

## 新しい合成化学療法剤 AM-715 に関する細菌学的評価

西野 武志・後藤 直正・石村富喜子・永田 昌宏・松野 和弘・谷野 輝雄  
京都薬科大学・微生物学教室

今回、私どもは AM-715 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. AM-715 はグラム陽性菌、陰性菌群に対して幅広い抗菌スペクトラムを有し、その抗菌力は NA, PPA および MLX より優れていた。

2. 臨床分離株に対する感受性分布では、*Acinetobacter calcoaceticus* を除くすべての菌種で、AM-715 が最も優れた抗菌力を示し、次いで MLX, PPA, NA の順であった。*A. calcoaceticus* については、MLX が最も優れており、次いで AM-715, NA, PPA の順であった。

3. AM-715 の抗菌力に及ぼす諸因子の影響では、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* とともに、馬血清添加、接種菌量および培地 pH で大きな影響は認められなかった。

4. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* を用いて、抗菌作用型式を検討した結果、すべて殺菌的な作用を示した。

5. マウス実験感染に対する治療効果を *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* を用いて検討したが、*P. aeruginosa* については MLX と同等の効果が、他の菌種については AM-715 が最も優れた効果を示した。

## はじめに

AM-715 は、杏林製薬株式会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-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid といい、既知化学療法剤 nalidixic acid の類縁化合物で、分子式  $C_{16}H_{12}N_3O_3F$ 、分子量 319.33、水に難溶の白色粉末である。その化学構造式は Fig. 1 に示すとおりである。

今回、われわれは AM-715 の細菌学的評価について、nalidixic acid<sup>1)</sup>, pipemidic acid<sup>2,3)</sup> および miloxacin<sup>4)</sup> を比較薬として、種々の細菌学的検討を行ない、2, 3 の知見を得たので報告する。

## I. 実験材料および実験方法

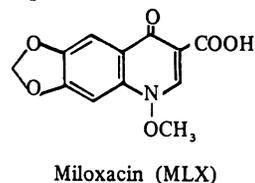
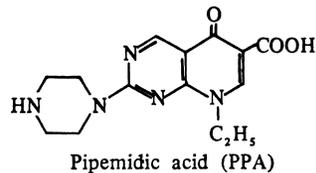
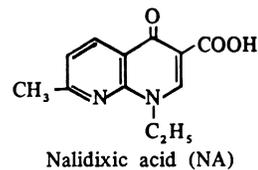
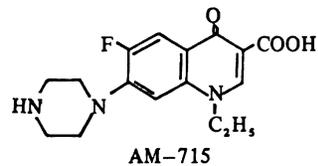
## 1. 使用薬

薬としては AM-715, miloxacin (MLX), nalidixic acid (NA) および pipemidic acid (PPA) 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: ニッセイ), 感受性測定に Heart Infusion Agar (HIA: ニッセイ) の培地を用いて、日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法<sup>5)</sup> に準じて求めた。なお、

Fig. 1 Chemical structure of nalidixic acid analogue



*Streptococcus* 群については、10% 馬血液加 HIA を、嫌気性菌群の *Clostridium tetani*, *C. perfringens* には、Thioglycollate 培地 (TGC: ニッスイ) を、*Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* には、GC 培地 (ニッスイ) を用いた。

### 3. 臨床分離株の薬剤に対する感受性分布

臨床材料から分離された *Staphylococcus aureus* 51株, *Escherichia coli* 57株, *Klebsiella pneumoniae* 63株, *Proteus mirabilis* 22株, *P. vulgaris* 22株, *P.morganii* 27株, *P. rettgeri* 16株, *Pseudomonas aeruginosa* 52株, *Serratia marcescens* 67株, *Acinetobacter calcoaceticus* 21株および *Enterobacter* sp. 18株について、日本化学療法学会 MIC 測定法に準じて、感受性測定を行なった。

### 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, *P. aeruginosa* E-2 を試験菌として Heart Infusion Broth (HIB: ニッスイ) を用いて液体希釈法 (37°C, 18~20時間培養) により検討を行なった。

### 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、対数期中期まで振とう培養し、所定の濃度になるように薬を添加し、以後、経時的に生菌数を測定した。

### 6. マウス実験感染に対する治療効果

#### (a) *E. coli* 感染に対する治療効果

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 (Orthana-kemisk-Fabrik A/S) と等量混合した。この菌液の 260 LD<sub>50</sub> を 1群10匹の ddY 系マウス (16±1g) 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 AM-715, NA, PPA および MLX を経口投与した。その後、7日間生死の観察を行ない、生残率を求め、LITCHFIELD-WILCOXON 法<sup>6)</sup> によって ED<sub>50</sub> 値を算出した。

#### (b) *K. pneumoniae* 感染に対する治療効果

臨床分離の *K. pneumoniae* KC-1 を NB にて 37°C, 18時間培養し、NB で希釈した後、6% Gastric mucin と等量混合した。この菌液の 430 LD<sub>50</sub> 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、AM-715, NA, PPA および MLX を経口投与した。

#### (c) *S. marcescens* 感染に対する治療効果

臨床分離の *S. marcescens* T-55 を NB にて 37°C, 18時間振盪培養し、NB で希釈した後、6% Gastric mucin と等量混合した。この菌液の 300 LD<sub>50</sub> 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、AM-715,

NA, PPA および MLX を経口投与した。

#### (d) *P. aeruginosa* 感染に対する治療効果

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 23LD<sub>50</sub> 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、AM-715, NA, PPA および MLX を経口投与した。

## II. 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を、Table 1, 2, 3, 4 に示した。

AM-715 は、グラム陽性菌群に対しても非常に優れた抗菌力を示し、特に従来の合成化学療法剤に耐性であった菌種にも高い抗菌力を示した。しかし、*Micrococcus luteus* に対しては 100 μg/ml と耐性であった。グラム陰性菌群についても、他の3薬に比べて約10倍以上の強い抗菌力を示し、*P. aeruginosa* に対しても優れた抗菌力を示した。

グラム陽性、陰性菌群共に、接種菌量 (10<sup>8</sup>, 10<sup>6</sup> cells/ml) により感受性に差が見られなかった。

### 2. 臨床分離株の薬剤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* 51株, *E. coli* 57株, *K. pneumoniae* 63株, *P. mirabilis* 22株, *P. vulgaris* 22株, *P.morganii* 27株, *P. rettgeri* 16株, *P. aeruginosa* 52株, *S. marcescens* 67株, *A. calcoaceticus* 21株および *Enterobacter* sp. 18株の感受性分布、累積分布を検討した結果を Fig. 2~23 に示した。

#### (a) *S. aureus* の場合

接種菌量が 10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 2 に示すように、AM-715 は 0.78~3.13 μg/ml にすべての株が分布し、NA では約 60% が 100 μg/ml に、残りが >100 μg/ml の耐性であった。PPA では約 90% が 50~100 μg/ml に分布し、MLX では 12.5~50 μg/ml に分布した。10<sup>6</sup> cells/ml の場合は Fig. 3 に示すように、10<sup>8</sup> cells/ml に比べ感受性のパターンに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 AM-715 > MLX > PPA > NA の順に優れていた。

#### (b) *E. coli* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 4 に示すように、AM-715 では 0.02~0.09 μg/ml にほとんどの株が分布し、MLX では 0.78~1.56 μg/ml, PPA では 1.56 μg/ml, NA では 1.56~12.5 μg/ml に分布した。10<sup>6</sup> cells/ml の場合は、Fig. 5 に示すように 10<sup>8</sup> cells/ml と同様に、AM-715 の

Table 1 Antibacterial spectrum (Gram-positive bacteria)

Strains	(10 <sup>8</sup> cells/ml)			
	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	1.56	>100	25	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.39	50	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.78	>100	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.78	100	50	25
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.78	100	50	25
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80(PC-R)	0.78	50	100	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.13	>100	100	100
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	1.56	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK*	3.13	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I*	1.56	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II**	3.13	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III***	1.56	>100	>100	>100
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.78	25	6.25	3.13
<i>Bacillus anthracis</i>	0.39	6.25	6.25	3.13
<i>Clostridium tetani</i> **	3.13	12.5	12.5	1.56
<i>Clostridium perfringens</i> **	6.25	50	50	6.25

MIC: µg/ml

\*Heart infusion agar supplemented with 10% horse blood

\*\*Thioglycollate medium

Table 2 Antibacterial spectrum (Gram-positive bacteria)

Strains	(10 <sup>6</sup> cells/ml)			
	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.78	>100	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.39	25	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.39	100	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.78	50	25	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.78	50	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> KO.80(PC-R)	0.78	25	50	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.56	>100	50	25
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	1.56	>100	100	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK*	1.56	>100	100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I*	1.56	>100	100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II*	1.56	>100	100	>100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III*	1.56	>100	100	>100
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	12.5	6.25	1.56
<i>Bacillus anthracis</i>	0.39	6.25	1.56	3.13

MIC: µg/ml

\*Heart infusion agar supplemented with 10% horse blood

Table 3 Antibacterial spectrum (Gram-negative bacteria)

