

新キノリンカルボン酸系合成抗菌剤 AM-715 の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用と マウス血清中濃度について

五島 瑛智子・小川 正俊・金子 康子・武藤 弓子・桑原 章吾
東邦大学医学部微生物学教室

新しい経口キノリンカルボン酸系の合成抗菌剤である AM-715 の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用について実験を行い、基礎的評価を行った。

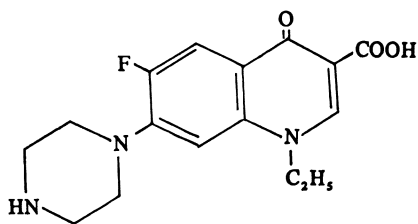
AM-715 は広域スペクトラムを有し, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* に対し, 強力な抗菌作用を有していることが確認された。

緑膿菌に対する殺菌作用は, AM-715 が miloxacin, pipemidic acid, nalidixic acid より強いことが認められた。

In vivo におけるマウス実験感染では, 緑膿菌に対する AM-715 の感染防禦効果は miloxacin と同等か, あるいはそれ以上であり, pipemidic acid より優っていた。

はじめに

新しいキノリンカルボン酸系合成抗菌剤である AM-715 の構造式は次のとおりである。



1-Ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid

AM-715 は, 従来のナリジク酸系抗菌剤に比べ, *in vitro* 抗菌活性は強く, グラム陰性桿菌, グラム陽性球菌にもすぐれた抗菌力を示すのが特徴であるとされている¹⁾。

本報告は, AM-715 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を miloxacin, pipemidic acid, nalidixic acid を比較薬剤として検討した成績のあらましである。

実験材料および実験方法

1. 使用菌株

教室保存株, および臨床材料から分離された株を使用した。

2. 薬剤

AM-715	杏林製薬
Miloxacin (MLX)	住友化学
Pipemidic acid (PPA)	大日本製薬
Nalidixic acid (NA)	第一製薬

3. 感受性測定法

日本化学療法学会感受性測定法に準じた²⁾。

4. 殺菌作用

P. aeruginosa E7 株を用い, 10^7 cells/ml に調製した菌に AM-715 を 1/4 MIC, 1MIC, 4MIC の各濃度を添加したのち, 振盪培養を行い, 経時的に培養液を採取し, 生菌数を測定した。

5. マウス実験感染における感染防禦効果

マウスは, CD-1 系, 雄, 4 週齢, 体重 19 ± 1 g を用い, *Serratia marcescens* No. 2 および *P. aeruginosa* E7 を感染菌とし, 腹腔内感染 1 時間後に経口投与にて AM-715, MLX, PPA による治療を行った。観察は感染後 5 日間とし, マウスの生死により BEHRENS KARBER method により ED₅₀ 値を算出した。

6. マウス血清中濃度測定法

感染実験に用いた同条件のマウス, 1 群 9 匹とし, AM-715, MLX, PPA を経口投与後, 一定時間ごとに, 断頭採取した血液の一定量を一群ずつプールし, 分離した血清中の濃度を AM-715 は *Bacillus subtilis* ATCC 6051, MLX, PPA は *Escherichia coli* Kp を検定菌とする bioassay method で測定した。

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates
S. aureus (44 strains)

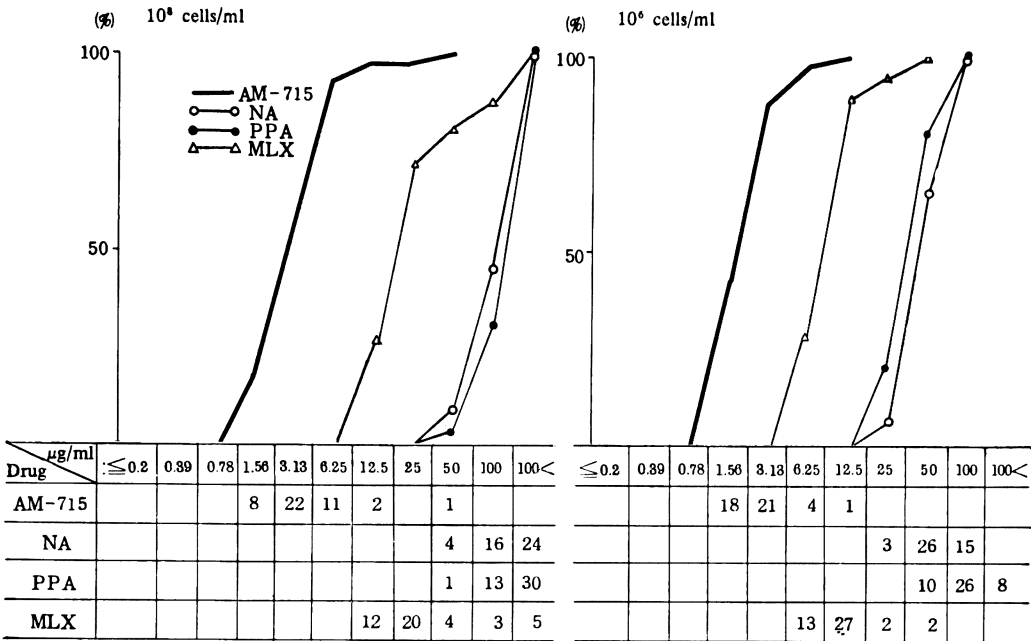
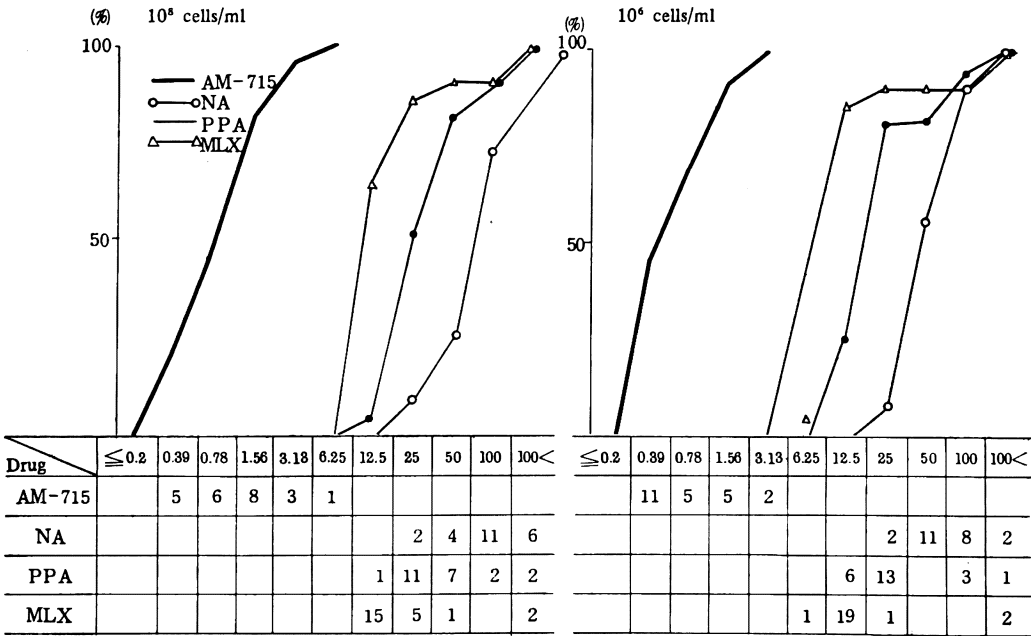


Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates
S. epidermidis (23 strains)



実験成績

1. *in vitro* 抗菌作用

1) 臨床分布菌の感受性分布

感受性分布の成績は Fig. 1~18 に示した。

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis* に対する AM-715 の MIC 分布は対照として用いた MLX, PPA, NA と比べ、感性側に分布し、 10^6 cells/ml 接種における *S. aureus* に対する MIC の peak は $3.12 \mu\text{g/ml}$ で、*S. epidermidis* では $0.39 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 1~2)。

Streptococcus pyogenes では、MLX, PPA, NA に対して $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示し、AM-715 は感性であり、 10^6 cells/ml では全株 $25 \mu\text{g/ml}$ 以下で発育が抑制され、MIC の peak は $12.5 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 3)。

E. coli, *Klebsiella pneumoniae* では、AM-715 の MIC は、MLX, PPA, NA よりも感性側に分布し、 10^6 cells/ml 接種における peak は $0.1 \sim 0.19 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 4~5)。

Proteus 属では、*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* の4菌種について調べたが、AM-715 の抗菌作用は強く、MLX, PPA, NA より小さな MIC を示した (Fig. 6~9)。

Enterobacter cloacae の AM-715 に対する感受性は 10^6 cells/ml 接種において、全株 $3.12 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC を示し、MLX, PPA, NA より感性であった (Fig. 10)。

Serratia marcescens の場合にも、AM-715 は他の3剤よりすぐれた抗菌力を示し、 10^6 接種では、 $25 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株は、1株も認められなかった (Fig. 11)。

Pseudomonas aeruginosa に対しても、AM-715 の抗菌力は他の3剤より強く、 10^6 cells/ml 接種での MIC の peak は $0.78 \mu\text{g/ml}$ であった。MLX, PPA, NA の順に MIC が大きくなった (Fig. 12)。

Pseudomonas cepacia に対しては、 10^6 cells/ml、 10^6 cells/ml 接種とも、MLX が最もすぐれた抗菌作用を示し、つぎが AM-715 であった。 10^6 cells/ml 接種での AM-715 の MIC peak は $12.5 \mu\text{g/ml}$ を示した (Fig. 13)。

Pseudomonas maltophilia に対しては、MLX の抗菌力が最もすぐれ、AM-715 は NA と同等もしくはわずかに劣るが、PPA より強かった (Fig. 14)。

Acinetobacter calcoaceticus に対する AM-715 の MIC は MLX, NA とほぼ同等の分布を示し、PPA よりすぐれていた (Fig. 15)。

Alcaligenes faecalis においては、MLX の抗菌力が最もすぐれ、次いで NA, AM-715, PPA の順であった。 10^6 cell/ml 接種における AM-715 の MIC peak は $25 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 16)。

Achromobacter xylosoxidans に対しては、AM-715, NA, MLX が同程度の抗菌力を示し、その MIC 分布は $1.56 \mu\text{g/ml}$ から $100 \mu\text{g/ml}$ 以上と広く分布した (Fig. 17)。
Haemophilus influenzae では、AM-715 は、 $0.19 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC を示し、MLX, NA, PPA よりすぐれた抗菌力がみられた (Fig. 18)。

2) 殺菌作用

AM-715 の *P. aeruginosa* E 7 株に対する殺菌作用を MLX, PPA, NA と比較した成績を Fig. 19 に示した。

AM-715 は、MLX, PPA, NA より殺菌作用が強く、 $1.56 \mu\text{g/ml}$ (MIC), $6.25 \mu\text{g/ml}$ (4MIC) 添加で、著明な菌数の減少が認められ、1時間で生菌数は 10^2 cells/ml 以下となった。

2. マウス実験感染における防壁効果

1) *Serratia* 感染 (Table 1)

S. marcescens No. 2 株を感染菌とし、同一条件で AM-715, MLX, PPA によって治療した成績を Table 1 に示した。

大量菌攻撃では、AM-715 は MLX より治療効果が悪いが、PPA よりすぐれ、約 1/2 の ED₅₀ 値を示した。

少量菌攻撃では、AM-715 の治療効果は MLX と比べ、わずかに劣る成績であったが、PPA よりすぐれていた。

2) *P. aeruginosa* 感染 (Table 2)

大量菌攻撃では、AM-715, MLX, PPA とも治療効果は悪かったが、少量菌攻撃の場合は、AM-715 は、MLX, PPA より小さい ED₅₀ 値を示し、感染防壁効果はもっとも良好であった。

3. マウス血清中濃度

AM-715 は 2 mg/mouse , MLX は 1 mg/mouse および 0.5 mg/mouse , PPA は 2 mg/mouse および 1 mg/mouse を経口投与した。成績を Fig. 20 に示した。

AM-715, 2 mg/mouse 投与における血中濃度の peak は投与後1時間で $0.65 \mu\text{g/ml}$ であった。

MLX は 1 mg/mouse 投与で $42 \mu\text{g/ml}$ の peak 値 (投与後1時間) を示し、PPA 1 mg/mouse 投与の場合は、 $4 \mu\text{g/ml}$ の peak を示した。

考 察

キノリンカルボン酸系抗菌剤 (pipemidic acid, nalidixic acid) は、グラム陰性桿菌用の経口剤として、主に尿路感染症に使用されており、そのうち pipemidic acid と最近開発された miloxacin はさらに抗緑膿菌作用があることが認められている³⁾。

新しく開発された AM-715 について、*in vitro*, *in vivo* 抗菌作用を上記3薬剤と比較検討した。

従来のキノリンカルボン酸系の NA, PPA, MLX はグ

Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates
S. pyogenes (33 strains)

