table 1 Protective effect of CINX, NA and PPA against experimental intraperitoneal infections in mice

Test organism	Challenge dose (CFU/mouse)	ED_{50} : (mg/kg/dose)			MIC (μ g/ml)		
		CINX	NA	PPA	CINX	NA	PPA
<i>E. coli</i> EC-2	7×10^6	26.6	46.2	26.6	6.25	6.25	1.56
<i>E. coli</i> EC-13	8×10^6	46.9	39.5	28.3	3.13	6.25	1.56
<i>E. coli</i> EC-14	4×10^4	12.3	14.1	14.1	6.25	3.13	1.56
<i>E. coli</i> 4080	6×10^4	18.5	24.7	12.6	3.13	3.13	1.56
<i>K. pneumoniae</i> KL-38	7×10^4	18.5	11.8	11.1	6.25	3.13	3.13
<i>K. pneumoniae</i> 3898	9×10^4	46.3	56.6	37.0	6.25	6.25	3.13
<i>K. pneumoniae</i> 3951	2×10^4	28.1	29.6	14.2	6.25	6.25	3.13
<i>P. mirabilis</i> PM-8	5×10^6	60.0	34.7	51.8	6.25	12.5	3.13
<i>P. mirabilis</i> 434	3×10^6	34.7	37.0	42.4	6.25	6.25	3.13
<i>P. vulgaris</i> CN-329	7×10^5	51.8	26.6	51.8	6.25	6.25	3.13
<i>P. rettgeri</i> RET-21	1×10^7	49.8	35.4	35.2	6.25	6.25	3.13
<i>P. inconstans</i> IN-25	9×10^6	37.6	21.3	25.8	6.25	6.25	6.25
<i>E. cloacae</i> CL-113	1×10^6	36.4	38.9	18.5	6.25	6.25	1.56
<i>E. aerogenes</i> TB-510	2×10^5	40.3	26.9	13.4	12.5	6.25	3.13
<i>E. aerogenes</i> 13367	9×10^6	32.4	55.5	29.0	6.25	6.25	0.78
<i>S. marcescens</i> 13880	9×10^4	34.7	21.2	20.0	25	3.13	3.13
<i>S. marcescens</i> MA-56	2×10^4	21.6	13.8	7.07	12.5	3.13	1.56
<i>S. marcescens</i> MA-60	3×10^3	27.7	14.2	13.4	12.5	3.13	1.56

Mice were infected intraperitoneally with test organism in 5% mucin.

Antimicrobial agents were administered orally at 1 and 5 hours after infection.

ED_{50} value was expressed as a single dose.

MIC was assayed by the agar dilution method and inoculum size was one loopful of 10^6 CFU/ml.

7437 を検定菌とした帯培養法⁵⁾によって測定した。

実験成績

1) マウス腹腔内感染に対する治療効果

各種のグラム陰性菌を用いたマウス腹腔内感染に対する CINX, NA および PPA の治療効果 (ED₅₀) を 10⁶ CFU/ml 接種時の MIC と共に一括して Table 1 に示した。

MIC から見ると, PPA は今回比較された薬剤の中で最も *in vitro* 活性が高く, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* に対しては CINX の 2~4 倍, *Enterobacter*, *S. marcescens* に対しては 4~8 倍優れた抗菌力を示した。NA は試験された大部分の菌株において CINX とほぼ同程度の MIC 値を示したが, *S. marcescens* に対しては CINX よりも 4~8 倍活性が優れていた。

一方, *in vivo* 効果では *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* の各感染系において, CINX と PPA の ED₅₀ はそのすべてが 2 倍以内の差で極めて接近した値を示