Strains	(10 <sup>8</sup> cells/ml)			
	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0.025	3.13	1.56	0.78
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.05	0.78	0.78	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.05	6.25	1.56	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.025	50	3.13	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.09	12.5	3.13	1.56
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.09	6.25	3.13	0.78
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.025	3.13	1.56	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.19	6.25	3.13	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.19	6.25	3.13	1.56
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.09	3.13	1.56	3.13
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.19	6.25	3.13	1.56
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.05	3.13	1.56	1.56
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.05	3.13	1.56	0.78
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.39	3.13	6.25	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.09	3.13	3.13	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.09	3.13	3.13	0.39
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.19	6.25	1.56	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.19	6.25	1.56	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10001	0.19	6.25	3.13	0.39
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.05	3.13	1.56	0.78
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.39	6.25	6.25	0.78
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.09	3.13	6.25	0.78
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.09	6.25	6.25	0.39
<i>Proteus morgani</i> KONO	0.39	6.25	3.13	0.39
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.05	1.56	1.56	0.19
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.19	6.25	3.13	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	3.13	>100	25	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	3.13	>100	25	50

MIC:  $\mu\text{g/ml}$ 

\*GC Medium

抗菌力が極めて強く、次いで MLX, PPA, NA の順であった。

(c) *K. pneumoniae* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 6 に示すように AM-715 では、0.19~0.78  $\mu\text{g/ml}$  に 90% 以上の株が分布した。MLX, PPA および NA では、それぞれ 0.78~3.13  $\mu\text{g/ml}$ , 3.13~12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 6.25~25  $\mu\text{g/ml}$  に大半の株が分布し、AM-715 が最も優れた抗菌力を示した。10<sup>6</sup> cells/ml の場合は、Fig. 7 に示すように 10<sup>8</sup> cells/ml の場合と同様に、AM-715>MLX>PPA>NA の順で抗菌力が優れていた。

(d) *P. mirabilis* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 8 に示すように AM-715 では 0.19~0.78  $\mu\text{g/ml}$  に、MLX では 0.39~0.78  $\mu\text{g/ml}$  に、PPA では 3.13~6.25  $\mu\text{g/ml}$  に、NA では 6.25~25  $\mu\text{g/ml}$  にほとんどの株が分布し、AM-715>MLX>PPA>NA の順で抗菌力が優れており、これは Fig. 9 に示すように 10<sup>6</sup> cells/ml の場合も同様であった。

(e) *P. vulgaris* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 10 に示すように AM-715 は 0.05~0.19  $\mu\text{g/ml}$ , MLX では 0.19~0.39  $\mu\text{g/ml}$ , PPA では 1.56~3.13  $\mu\text{g/ml}$  に、NA では 3.13~6.25  $\mu\text{g/ml}$  に大

Table 4 Antibacterial spectrum (Gram-negative bacteria)

Strains	(10 <sup>6</sup> cells/ml)			
	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0.025	1.56	0.78	0.78
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.025	0.78	0.78	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.05	6.25	1.56	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.025	12.5	1.56	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.05	6.25	1.56	1.56
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.05	3.13	3.13	0.39
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.012	1.56	1.56	0.39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.025	1.56	1.56	0.78
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.09	3.13	0.78	0.78
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.05	3.13	1.56	0.78
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.09	3.13	1.56	0.78
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.05	1.56	1.56	0.78
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.05	1.56	1.56	0.39
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.09	1.56	1.56	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.09	1.56	1.56	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.05	1.56	1.56	0.39
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.09	3.13	0.78	0.39
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.09	3.13	3.13	0.39
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10001	0.025	3.13	1.56	0.39
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.39	3.13	3.13	0.78
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.05	3.13	3.13	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.09	3.13	3.13	0.39
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.09	3.13	3.13	0.39
<i>Proteus morgani</i> KONO	0.025	0.78	1.56	0.19
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 118	0.09	6.25	3.13	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	1.56	>100	12.5	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	0.78	>100	12.5	25

MIC:  $\mu\text{g/ml}$ 

\*GC Medium

半の株が分布していた。10<sup>6</sup> cells/ml の場合は Fig. 11 に示すように 10<sup>8</sup> cells/ml と大きな変動は見られず同様の傾向を示した。

(f) *P. morgani* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 12 に示すように AM-715 では 0.09~0.78  $\mu\text{g/ml}$  に、MLX では 0.19~6.25  $\mu\text{g/ml}$  に、PPA では 1.56~25  $\mu\text{g/ml}$  に、NA では 3.13~25  $\mu\text{g/ml}$  に多くの株が分布し、AM-715>MLX>PPA>NA の順で抗菌力が優れていた。10<sup>6</sup> cells/ml の場合も Fig. 13 に示すように、ほぼ同様であった。

(g) *P. rettgeri* の場合

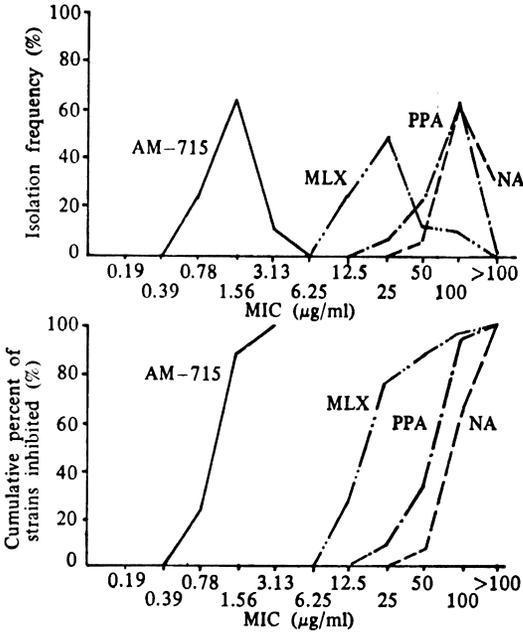
10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 14 に示すように、AM-715

は 0.39~0.78  $\mu\text{g/ml}$  と 3.13~6.25  $\mu\text{g/ml}$  に二峰性のピークを有し、MLX は 0.78~50  $\mu\text{g/ml}$  に広く分布し、PPA は 3.13~6.25  $\mu\text{g/ml}$  と 25~100  $\mu\text{g/ml}$  の二峰性のピークを、NA は 3.13~6.25  $\mu\text{g/ml}$  と 25~100  $\mu\text{g/ml}$  の二峰性のピークを示していた。10<sup>6</sup> cells/ml では Fig. 15 に示すように AM-715 ではピークが 0.05~0.09  $\mu\text{g/ml}$  に変動し、NA、PPA および MLX ではほとんど変化は認められなかった。

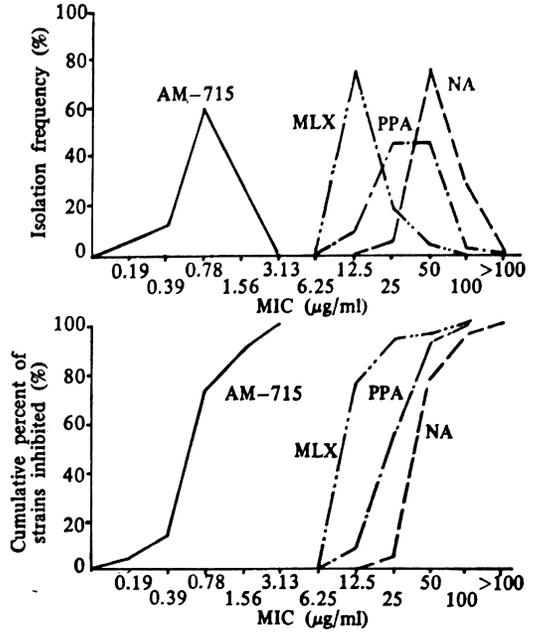
(h) *S. marcescens* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 16 に示すように、AM-715 では 0.09~3.13  $\mu\text{g/ml}$  に、MLX では 0.78~6.25  $\mu\text{g/ml}$  に、NA では 1.56~2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、PPA では 3.13~12.5  $\mu\text{g/ml}$

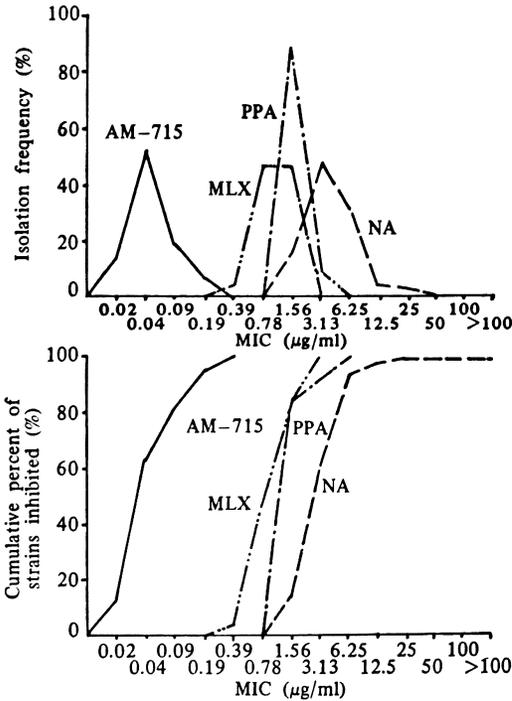
**Fig. 2** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Staphylococcus aureus* 51 strains ( $10^8$  cells/ml)