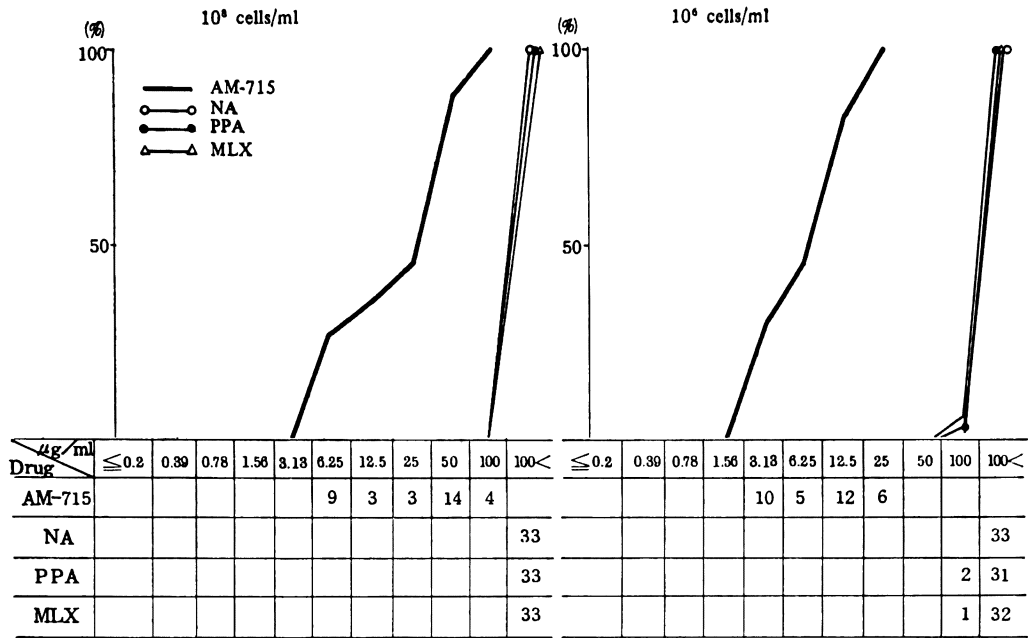


Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates
E. coli (50 strains)

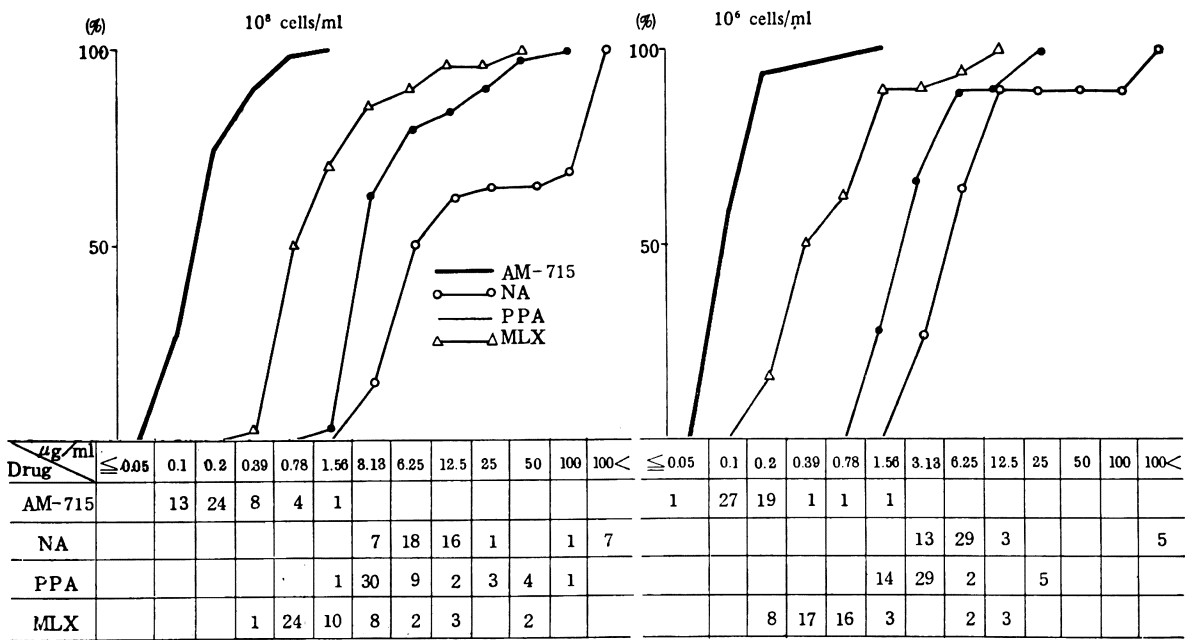


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates
K. pneumoniae (50 strains)

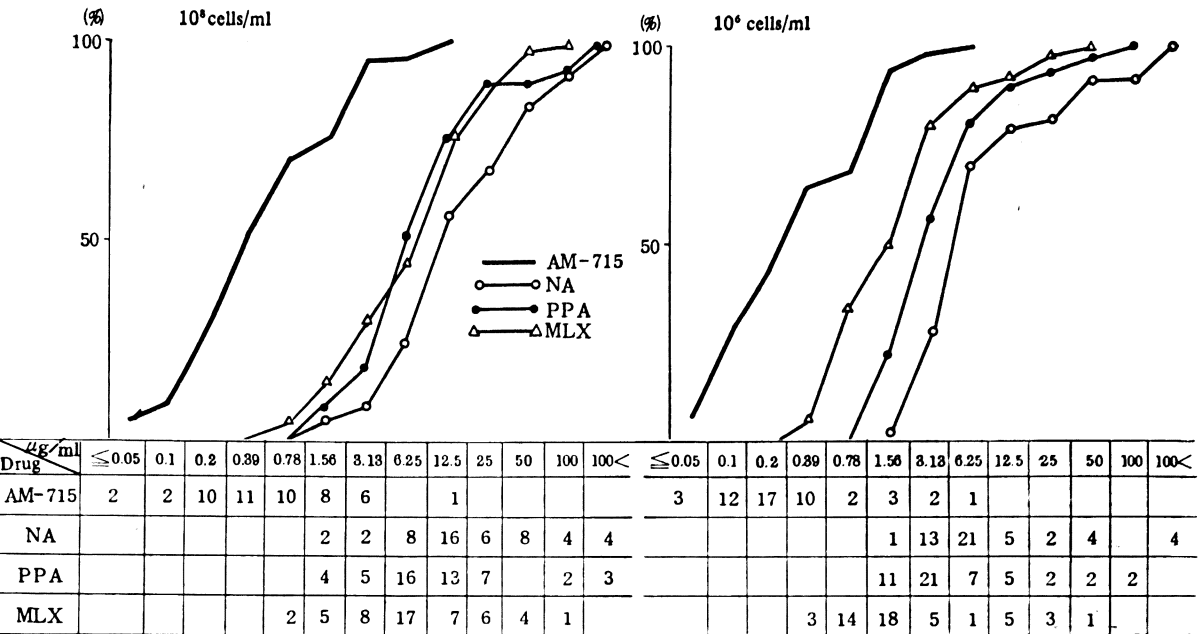


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. mirabilis (50 strains)