Fig. 1 Plasma levels of CINX, NA and PPA after oral administration in mice

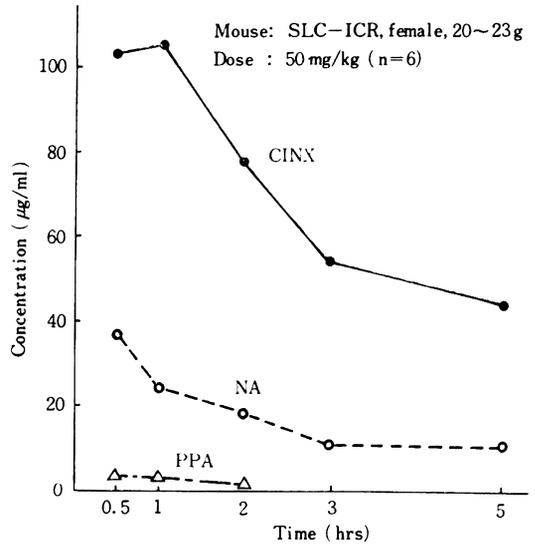


Table 2 Protective effect of CINX, NA and PPA against experimental urinary tract infection with *E. coli* EC-2 in rats

(mg/kg/dose)		CINX		NA		PPA	
		Kidney	Urine	Kidney	Urine	Kidney	Urine
Log of viable cells/g, ml (Mean ± S.D.)	30			2.34 ± 0.59	2.05 ± 0.78		
	10	2.84 ± 1.58	2.62 ± 1.12	3.68 ± 2.06	3.58 ± 1.67	2.60 ± 0.75	3.30 ± 1.10
	3	2.99 ± 1.72	3.49 ± 1.52	4.25 ± 2.14	3.94 ± 1.69	5.03 ± 2.26	4.08 ± 1.72
	1	4.43 ± 2.32	4.57 ± 1.80	5.03 ± 2.69	4.59 ± 2.18	5.86 ± 2.28	5.37 ± 1.62
	0.3	5.13 ± 1.86	5.35 ± 1.54	6.59 ± 1.65	6.39 ± 1.28	6.98 ± 0.60	6.73 ± 0.93
	0.1	7.35 ± 1.62	6.33 ± 1.94				
	(Control)	6.98 ± 1.43	6.65 ± 1.41				
Effective* / Treated	30			7/7	7/7		
	10	6/7	6/7	8/14	7/14	7/7	6/7
	3	10/14	9/14	10/21	11/21	4/13	6/13
	1	11/20	6/20	5/12	4/12	5/21	4/21
	0.3	3/13	3/13	1/7	0/7	0/6	0/6
	0.1	0/7	0/7				
	(Control)	2/38	1/38				
ED ₅₀		1.00 (0.67-1.33)	1.75 (1.04-2.46)	3.38 (1.66-5.10)	4.01 (2.03-5.99)	3.91 (1.75-6.07)	3.10 (2.07-4.13)

Rat : SLC-SD strain, female, 130~170 g

Infection : LE-Disk immersed into the suspension (1 × 10⁶ CFU/ml) of *E. coli* EC-2 was inserted into the urinary bladder.

Therapy : Antimicrobial agents were administered orally b.i.d. for 3 days after infection.

ED₅₀ value was expressed as a single dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

* : Rat with viable cells of less than 10⁴ CFU/g, ml was regarded as "effective".

Table 3 Protective effect of CINX, NA and PPA against experimental urinary tract infection with *P. mirabilis* 434 in rats

(mg/kg/dose)		CINX		NA		PPA	
		Kidney	Urine	Kidney	Urine	Kidney	Urine
Log of viable cells/g. ml (Mean ± S.D.)	10			<2.00	2.01±0.63	<2.00	2.42±1.28
	3			3.03±1.58	4.49±2.60	4.45±2.45	5.08±2.60
	1	2.12±0.41	3.20±2.29	6.42±2.47	6.01±1.67	6.64±0.58	7.04±1.04
	0.3	4.13±2.15	4.11±2.64	7.25±1.03	7.01±0.62		
	0.1	6.13±1.95	6.67±0.95				
	(Control)	7.66±0.60	7.21±0.92				
Effective*/Treated	10			6/6	6/6	6/6	5/6
	3			6/7	4/7	3/7	2/7
	1	11/11	8/11	2/10	1/10	0/7	0/7
	0.3	4/7	4/7	0/7	0/7		
	0.1	1/7	0/7				
	(Control)	0/26	0/26				
ED ₅₀		0.25 (0.18-0.32)	0.37 (0.21-0.53)	1.75 (1.18-2.32)	2.61 (1.69-3.53)	3.38 (2.40-4.36)	4.51 (2.98-6.04)

Rat : SLC-SD strain, female, 130~170 g

Infection : LE-Disk immersed into the suspension (4×10^5 CFU/ml) of *P. mirabilis* 434 was inserted into the urinary bladder.