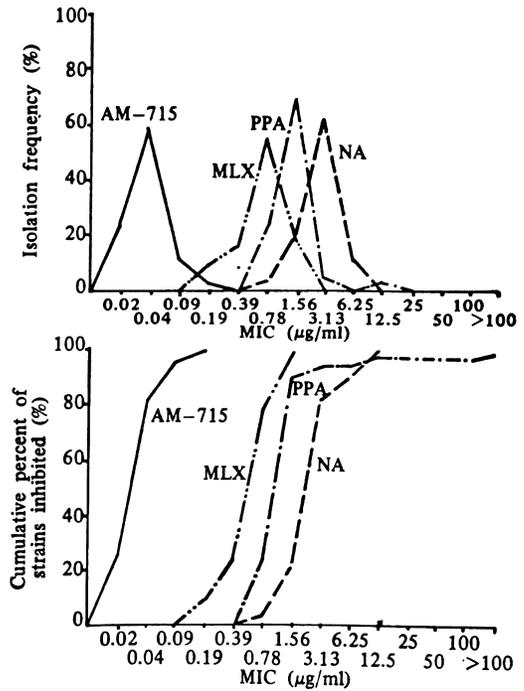
**Fig. 3** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Staphylococcus aureus* 51 strains ( $10^6$  cells/ml)



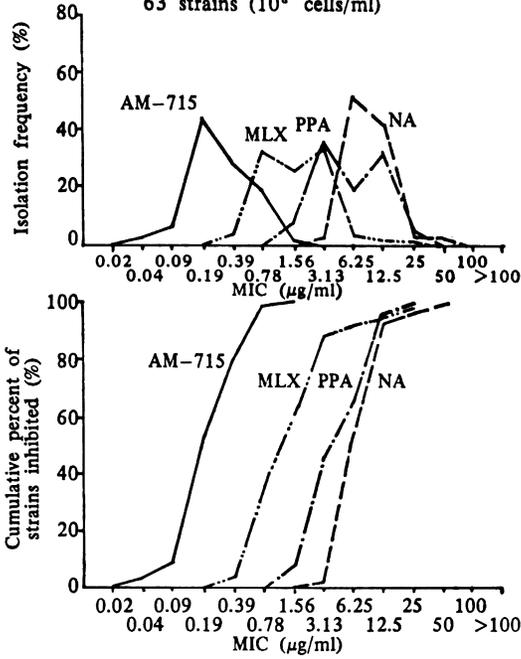
**Fig. 4** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Escherichia coli* 57 strains ( $10^8$  cells/ml)



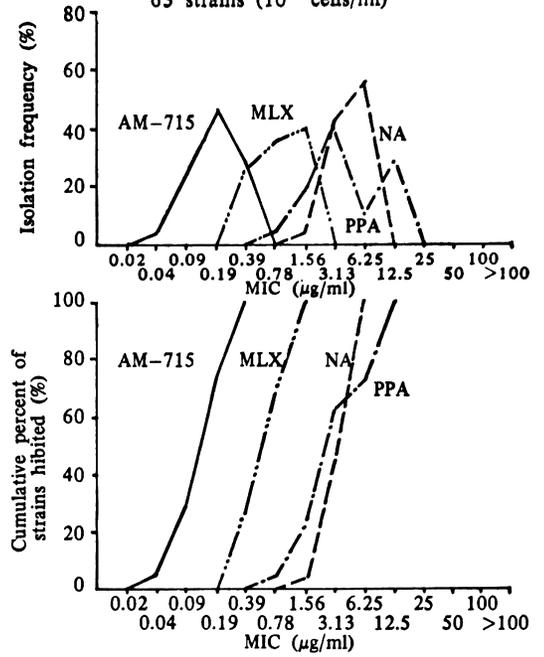
**Fig. 5** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Escherichia coli* 57 strains ( $10^6$  cells/ml)



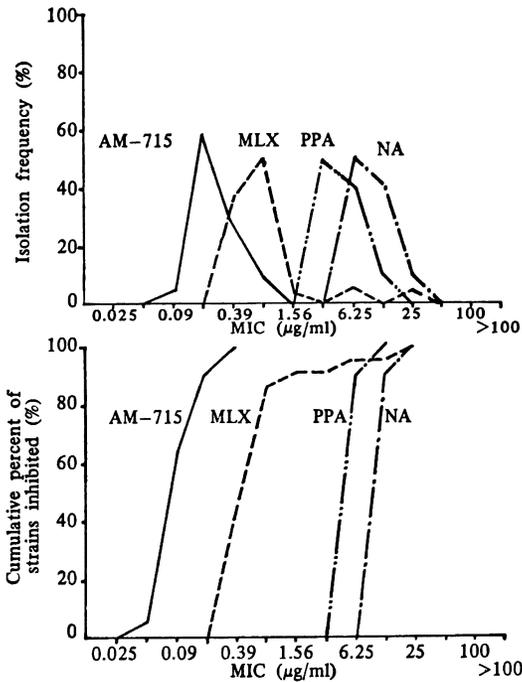
**Fig. 6** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Klebsiella pneumoniae* 63 strains ( $10^8$  cells/ml)



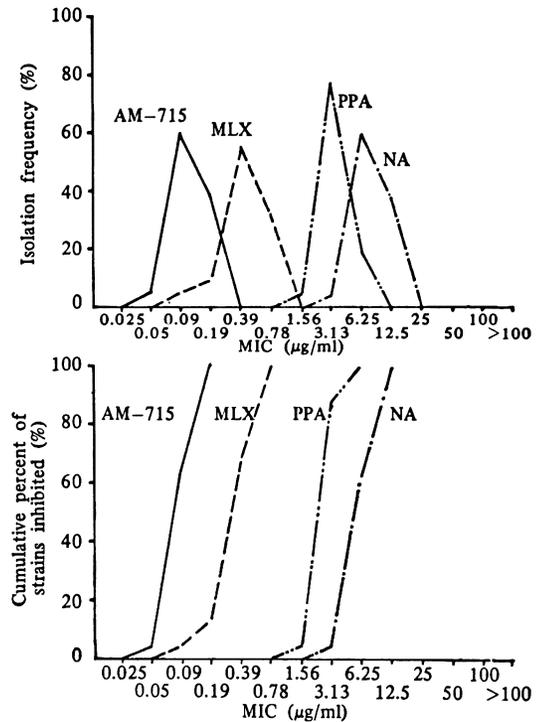
**Fig. 7** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Klebsiella pneumoniae* 63 strains ( $10^8$  cells/ml)



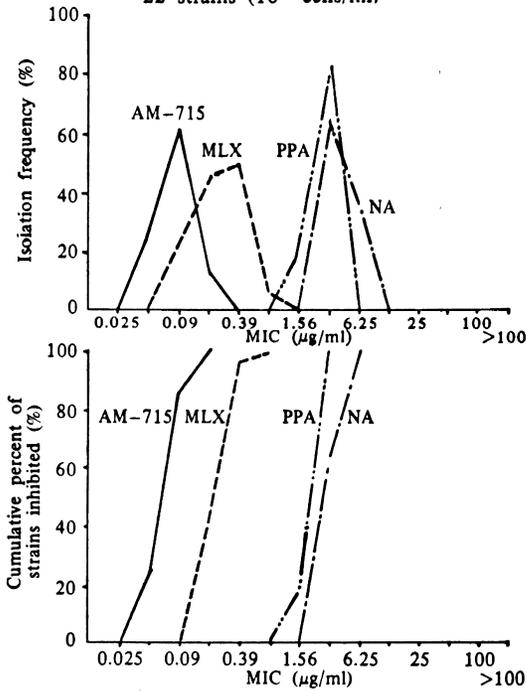
**Fig. 8** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus mirabilis* 22 strains ( $10^8$  cells/ml)



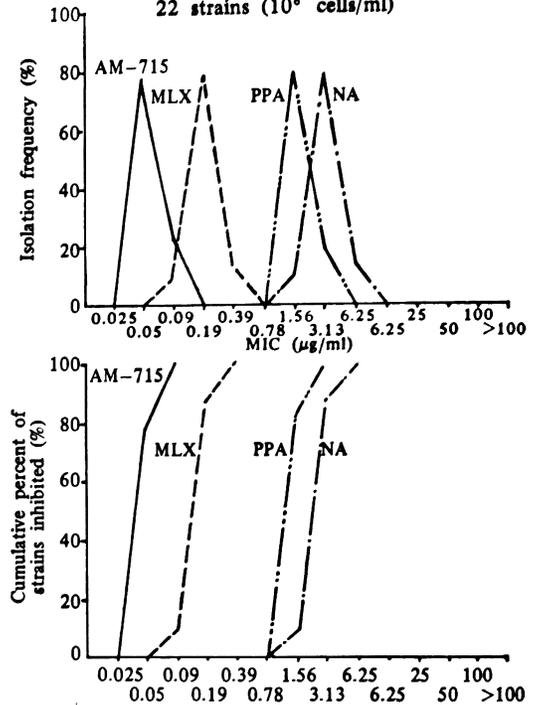
**Fig. 9** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus mirabilis* 22 strains ( $10^6$  cells/ml)