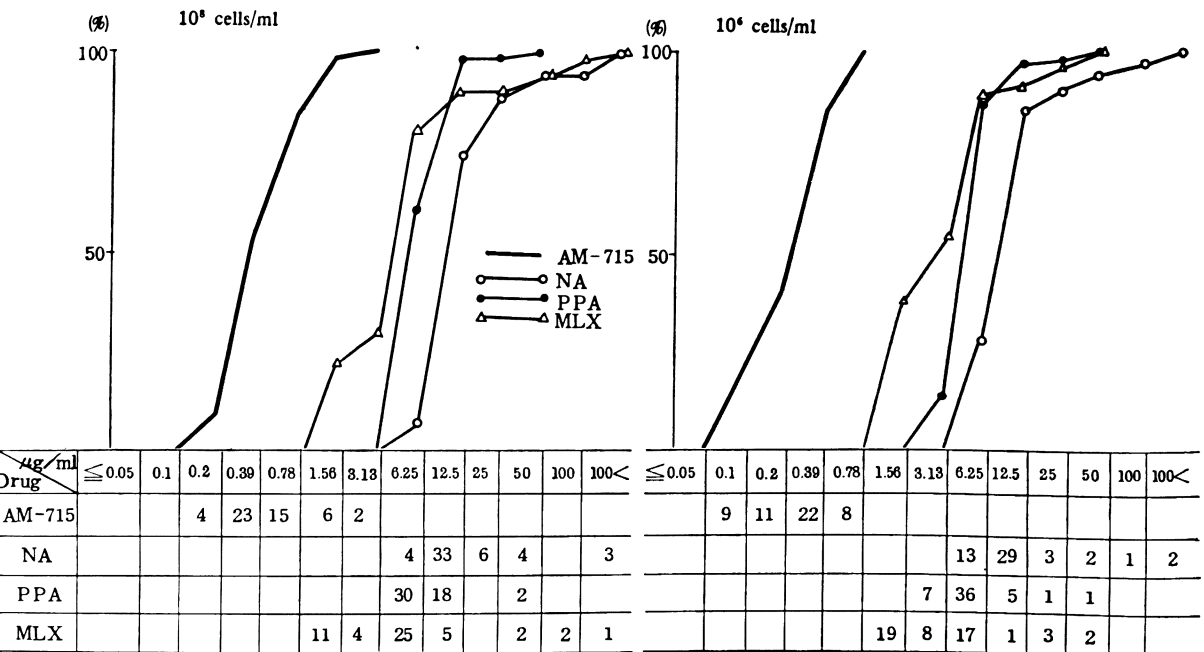


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. vulgaris (38 strains)

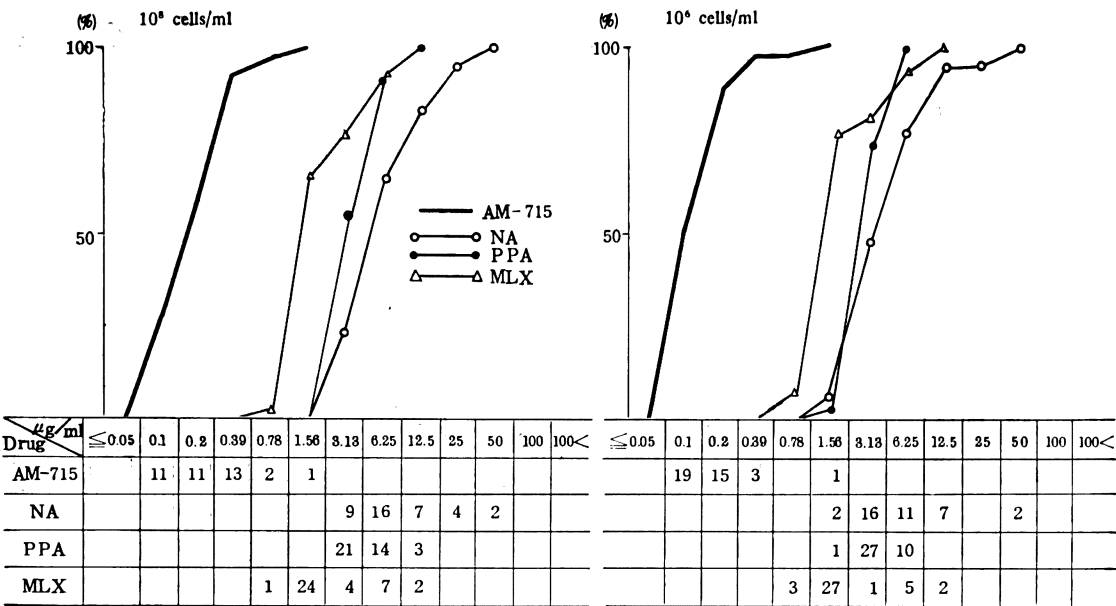


Fig. 8 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. rettgeri (40 strains)

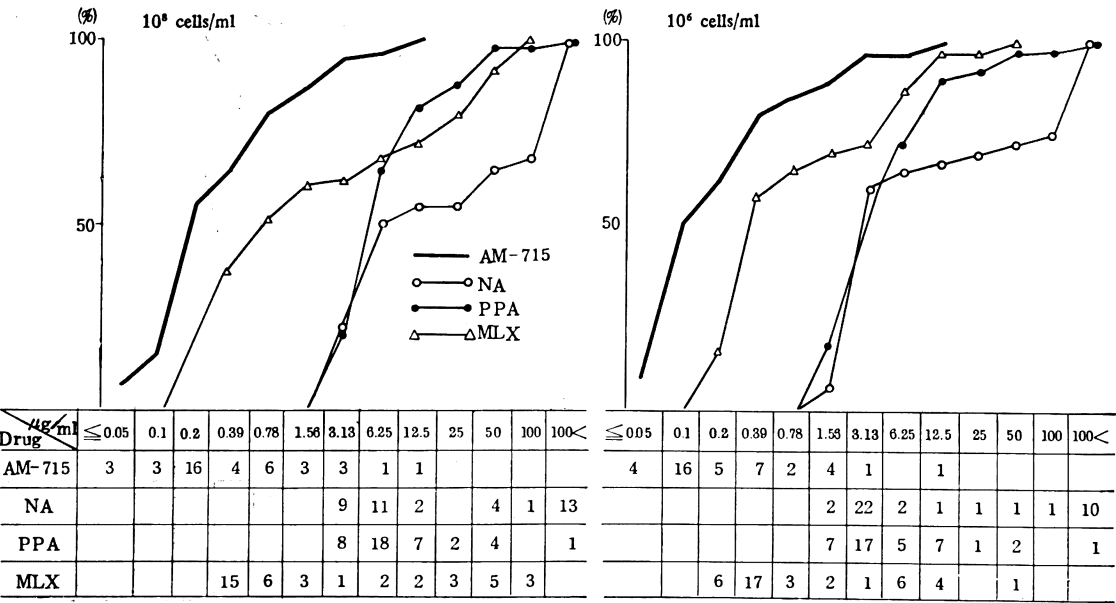


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. morganii (34 strains)