Therapy : Antimicrobial agents were administered orally at 6 hr and b.i.d. for 3 days after infection. ED₅₀ value was expressed as a single dose. Numbers in parentheses indicated 95% confidence limits.

* : Rat with viable cells of less than 10^4 CFU/g, ml was regarded as "effective".

し、両薬剤間の治療効果に有意差を認めなかった。*Enterobacter* ならびに *S. marcescens* の一部の感染系においては PPA の効果が CINX を 2~3 倍上回るが、MIC の差に比べればその差は小さかった。また NA との比較では、試験されたすべての感染系において CINX と NA の ED₅₀ は 2 倍以内の差で接近しており、両薬剤間の治療効果には有意差が認められなかった。

2) マウスにおける血漿中濃度

CINX, NA および PPA をそれぞれ 50 mg/kg 1 回経口投与したマウスの血漿中濃度の成績を Fig. 1 に示した。平均血漿中濃度のピークは CINX では 1 時間後に 105.0 µg/ml, NA および PPA では 30 分後にそれぞれ 37.0 および 3.8 µg/ml であり、CINX は 3 薬剤の中で最も血漿中への移行がよく持続性も優れていた。

3) ラット尿路感染に対する治療効果

E. coli EC-2 および *P. mirabilis* 434 感染系での成績をそれぞれ Table 2 および Table 3 に示した。腎内菌数を指標とした場合の ED₅₀ は *E. coli* 感染系に

おいて、CINX; 1.00 mg/kg/dose, NA; 3.38 mg/kg/dose, PPA; 3.91 mg/kg/dose で CINX は対照薬に比べて 3~4 倍優れた治療効果を示した。更に、*P. mirabilis* 感染系での CINX の ED₅₀ は 0.25 mg/kg/dose で、この値は NA の約 1/7, PPA の約 1/14 に相当し、CINX の治療効果が明らかに優れていた。一方、尿中菌数を指標とした場合は、腎内菌数を指標とした場合に比べて ED₅₀ 値に僅かな変動が認められるのみで、治療効果を評価する上での本質的な差異は見出されなかった。また、各薬剤とも投与量と腎内および尿中の生菌数との間には有効率に見られると同様の明らかな dose response が両感染系において認められた。

4) ラットにおける血漿中、腎内濃度および尿中回収率

CINX, NA および PPA をそれぞれ 25 mg/kg 1 回経口投与したラットの血漿中および腎組織内濃度の推移を Fig. 2 に、また投与後 5 時間までの尿中回収率の測定結果を Fig. 3 に示した。血漿中濃度と腎内濃度の推移は各薬剤によって極めて類似したパターンを示し、CINX は投与 30 分後に 21.4 µg/ml および 44.9 µg/g,

Fig. 2 Plasma and kidney levels of CINX, NA and PPA after oral administration in rats