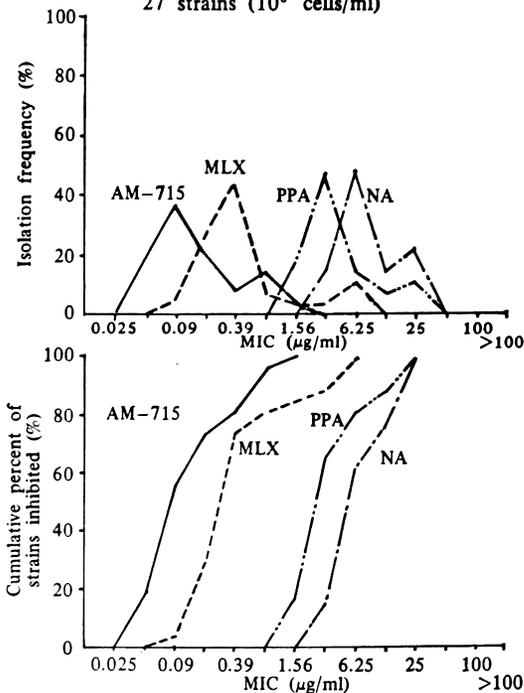
**Fig. 10** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus vulgaris* 22 strains ( $10^8$  cells/ml)



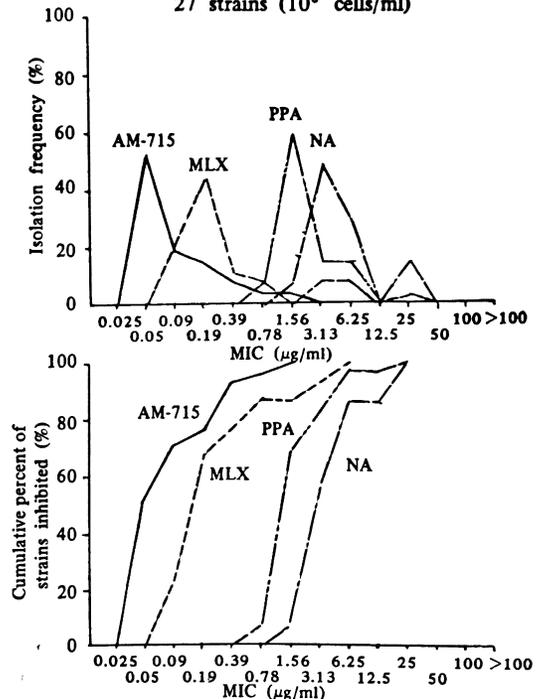
**Fig. 11** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus vulgaris* 22 strains ( $10^6$  cells/ml)



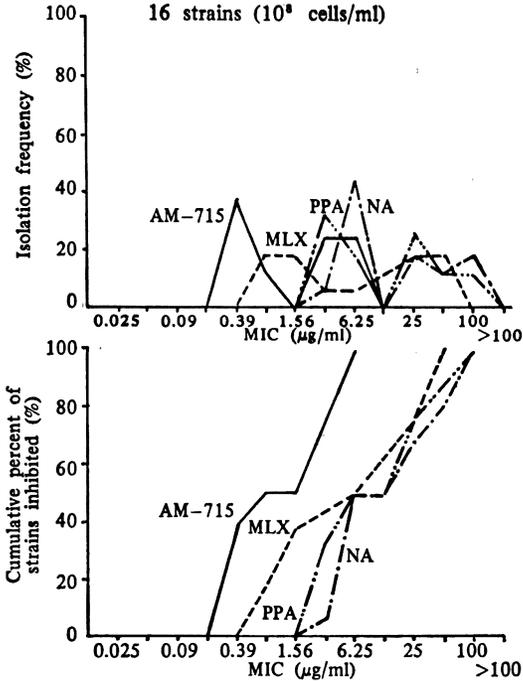
**Fig. 12** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteusmorganii* 27 strains ( $10^8$  cells/ml)



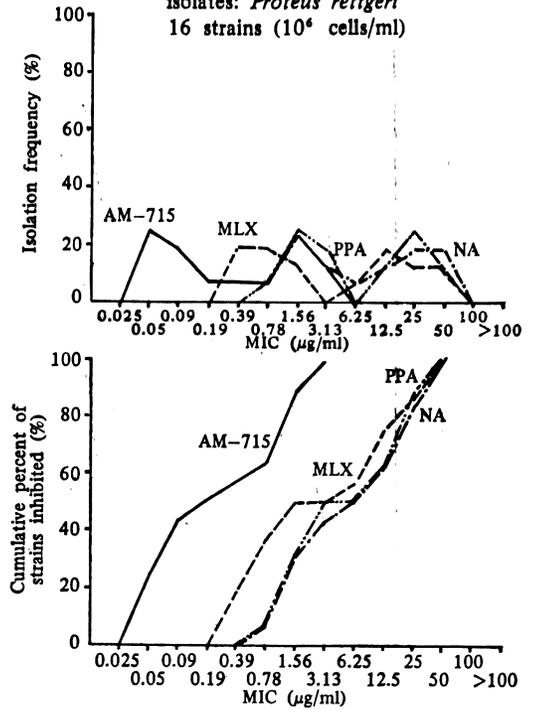
**Fig. 13** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteusmorganii* 27 strains ( $10^6$  cells/ml)



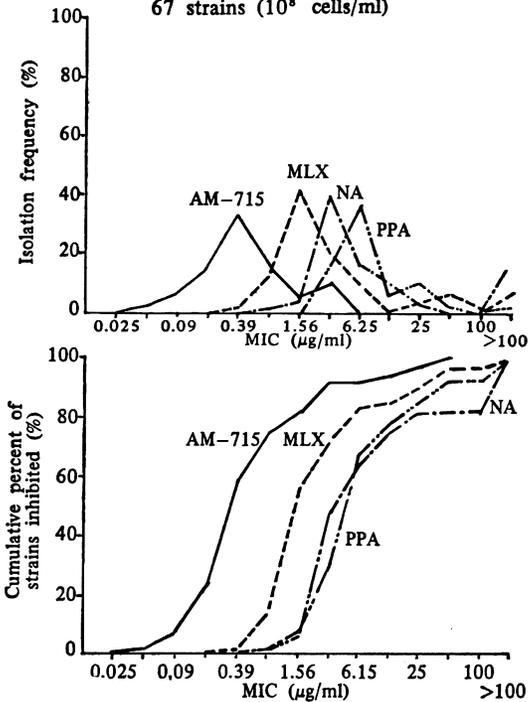
**Fig. 14** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus rettgeri* 16 strains ( $10^8$  cells/ml)



**Fig. 15** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus rettgeri* 16 strains ( $10^6$  cells/ml)



**Fig. 16** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Serratia marcescens* 67 strains ( $10^8$  cells/ml)



**Fig. 17** Sensitivity distribution of clinical isolates: *Serratia marcescens* 67 strains ( $10^6$  cells/ml)

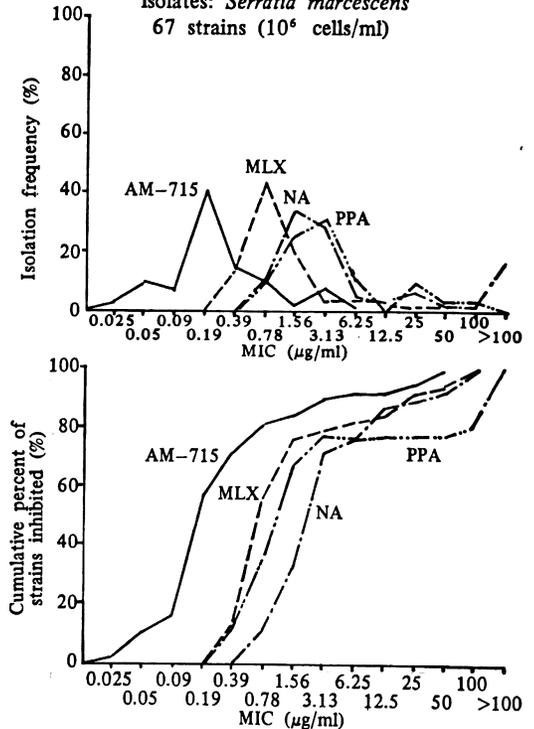


Fig. 18 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Pseudomonas aeruginosa* 52 strains ( $10^8$  cells/ml)