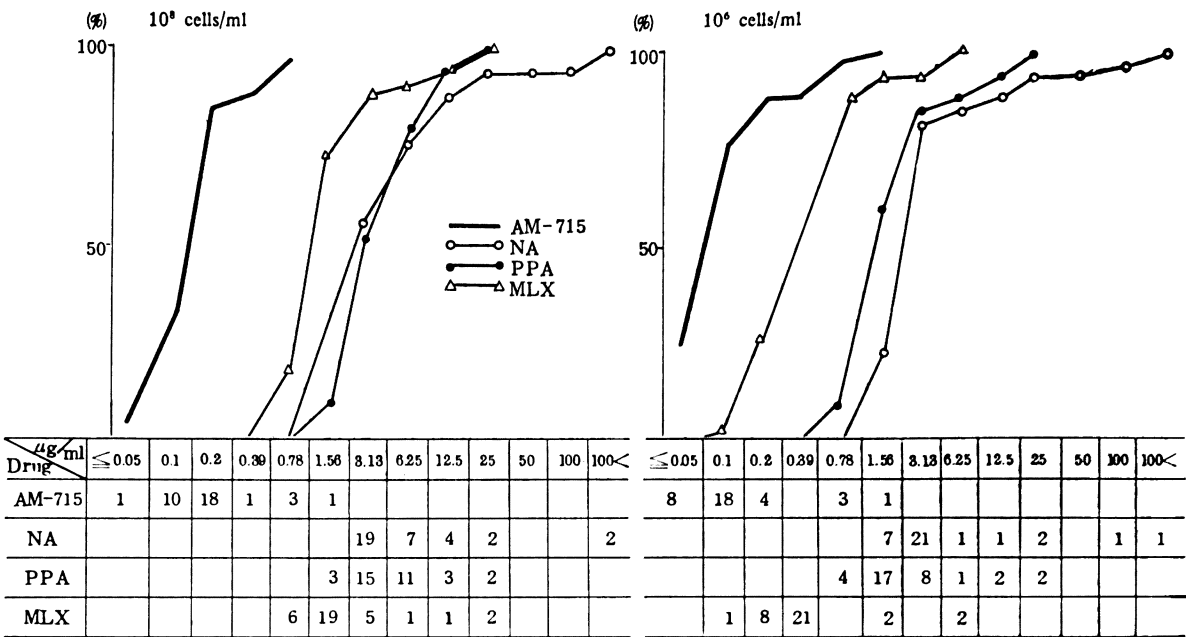


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates
E. cloacae (50 strains)

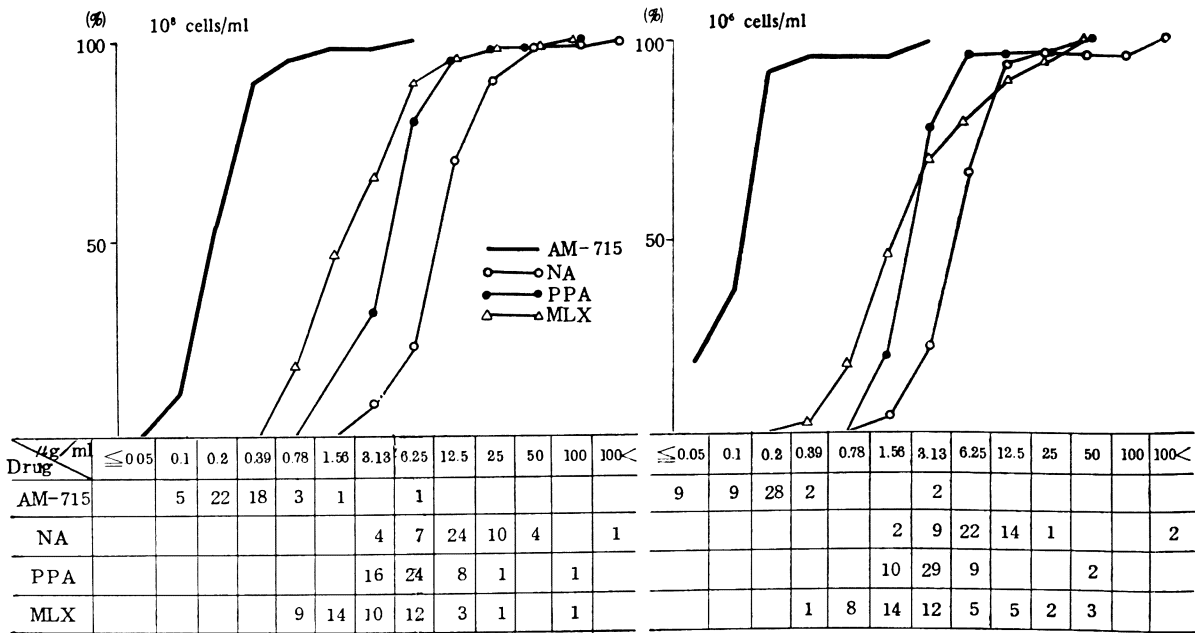


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates
S. marcescens (50 strains)

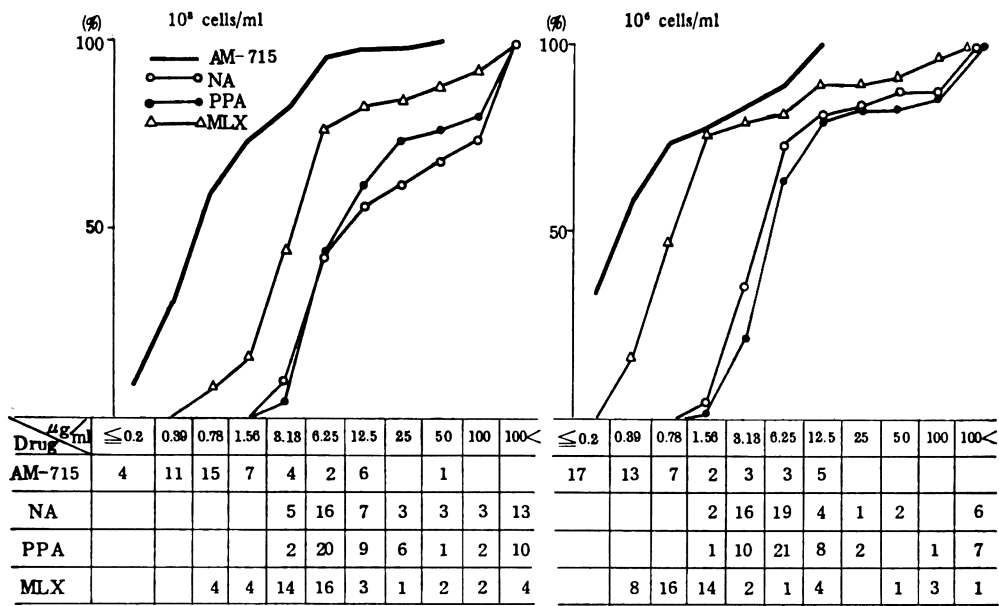


Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. aeruginosa (50 strains)