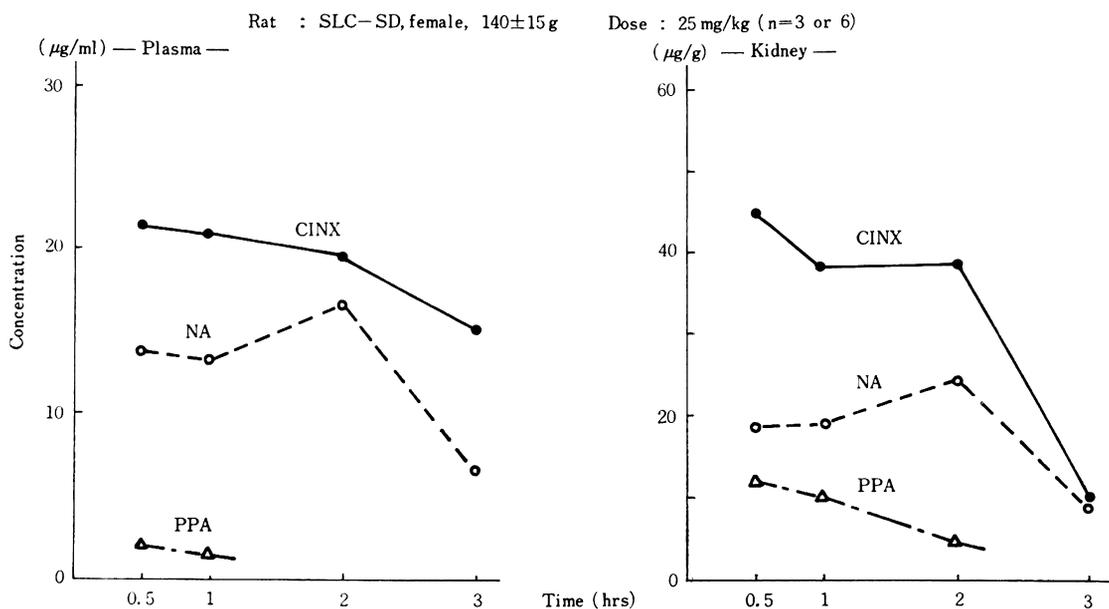
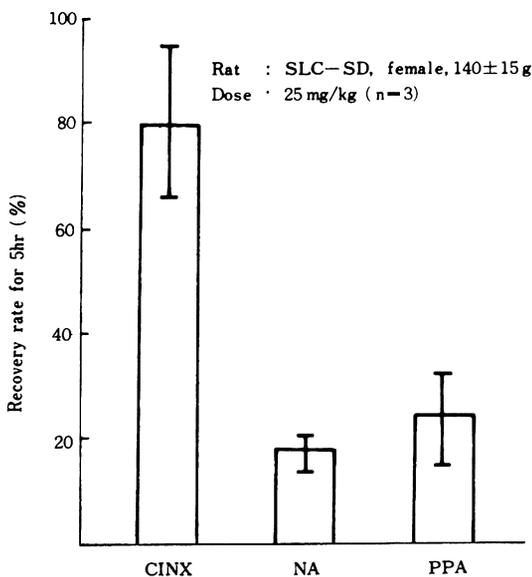


Fig. 3 Urinary excretion of CINX, NA and PPA after oral administration in rats



NA は 2 時間後に 16.8 µg/ml および 24.2 µg/g, PPA は 30 分後に 2.0 µg/ml および 12.2 µg/g のピーク値をそれぞれ示した。また尿中濃度の測定結果から CINX は投与量の 80%, NA は 18%, PPA は 25% が投与後 5 時間までに尿中へ回収された。以上のラットを用いた成績から、今回比較された 3 種の薬剤は構造的に類縁でありながら、経口投与後の吸収排泄の態度はか

なり異なり、CINX は血漿中、腎組織内濃度、および尿中回収率のいずれもが対照薬に比べて高く、これが今回のラットの実験的尿路感染症において優れた効果をもたらした主因であることが強く示唆された。

考 察

WICK 等¹⁾は各種のグラム陰性菌を用いたマウス全身感染実験において、CINX は NA と同程度の治療効果を有することを報告し、更に HOLMES 等⁶⁾によれば、*E. coli* および *P. mirabilis* を感染菌としたラットの下行性腎盂腎炎に対して CINX は NA よりも優れた治療効果を示し、その高い血中濃度と尿中への回収から、CINX が尿路感染症の治療剤として有用であることを示唆している。我々は今回これらの点を更に明確にする目的で、尿路感染症からの分離頻度の高い *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *Enterobacter* および *S. marcescens* を感染菌としたマウス腹腔内感染症ならびに *E. coli* および *P. mirabilis* によるラットの上行性尿路感染症における CINX の治療効果に関して、NA および PPA を対照薬として比較検討を行なった。腹腔内接種によるマウスの全身感染症に対して、CINX は 12.3~60.0 mg/kg の ED₅₀ 値を示して広く有効であり、その強さは NA とほぼ同程度であった。PPA との比較では、*Enterobacter* や *S. marcescens* の一部の感染系において CINX の治療効果がやや劣るものの、それら以外の感染系ではほぼ同程度の ED₅₀ が得られ、