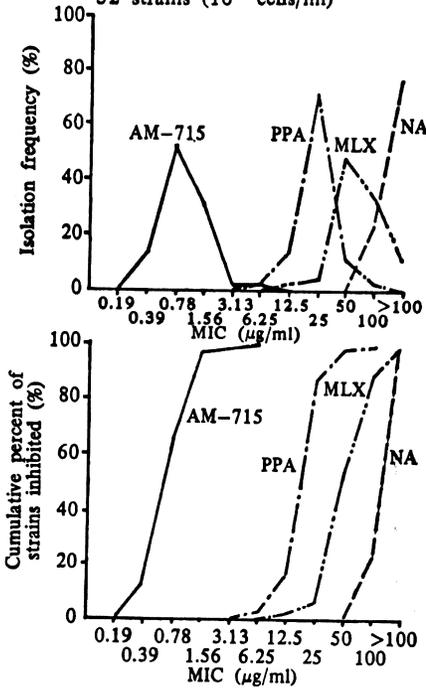


Fig. 19 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Pseudomonas aeruginosa* 52 strains ( $10^6$  cells/ml)

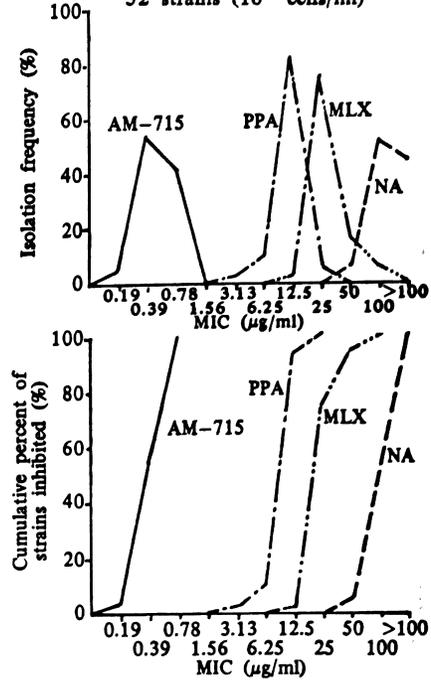


Fig. 20 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Acinetobacter calcoaceticus* 21 strains ( $10^8$  cells/ml)

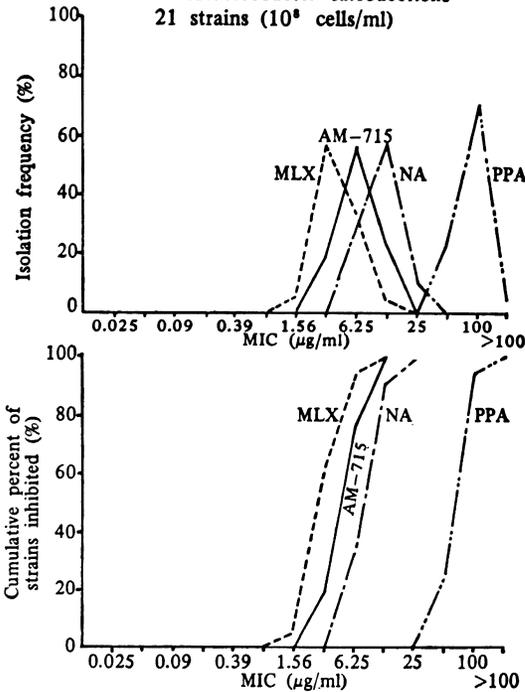


Fig. 21 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Acinetobacter calcoaceticus* 21 strains ( $10^6$  cells/ml)

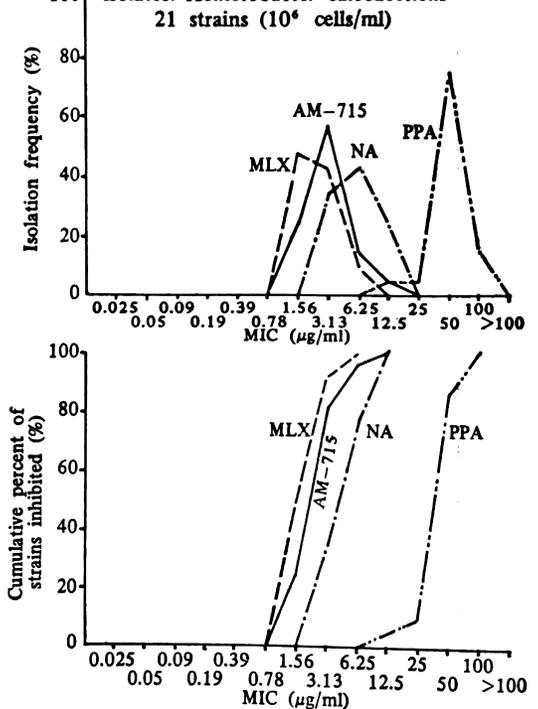


Fig. 22 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Enterobacter* sp. 18 strains ( $10^8$  cells/ml)

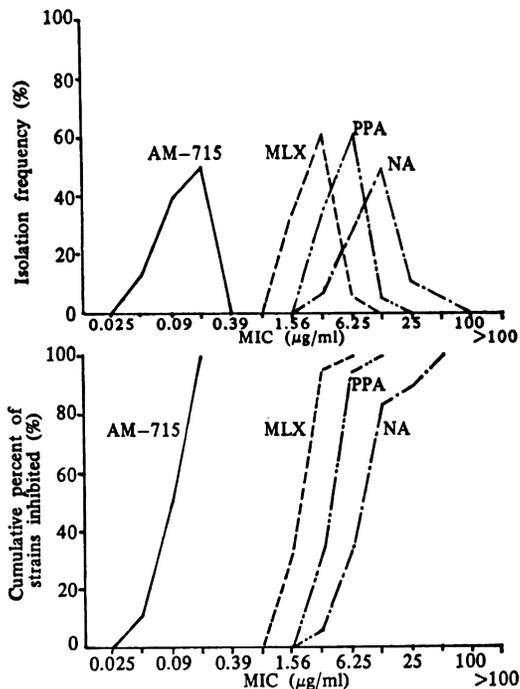


Fig. 23 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Enterobacter* sp. 18 strains ( $10^9$  cells/ml)

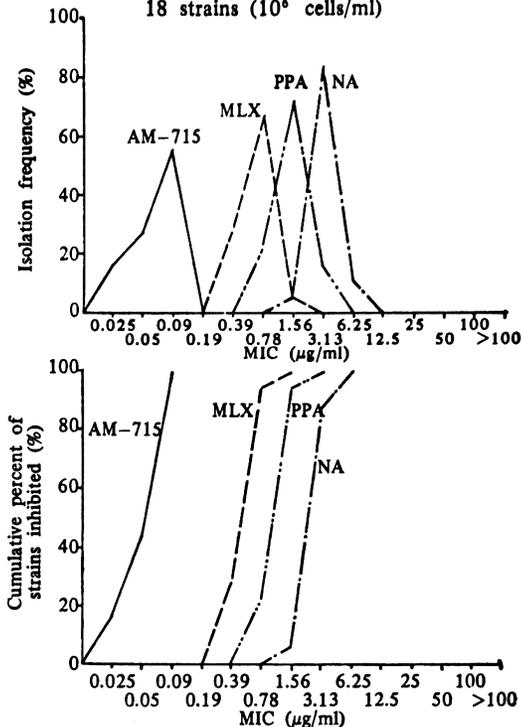


Fig. 24 Effect of AM-715 on viability of *E. coli* NIH JC-2

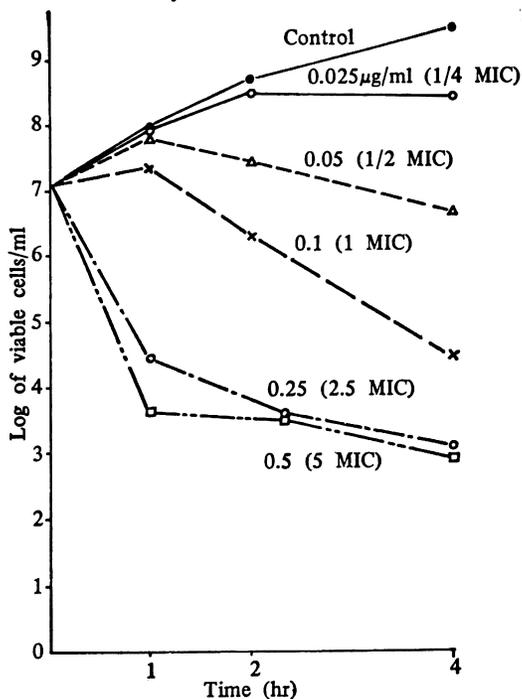


Fig. 25 Effect of NA on viability of *E. coli* NIH JC-2

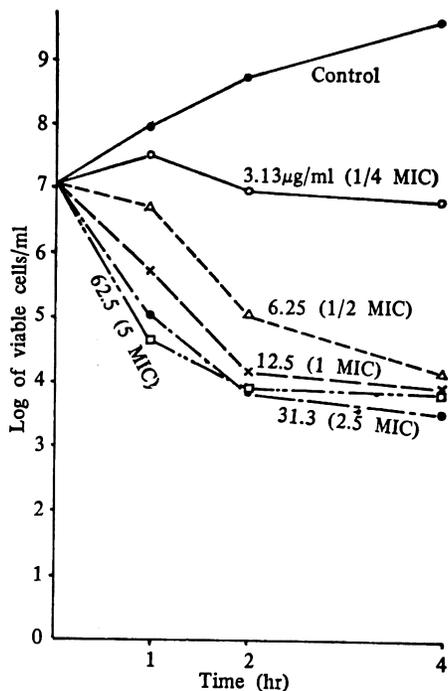


Table 5 Effect of medium pH on the antibacterial activity

Organism	Medium pH	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>E. coli</i> NIH JC-2	6.0	0.1	3.13	6.25	0.39
	7.0	0.2	6.25	6.25	0.78
	8.0	0.1	6.25	6.25	0.39
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	6.0	0.012	0.78	3.13	0.2
	7.0	0.012	1.56	1.56	0.2
	8.0	0.025	1.56	1.56	0.2
<i>P. aeruginosa</i> E-2	6.0	0.78	>100	25	50
	7.0	0.78	>100	12.5	100
	8.0	0.39	>100	25	100