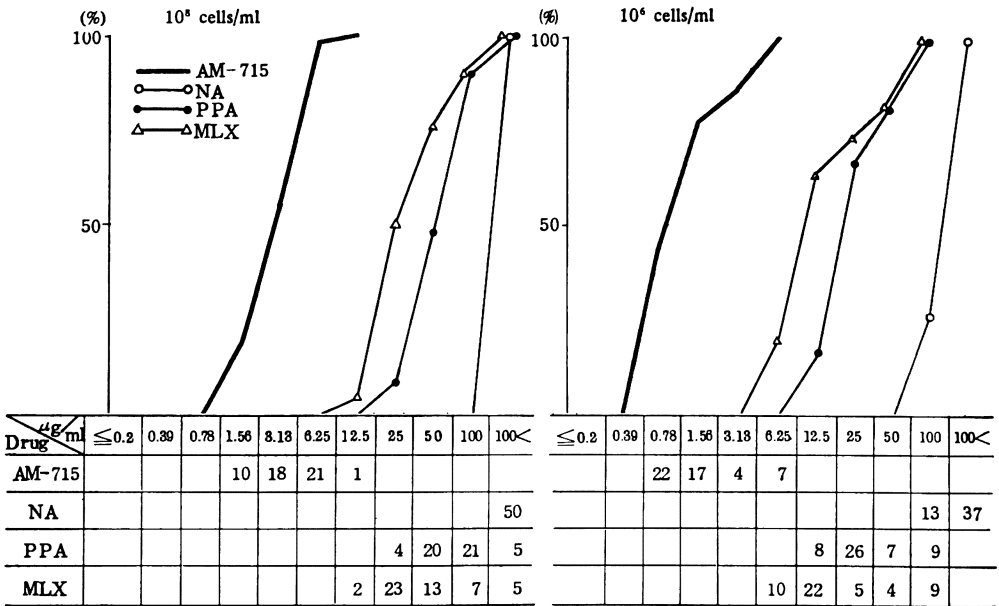


Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. cepacia (17 strains)

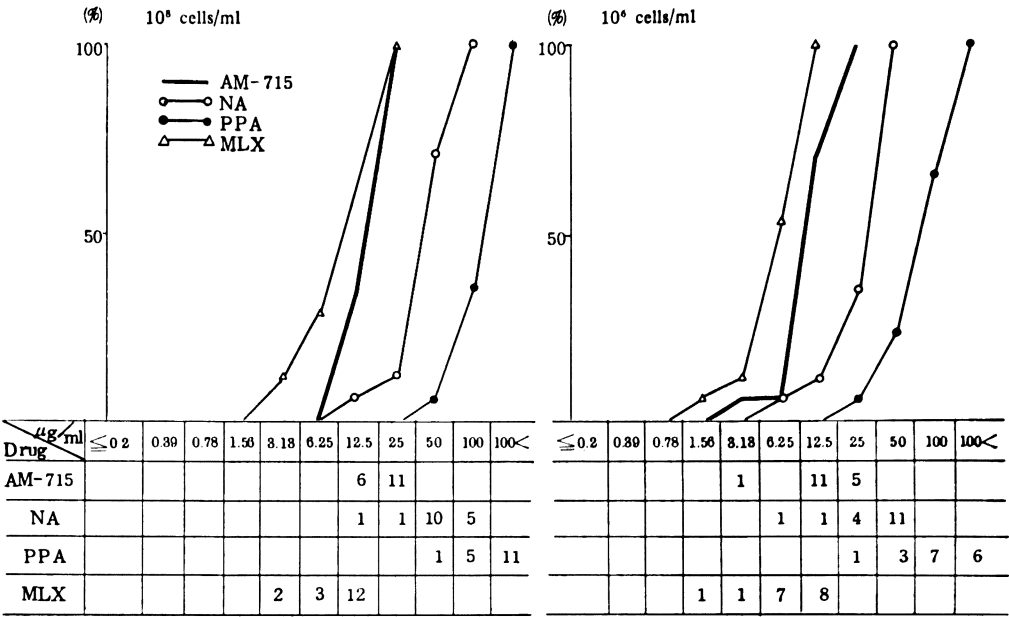


Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates
P. maltophilia (43 strains)

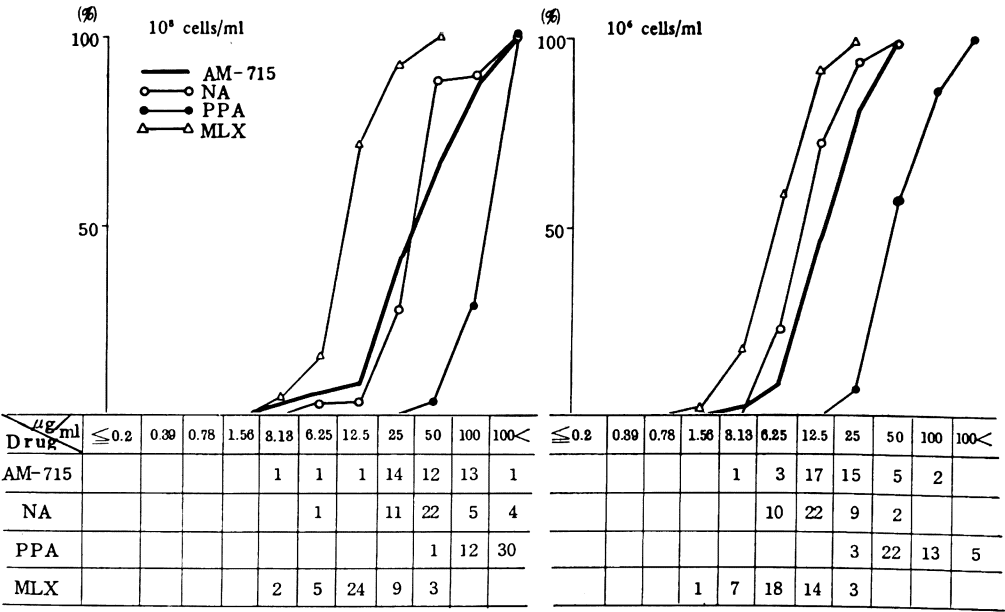


Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates
A. calcoaceticus (39 strains)

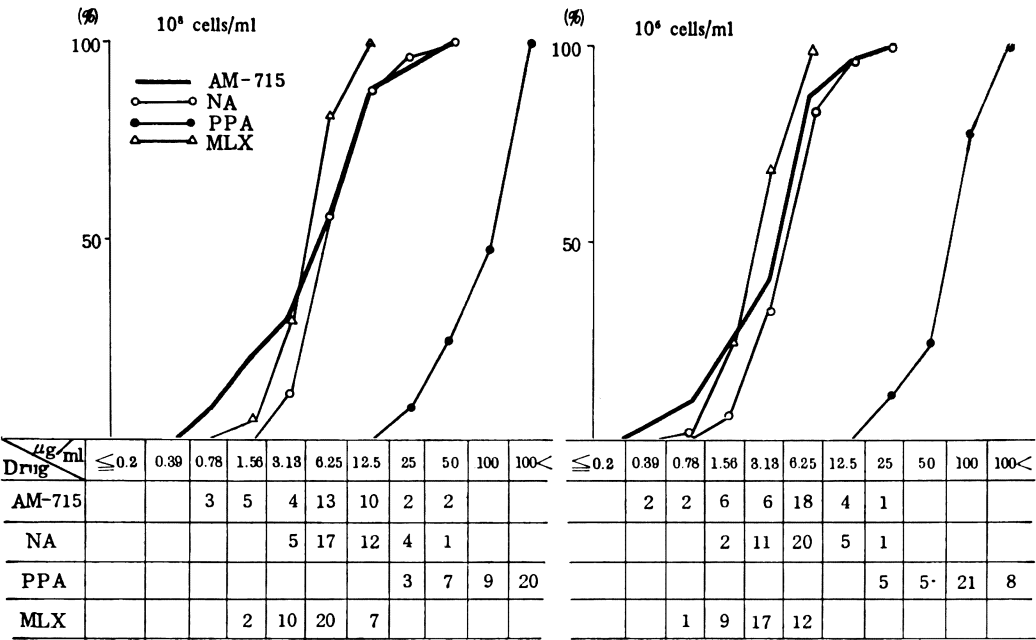


Fig. 16 Sensitivity distribution of clinical isolates
A. faecalis (23 strains)