MIC の差に比べて両薬剤の *in vivo* 活性はかなり接近しており、血中吸収の良さが *in vitro* 活性の弱さを補っているように思われた。

ラットを用いた上行性尿路感染症の実験において CINX は NA および PPA に比べて、*E. coli* 感染系で 3~4 倍、*P. mirabilis* 感染系では数倍から十数倍優れた治療効果が観察され、CINX が尿路感染症の治療薬として極めて有望なことが示唆された。同時に、ラットに CINX を投与した後の血中、腎組織内濃度ならびに尿中回収率は、NA、PPA に比べて一段と高いことが裏付けられた。

以上のように、CINX は類縁の合成抗菌剤と比較して *in vitro* の抗菌活性の点では必ずしも優れたものではないが、経口投与後の bioavailability の点で優れた特徴を有し、それが実験的尿路感染に対する治療効果に現われたものと考えられる。しかし、薬剤の吸収排泄の態度は時として動物の種類によって異なることが知られているので、今回のラットにおける実験成績がどの程度まで臨床の場に反映されるかに関して今後十分な臨床治験が必要となろうが、既に、健康人に経口投与された CINX の大半が未変化のまま排泄され⁷⁾、臨床においても、複雑性を含む尿路感染症に対して優秀な治療成績が報告⁸⁾されていることから、基礎と臨床との平行性がかなりの程度支持されているように思われる。

最後に、我々が今回の実験に用いたディスクの膀胱内挿入と Oxamide 飼料給餌の併用によるラットの尿路感染モデルは、各種の細菌に应用が可能で再現性にも優れることから尿路感染治療剤の評価に有用な手段と考え

られる。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本実験に終始御協力を頂いた当研究所の島岡 登、堀 賢司、東山伊佐夫の諸氏に深甚なる謝意を表します。

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 (4) : 415~420, 1973
- 2) 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
- 3) FRIED, F. A. & R. J. WONG : Etiology of pyelonephritis : Intraductal crystallization as a co-factor. *J. Urol.* 101 : 786~790, 1969
- 4) ASHTON, W. D. : The logit transformation with special reference to its uses in biology. 2nd Ed., Griffin, London pp.46~63, 1972
- 5) 木村靖雄, 土肥正善, 吉田 正 : 抗生剤の微量定量——帯培養法の応用。 *Chemotherapy* 25 : 449~450, 1977
- 6) HOLMES, D. H. ; P. W. ENSMINGER & R. S. GORDEE : Cinoxacin : Effectiveness against experimental pyelonephritis in rats. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 6(4) : 432~436, 1974
- 7) BLACK, H. R. ; K. S. ISRAEL, R. L. WOLEN, G. L. BRIER, B. O. OBERMEYER, E. A. ZIEGE & J. D. WOLNY : Pharmacology of cinoxacin in humans. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 15(2) : 165~170, 1979
- 8) LANDES, R. R. & J. W. HALL : Cinoxacin : New antimicrobial agent for urinary tract infections. *Urology.* 10(4) : 312~316, 1977

IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CINOXACIN

SHINZO MATSUURA, HIDEAKI MIWA and TAKASHI FUKAO

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

The therapeutic efficacy of cinoxacin, a new synthetic orally active compound, against experimental infections of mice and rats was compared with that of nalidixic acid and pipemidic acid.

In mouse systemic infections, cinoxacin showed similar activity to nalidixic acid and pipemidic acid against infections caused by gram-negative organisms such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus* sp., although activities of cinoxacin and nalidixic acid were slightly less than that of pipemidic acid against infections with some strains of *Enterobacter* sp. and *Serratia marcescens*.

In the ascending urinary tract infections of rats, however, cinoxacin was significantly more effective than nalidixic acid or pipemidic acid in treatment of infections caused by either *E. coli* or *Proteus mirabilis*.

The concentrations of cinoxacin in plasma, urine and kidneys after oral administration in rats were clearly higher than those of nalidixic acid or pipemidic acid, and this appears to respond well to the successful therapeutic efficacy of cinoxacin against the urinary tract infections of rats.