Table 6 Effect of horse serum on the antibacterial activity

Organism	Horse serum (%)	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>E. coli</i> NIH JC-2	50	0.05	12.5	12.5	0.39
	10	0.1	3.13	6.25	0.39
	0	0.2	6.25	6.25	0.78
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	50	0.1	6.25	1.56	0.78
	10	0.05	3.13	1.56	0.39
	0	0.05	1.56	1.56	0.39
<i>P. aeruginosa</i> E-2	50	0.78	>100	25	50
	10	0.39	>100	25	50
	0	0.39	>100	25	50

Table 7 Effect of inoculum size on the antibacterial activity

Organism	Inoculum size (cells/ml)	AM-715	NA	PPA	MLX
<i>E. coli</i> NIH JC-2	$1.2 \times 10^7$	0.09	12.5	3.13	3.13
	$1.2 \times 10^6$	0.05	6.25	3.13	1.56
	$1.2 \times 10^5$	0.05	6.25	3.13	1.56
	$1.2 \times 10^4$	0.025	6.25	1.56	0.78
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	$3.3 \times 10^7$	0.19	6.25	3.13	3.13
	$3.3 \times 10^6$	0.09	3.13	3.13	1.56
	$3.3 \times 10^5$	0.09	3.13	1.56	1.56
	$3.3 \times 10^4$	0.05	3.13	1.56	0.78
<i>P. aeruginosa</i> E-2	$2.5 \times 10^7$	6.25	>100	50	25
	$2.5 \times 10^6$	3.13	>100	25	25
	$2.5 \times 10^5$	3.13	>100	25	25
	$2.5 \times 10^4$	1.56	100	25	12.5