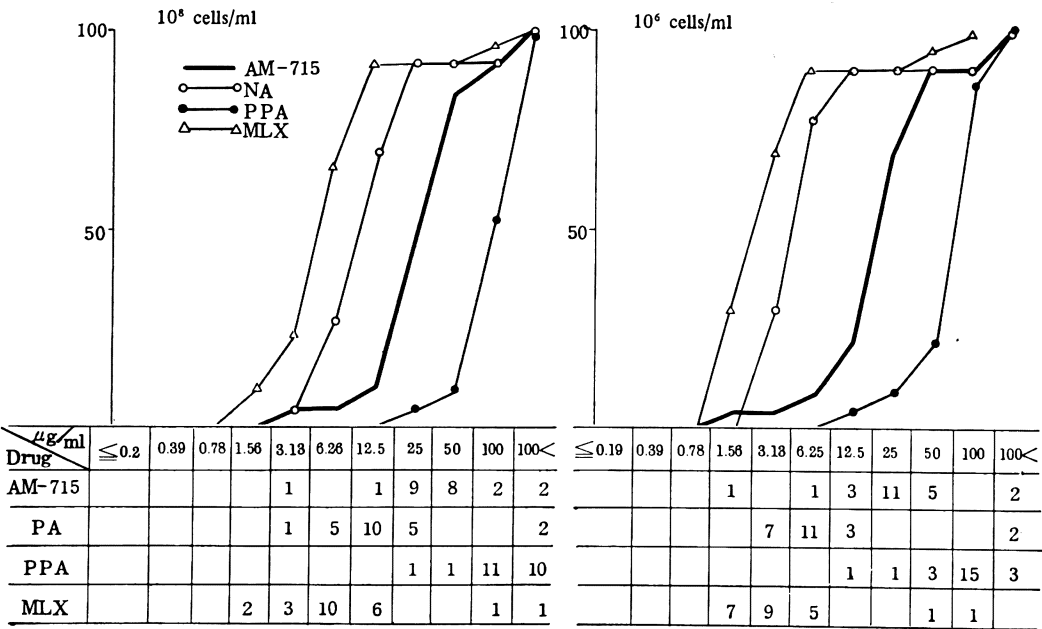
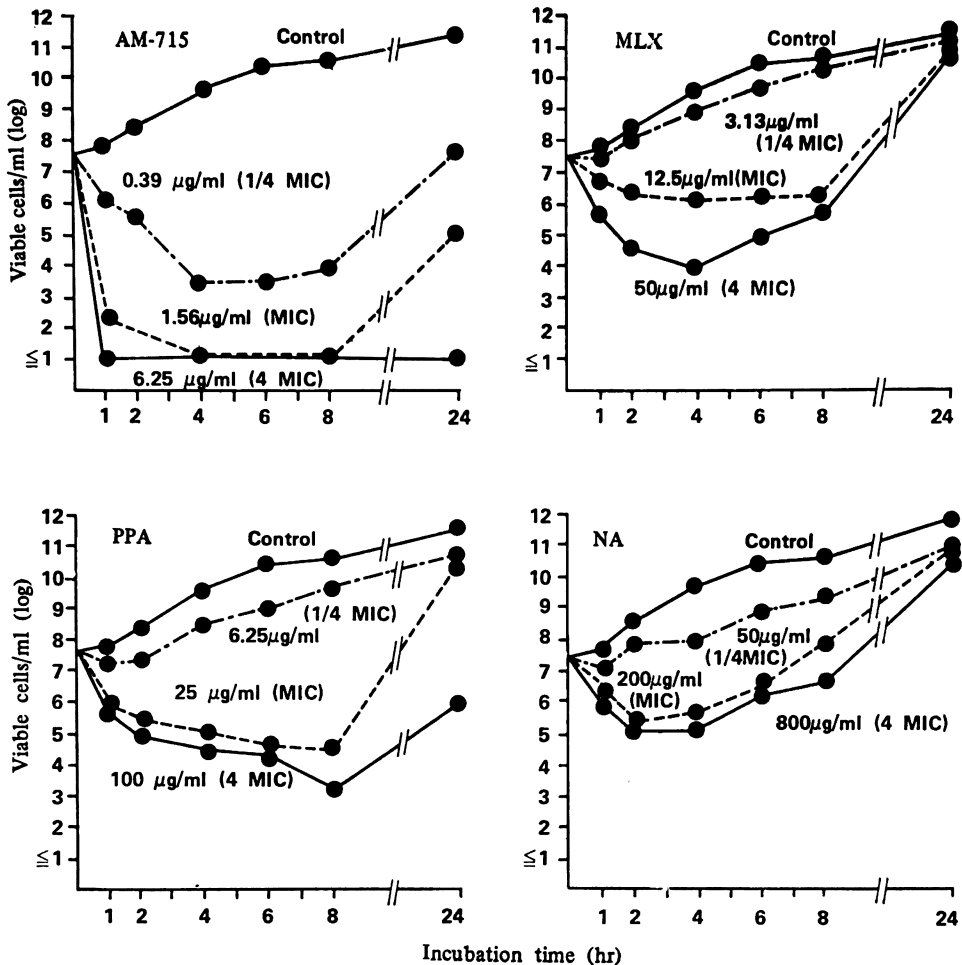


Fig. 19 Bactericidal effect of AM-715, MLX, PPA and NA against *P. aeruginosa* E7



ラム陰性桿菌中とくに腸内細菌科の菌種に抗菌力を示すが、AM-715は *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* 属, *Serratia*, *Enterobacter* 等に対し、他の3剤より *in vitro* ですぐれた抗菌力を有していることが確認された。またグラム陽性菌に対しては、NA, PPA, MLXは抗菌力が弱い、AM-715はグラム陽性菌 (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*) にも抗菌力を有していた。