Fig. 26 Effect of PPA on viability of *E. coli* NIH JC-2

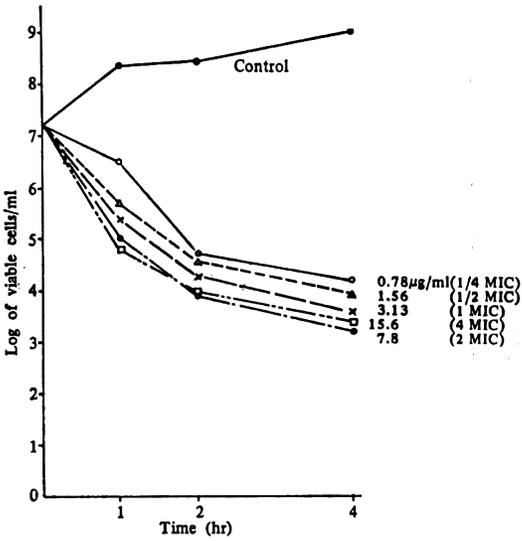


Fig. 27 Effect of MLX on viability of *E. coli* NIH JC-2

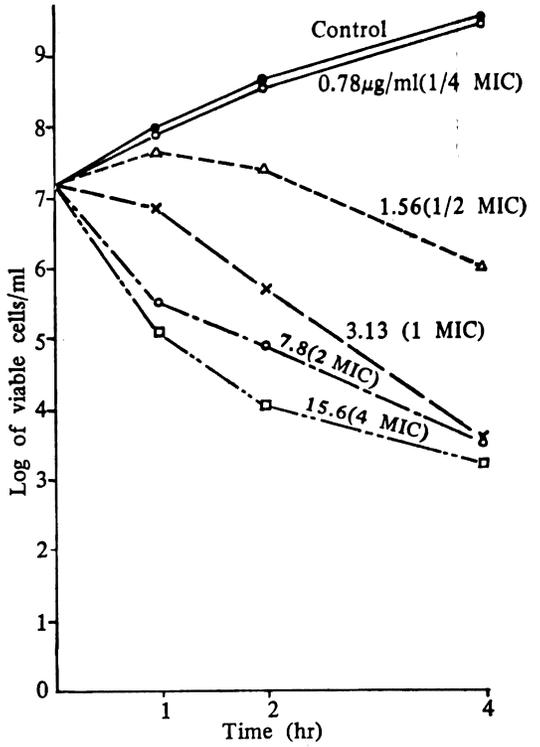


Fig. 28 Effect of AM-715 on viability of *K. pneumoniae* KC-1

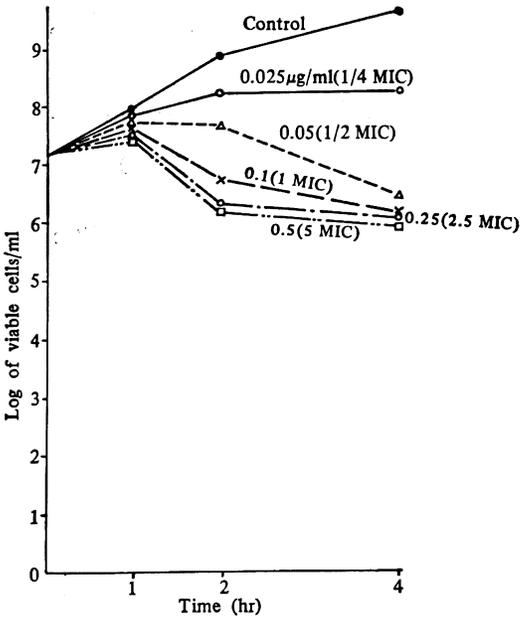


Fig. 29 Effect of NA on viability of *K. pneumoniae* KC-1

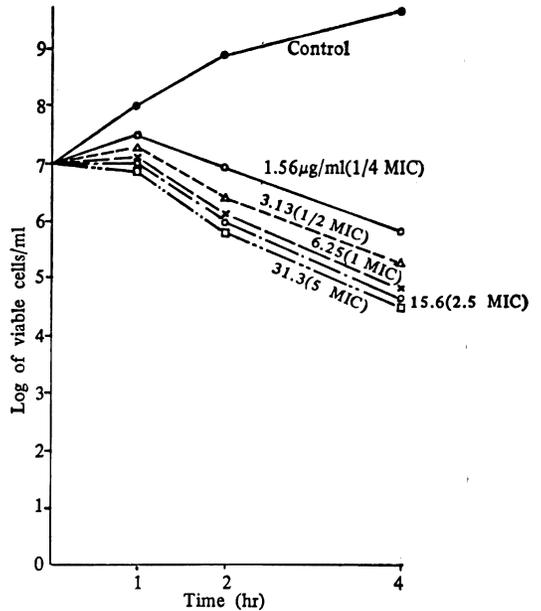


Fig. 30 Effect of PPA on viability of *K. pneumoniae* KC-1

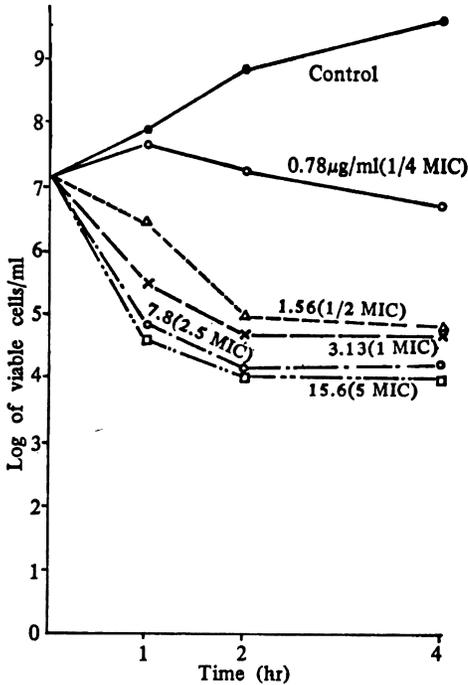


Fig. 31 Effect of MLX on viability of *K. pneumoniae* KC-1

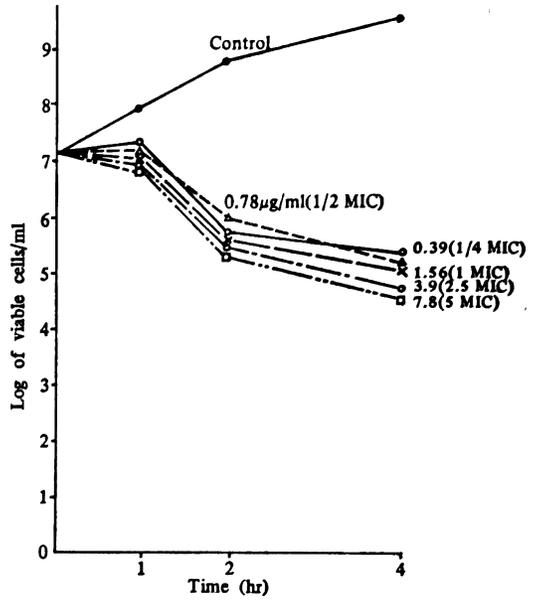


Fig. 32 Effect of AM-715 on viability of *P. aeruginosa* E-2

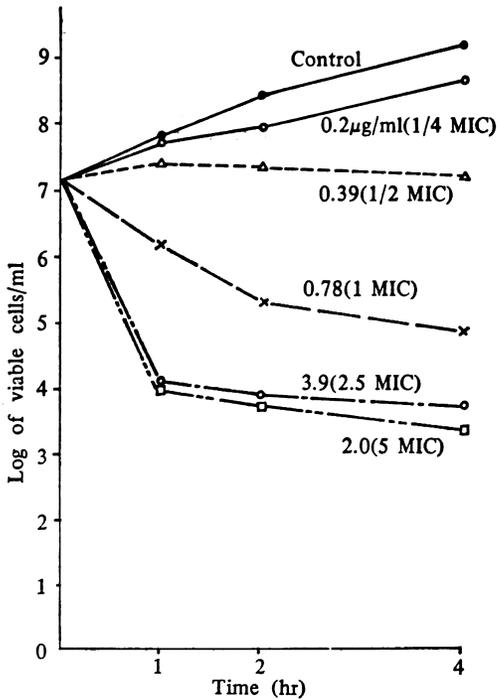


Fig. 33 Effect of NA on viability of *P. aeruginosa* E-2

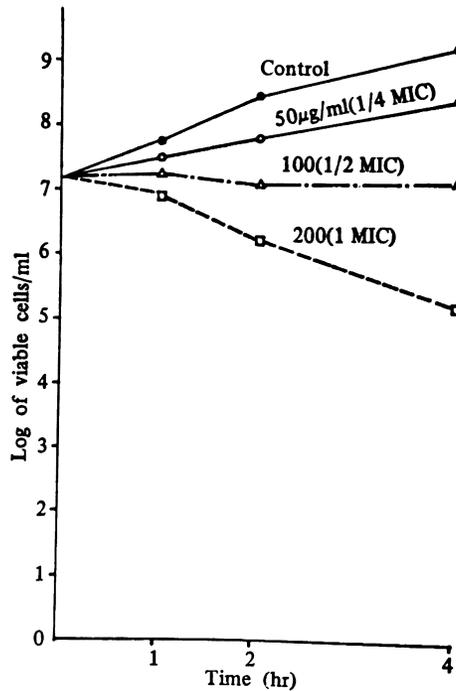


Fig. 34 Effect of PPA on viability of *P. aeruginosa* E-2

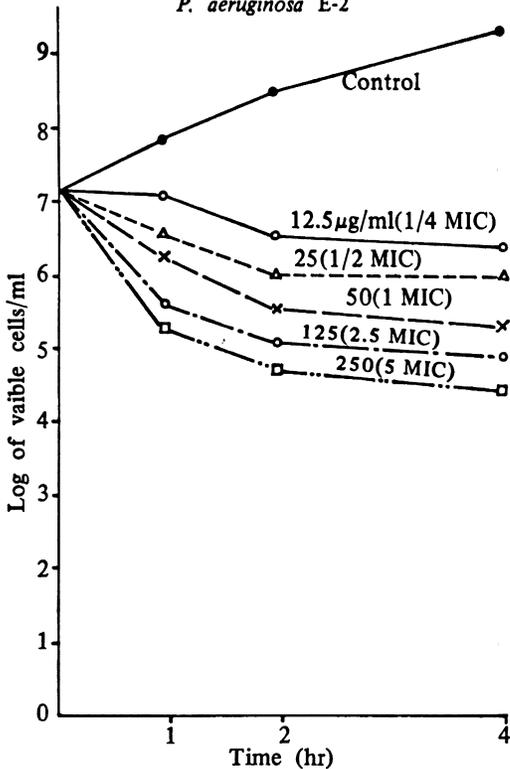
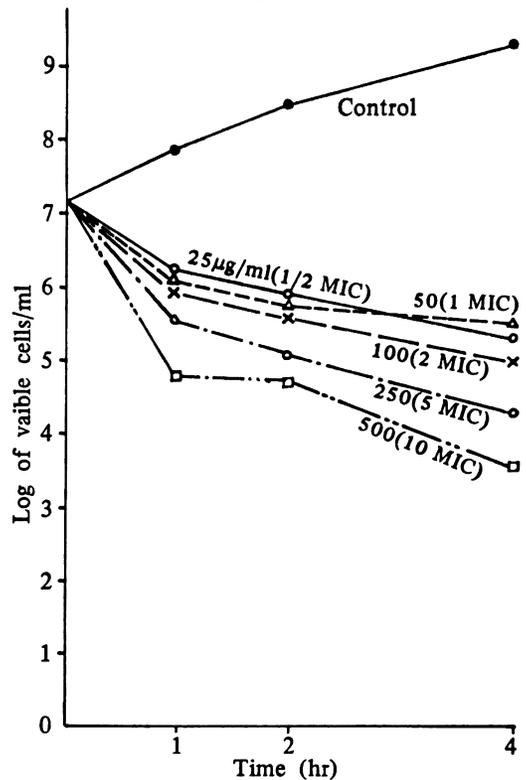


Fig. 35 Effect of MLX on viability of *P. aeruginosa* E-2



に大半の株が分布していた。なお、MLX, PPA では数%, NA では約20%近く 100 µg/ml 以上の耐性株が見られた。10<sup>6</sup> cells/ml の場合も、Fig. 17 に示すように 10<sup>8</sup> cells/ml とほぼ同様であり、接種菌量にかかわらず AM-715>MLX>PPA≒NA の順で抗菌力は優れていた。

(i) *P. aeruginosa* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 18 に示すように AM-715 では 0.39~1.56 µg/ml, MLX では 25~>100 µg/ml, PPA では 12.5~50 µg/ml にピークを有し、NA では、すべての株が >100 µg/ml の高度耐性を示し、10<sup>6</sup> cells/ml の場合も Fig. 19 に示すように、10<sup>8</sup> cells/ml に比べて大きな変動は見られず、いずれの接種菌量においても AM-715>PPA>MLX>NA の順で優れていた。

(j) *A. calcoaceticus* の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 20 に示すように AM-715 では 3.13~12.5 µg/ml に、MLX では 1.56~12.5 µg/ml に、NA では、6.25~25 µg/ml に、PPA では 50~>100 µg/ml にピークを有する分布を示し、他の菌種の場合と異なり MLX の方が若干優れた抗菌力を示した。10<sup>8</sup> cells/ml の場合も Fig. 21 に示すように 10<sup>8</sup> cells/ml とほぼ同じであった。いずれの接種菌量でも MLX>AM-715>

NA>PPA の順で優れていた。

(k) *Enterobacter* sp. の場合

10<sup>8</sup> cells/ml の場合は Fig. 22 に示すように AM-715 では 0.05~0.19 µg/ml に、MLX では 1.56~6.25 µg/ml に、PPA では 3.13~12.5 µg/ml に、そして NA では 3.13~50 µg/ml にすべての株が分布した。10<sup>6</sup> cells/ml の場合も Fig. 23 に示すようにほぼ同様のパターンを示した。10<sup>8</sup> cells/ml, 10<sup>6</sup> cells/ml 共に抗菌力は AM-715>MLX>PPA>NA の順で優れていた。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

*E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1, *P. aeruginosa* E-2 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 5~7 に示した。

培地 pH の変化により AM-715 の抗菌力は、*K. pneumoniae* KC-1 の場合酸性側で、*P. aeruginosa* E-2 の場合、アルカリ側で良好となったが、他の薬と同様に僅かの影響しか受けなかった。

馬血清添加, 接種菌量の影響についても培地 pH の変化の時と同様にほとんど影響は見られなかった。

4. 増殖曲線に及ぼす影響

**Table 8** Protecting effect of AM-715, NA, PPA, and MLX against experimental *Escherichia coli* KC-14 infection in mice

Drug	MIC( $\mu$ g/ml)		Challenge dose		ED <sub>50</sub> * (mg/mouse)
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	cells/mouse	LD <sub>50</sub>	
AM-715	0.05	0.05	5.56 $\times$ 10 <sup>4</sup>	930	0.05 (0.04-0.07)
NA	12.5	6.25			0.46 (0.37-0.57)
PPA	1.56	1.56			0.25 (0.18-0.34)
MLX	0.78	0.78			0.21 (0.16-0.28)