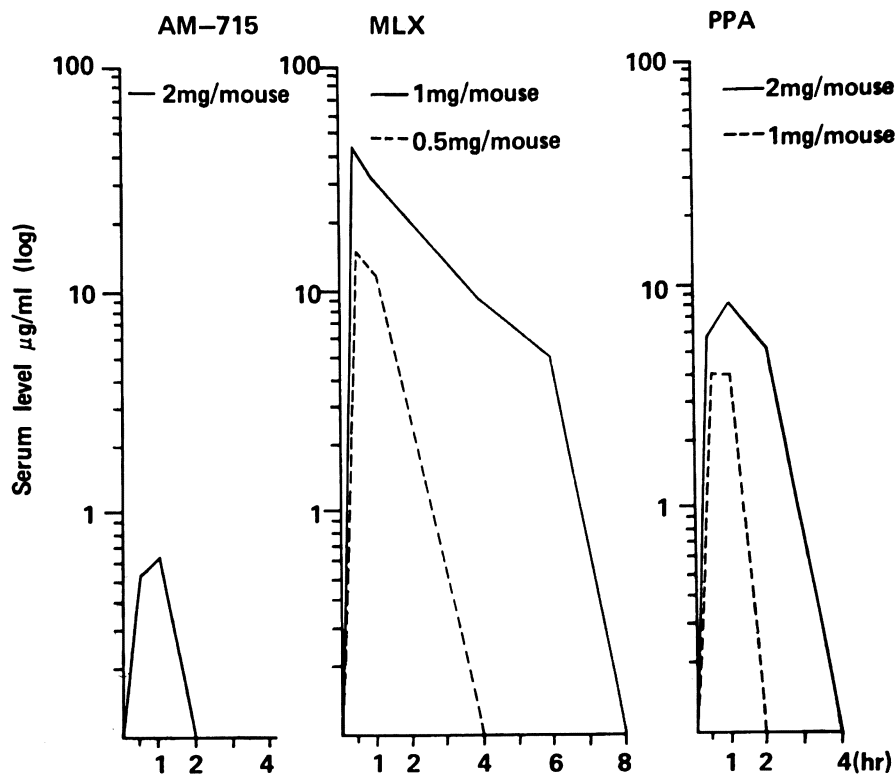
またブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に対しては、特に *P. aeruginosa* に対し AM-715は強い抗菌力を有し、他の2剤より有効であった。

*Serratia*を用いた感染防禦効果実験において、*in vitro* における抗菌作用が強いにもかかわらず、*in vivo* における AM-715の治療効果が他剤に比べ著効を示さない。

しかし感染菌量が少くなると ED_{50} は著しく小さくなり、PPAより小さく、MLXと同等となる。この理由としてマウス血清中濃度が低いことが関与していることが考えられる。

*P. aeruginosa*を用いた感染防禦効果実験において、AM-715の殺菌作用がMLX, PPAよりもすぐれていることが、マウス血清中濃度の低いことをおぎなつて、 ED_{50} 値がMLX, PPAより小さい値を示す結果につながると考えられた。いずれにしても臨床的にはヒト生体内で一定時間有効濃度が維持されれば、抗菌力、殺菌作用の強さから考え、有効性の高い抗菌剤となることが推測された。

Fig. 20 Serum level of mice
administration : p.o.



Method : Paper disk

Drug	Test strains	Medium
AM-715	<i>B. subtilis</i> ATCC6051	Nutrient agar
MLX	<i>E. coli</i> KP	Nutrient agar
PPA	<i>E. coli</i> KP	MÜLLER HINTON agar

文 献

- 1) 第 28 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム III。AM-715, 東京, 1980.
- 2) 日本化学療法学会 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。Chemo-therapy 22: 1126~1128, 1974
- 3) 五島瑤智子, 小川正俊, 辻 明良, 金子康子, 桑原章吾: AB-206 の細菌学的評価とくに *in vitro*, *in vivo* におけるグラム陰性桿菌に対する抗菌作用。Chemo-therapy 26: 7~17, 1978

Table 1 Protecting effect of AM-715 against experimental mice infection
S. marcescens No. 2

Drug	Challenge** dose cells/mouse	Mucin	Administration			MIC (μ g/ml)		ED ₅₀ * mg/mouse
			Route	Number	After the infection (hr)	10 ⁸	10 ⁶	
AM-715	2.4 $\times$ 10 ⁸ 1.2 $\times$ 10 ⁶	- +	p.o.	1	1	1.56	0.39	6.31 0.1
MLX	2.4 $\times$ 10 ⁸ 1.2 $\times$ 10 ⁶	- +	p.o.	1	1	3.13	1.56	0.99 0.08
PPA	2.4 $\times$ 10 ⁸ 1.2 $\times$ 10 ⁶	- +	p.o.	1	1	12.5	6.25	$\geq$ 30 0.26

Mouse : CD-1, 4W, ♂ (19 $\pm$ 1 g) 6 animals/group

Mucin : 5% mucin

*ED₅₀ : BEHRENS KARBER method

**MLD : 1 $\times$ 10⁸ cells/mouse (Mucin -)
1 $\times$ 10⁶ cells/mouse (Mucin +)

Table 2 Protecting effect of AM-715 against experimental mice infection
P. aeruginosa E7

Drug	Challenge** dose cells/mouse	Mucin	Administration			MIC (μ g/ml)		ED ₅₀ * mg/mouse
			Route	Number	After the infection (hr)	10 ⁸	10 ⁶	
AM-715	2.4 $\times$ 10 ⁸ 1.2 $\times$ 10 ⁵	- +	p.o.	1	1	3.13	1.56	>30.0 3.0
MLX	2.4 $\times$ 10 ⁸ 1.2 $\times$ 10 ⁵	- +	p.o.	1	1	6.25	6.25	26.6 3.98
PPA	2.4 $\times$ 10 ⁸ 1.2 $\times$ 10 ⁵	- +	p.o.	1	1	25	25	$\geq$ 30.0 24.3

Mouse : CD-1, 4W, ♂ (19 $\pm$ 1 g) 6 animals/group

Mucin : 5% mucin

*ED₅₀ : BEHRENS KARBER method

**MLD : 1 $\times$ 10⁷ cells/mouse (Mucin -)
1 $\times$ 10⁵ cells/mouse (Mucin +)

THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITIES
AND SERUM LEVELS OF AM-715, A NEW
QUINOLINECARBOXYLIC ACID

SACHIKO GOTO, MASATOSHI OGAWA, YASUKO KANEKO, YUMIKO MUTO and SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, School of Medicine,
Toho University

Experimental evaluation on AM-715, a new oral quinolinecarboxylic acid was made *in vitro* and *in vivo*. The results obtained were as follows.

1. AM-715 showed a broad antibacterial spectrum against gram-positive cocci and negative bacteria, and was confirmed having higher antimicrobial activities against species of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* and *H. influenzae*.

2. Bactericidal effect of AM-715 against *P. aeruginosa* was stronger than those of miloxacin, piperimidic acid and nalidixic acid.

3. *In vivo* protecting effect of AM-715 against *P. aeruginosa* infection in mice was same or superior to that of miloxacin and was superior to that of piperimidic acid.