\*LITCHFIELD-WILCOXON Method  
( ): 95% confidence limits

**Table 9** Protecting effect of AM-715, NA, PPA, and MLX against experimental *Kiebsiella pneumoniae* KC-1 infection in mice

Drug	MIC( $\mu$ g/ml)		Challenge dose		ED <sub>50</sub> * (mg/mouse)
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	cells/mouse	LD <sub>50</sub>	
AM-715	0.05	0.02	8.8 $\times$ 10 <sup>3</sup>	4500	0.55 (0.35-0.79)
NA	6.25	3.13			6.00 (4.69-7.68)
PPA	3.13	1.56			3.00 (2.27-3.96)
MLX	0.78	0.39			2.80 (1.96-4.00)

\*LITCHFIELD-WILCOXON Method  
( ): 95% confidence limits

**Table 10** Protecting effect of AM-715, NA, PPA, and MLX against experimental *Pseudomonas aeruginosa* E-2 infection in mice

Drug	MIC( $\mu$ g/ml)		Challenge dose		ED <sub>50</sub> * (mg/mouse)
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	cells/mouse	LD <sub>50</sub>	
AM-715	0.19	0.19	1.1 $\times$ 10 <sup>3</sup>	23	1.25 (0.78-4.80)
NA	100	100			10.50(7.78-14.20)
PPA	25	12.5			9.00 (6.72-12.06)
MLX	50	12.5			0.94 (0.75-1.18)

\*LITCHFIELD-WILCOXON Method  
( ): 95% confidence limits

**Table 11** Protecting effect of AM-715, NA, PPA, and MLX against experimental *Serratia marcescens* T-55 infection in mice

Drug	MIC( $\mu$ g/ml)		Challenge dose		ED <sub>50</sub> * (mg/mouse)
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	Cells/mouse	LD <sub>50</sub>	
AM-715	0.19	0.19	3.0 $\times$ 10 <sup>5</sup>	100	0.07 (0.05-0.19)
NA	3.13	1.56			0.79 (0.59-1.06)
PPA	1.56	0.78			0.60 (0.38-0.96)
MLX	1.56	0.78			0.20 (0.14-0.28)

\*LITCHFIELD-WILCOXON Method  
( ): 95% confidence limits

(a) *E. coli* NIH JC-2 について

Fig. 24~27 に示すように、AM-715 および PPA では MIC 濃度以上で殺菌性が見られたが、NA, MLX では 1/2 MIC で殺菌性が見られた。また NA や MLX の場合、低濃度よりも高濃度で殺菌性が減弱するといういわゆる反転現象 (Eagle's effect) が見られた。

(b) *K. pneumoniae* KC-1 について

Fig. 28~31 に示すように AM-715 では MIC 濃度以上で、他の 3 剤では 1/2 MIC 濃度で殺菌性が見られた。また MLX の一部で Eagle's effect を認めた。

(c) *P. aeruginosa* E-2 について

Fig. 32~35 に示すように AM-715, PPA では MIC 濃度以上で、NA では 200  $\mu$ g/ml 以上で MLX では 1/2 MIC で殺菌性が認められた。また MLX の一部で Eagle's effect が認められた。

## 5. マウス実験感染に対する治療効果

(a) *E. coli* 感染に対する治療効果

*E. coli* KC-14 感染に対する治療効果を Table 8 に示した。すなわち、AM-715 の ED<sub>50</sub> 値は 0.05 mg/mouse で他の 3 剤より約 4~8 倍優れていた。

(b) *K. pneumoniae* KC-1 感染に対する治療効果

*K. pneumoniae* KC-1 感染に対する治療効果を Table 9 に示した。AM-715 は NA よりも約 10 倍優れており、PPA, MLX に比べても約 5~6 倍の優れた効果を有していた。

(c) *P. aeruginosa* E-2 感染に対する治療効果

*P. aeruginosa* E-2 感染に対する治療効果を Table 10 に示した。AM-715 は MLX と同等か少し劣る ED<sub>50</sub> 値を示したが NA, PPA より約 8 倍程度優れていた。

(d) *S. marcescens* 感染に対する治療効果

*S. marcescens* T-55 感染に対する治療効果を、Table 11 に示した。AM-715 は他の 3 剤に比べて約 3~10 倍優れていた。

## III. 総括および考察

杏林製薬株式会社で合成された新しい化学療法剤 AM-715 に関する細菌学的評価を既知合成化学療法剤 nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA) および miloxacin (MLX) を比較薬として検討を行なった。その結果、本剤は *Micrococcus luteus* を除くグラム陽性菌群に対しても強い抗菌力を示した。これは既知合成化学療法剤と非常に異なる点であり、何故、本剤が優れた抗菌力を示すようになったのか抗菌作用機作に興味を持たれる。またグラム陰性菌のすべての菌種に対しても強い抗菌作用を示した。臨床分離の *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* sp., *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A.*

*calcoaceticus*, *Enterobacter* sp. に対する感受性分布について検討した結果、*A. calcoaceticus* を除くすべての菌種に対して最も優れた結果が得られた。*A. calcoaceticus* については MLX の方が良い結果が得られた。一般的に合成化学療法剤の耐性機作には細胞壁外膜の透過性が関与すると考えられているが、*A. calcoaceticus* においては AM-715 よりも MLX の方が透過性が良いのかどうか、また、これらの合成化学療法剤の標的部である gyrase (DNA を二重らせんにする酵素) に対する作用はどうか今後解決していかねばならない問題だと考えられる。

増殖曲線に及ぼす影響の検討では、AM-715 は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* で最小発育阻止濃度 (MIC 以上で殺菌性が見られた。また低濃度より高濃度作用において殺菌性が低下することが一部の菌種で認められたが、これらの現象は既に CRUMPLIN<sup>7)</sup> や WINSHELL<sup>8)</sup> らが報告している。そして CRUMPLIN らは、これらの現象を *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Shigella*, *Salmonella* など認めており菌種、菌株に特別な現象ではないと述べている。我々も、同様の結果<sup>9)</sup> を既に報告しているが高濃度作用により殺菌性の逆転が起こるのは、他の作用点の出現、DNA 合成系の変異など種々の要因が働くものと考えられるが、今後の検討に待たなければならぬ問題である。

マウス実験感染に対する治療効果では *P. aeruginosa* については MLX と同等か少し劣る効果を示したが、その他の菌種では、AM-715 が最も優れた効果を示した。

この様に AM-715 は *in vitro*, *in vivo* において NA, PPA より強い抗菌力および治療効果を示し、一部を除いては MLX よりも強い作用が認められた。しかし、*P. aeruginosa* の場合に顕著であるが他の薬に比較して MIC 値の差が *in vivo* における治療効果にそのまま反映されていない様に思われる。今後、この薬の吸収、排泄の検討などを詳細に行なう必要が有ると考えられる。

## 文 献

- 1) 中澤昭三, 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
- 2) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, A. MINAMI & N. KUROBE: Pipemidic acid: Its activities against various experimental infections. Antimicrob. Agents & Chemoth. 9: 569~574, 1976
- 3) 中澤昭三, 西野武志, 浜州泰久, 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
- 4) 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
- 5) MIC 測定法改定委員会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 6) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99~113, 1949
- 7) CRUMPLIN, G. C. & J. T. SMITH: Nalidixic acid: an antibacterial paradox. Antimicrob. Agents & Chemother. 8: 251~261, 1975
- 8) WINSHELL, E. B. & H. S. ROSENKRANZ: Nalidixic acid and the metabolism of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 104: 1168~1175, 1970
- 9) 尾花 芳樹, 真屋 幸弘, 西野 武志: Nalidixic acid, Pipemidic acid および Miloxacin 高濃度作用時の殺菌性の減弱について。Chemotherapy 28: 1171~1178, 1980

## BACTERIOLOGICAL EVALUATION ON A NEW SYNTHETIC ANTIMICROBIAL AGENT, AM-715

TAKESHI NISHINO, NAOMASA GOTOH, TOKIKO ISHIMURA, MASAHIRO NAGATA,  
KAZUHIRO MATSUNO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

AM-715 was evaluated microbiologically in comparison with nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA) and miloxacin (MLX) and the following results were obtained.

1. AM-715 had a broad spectrum of antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria and the activity of AM-715 was higher than those of NA, PPA and MLX.
2. Distribution of susceptibility of clinically isolated strains to AM-715 was mostly superior to those of MLX, PPA and NA except for *Acinetobacter calcoaceticus*. The activity for *Acinetobacter calcoaceticus* was mostly higher in MLX and in this order of AM-715, NA, PPA.
3. Antibacterial activity for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* or *Pseudomonas aeruginosa* was not influenced by pH of culture medium, inoculum size or addition of horse serum.
4. Bactericidal effect of AM-715 was observed in the experiments using organisms such as *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*.
5. Therapeutic effect on experimental infection was studied in mice. The effect of AM-715 was equal to that of MLX on infection caused by *P. aeruginosa* and was superior to those of MLX, PPA and NA on infections caused by *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Serratia marcescens*.