

新しいキノリン誘導体 AM-715 の細菌学的研究

伊藤 明・村山 哲・平井 敬二・阿部 泰夫・入倉 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

AM-715 は、6 位にフッ素、7 位にピペラジンを有する新しいキノリン誘導体である。

AM-715 が、従来のナリジクス酸系の抗菌剤と大きく異なる点は、作用領域がグラム陽性菌およびグラム陰性菌と広く、その抗菌力は、従来のこの系統の抗菌剤の 10 倍から 100 倍以上の強さを示すことと、緑膿菌を含むグラム陰性菌に対して、アミノ配糖体抗生物質ゲンタミシンよりも強い抗菌力を示すことである。

AM-715 の各種細菌に対する最小発育阻止濃度におよぼす諸因子の検討では、接種菌量・培地の種類・金属イオン・血清による影響は少なかったが、培地の pH による影響では、酸性側に比べアルカリ性側で強い抗菌力を発揮した。

in vitro における耐性獲得では、ナリジクス酸やピペミド酸よりも耐性獲得速度は遅く、グラム陰性菌の場合、ある一定の耐性値以上には上昇しない傾向を示した。

他の抗生物質との併用効果は、ゲンタミシン、カルペニシリン、アンピシリンにやや認められた。

マウス実験感染における感染防禦効果は、緑膿菌による全身感染と大腸菌による上行性腎感染について検討したが、AM-715 の効果は、両感染共、ゲンタミシン（皮下投与）よりやや劣ったが、他のナリジクス酸系合成抗菌剤およびペニシリン系抗生物質よりは優れた効果を示した。

大腸菌および緑膿菌に AM-715 を MIC 濃度で 3 時間作用させた後の形態を電子顕微鏡で観察したところ、菌体の分裂が阻止され Filament 化し、かつ溶菌現象が認められた。

1962 年ナフチリジン誘導体の合成抗菌剤ナリジクス酸が LESHER ら¹⁾ により開発されて以来、ナリジクス酸系の化学療法剤の開発はめざましく²⁻⁸⁾、我が国では、ピロミド酸³⁾ としてピペミド酸⁵⁾ が開発され医療品として提供されている。我々はキノリン誘導体を数多く合成し⁹⁾、より優れた抗菌力を有する化合物を探索したところ、Fig. 1 に示す構造を有する化合物 AM-715 (1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid) が従来のナリジクス酸系化合物に比べ、グラム陽性菌および緑膿菌を含むグラム陰性菌に対して一段と強い抗菌力を示すことを見出した。

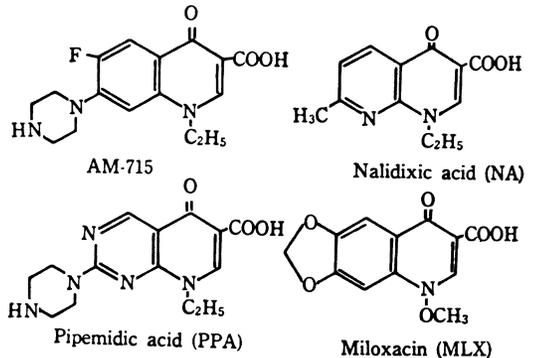
ここに本化合物の細菌学的特性を他のナリジクス酸系化合物と比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

AM-715 は杏林製薬中央研究所で合成されたものを使用した。ナリジクス酸 (NA—第一製薬) は市販の錠剤より抽出精製したものを使用し、ゲンタミシン (GM—塩野義製薬)、カルペニシリン (CBPC—藤沢薬品)、アンピシリン (ABPC—万有製薬) は、市販品をそのまま力価にしたがい使用した。またピペミド酸 (PPA)¹⁰⁾ およびミロキサシン (MLX)¹¹⁾ は対照薬剤として既報の方法に従

Fig. 1 Chemical structures of AM-715, nalidixic acid, pipemidic acid and miloxacin



い合成し、TLC で単一スポットであることを確かめたものを使用した。

2. 使用菌株

抗菌スペクトルの測定等、各種の試験に用いた菌株は、当研究所保存の標準菌株を用いた。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法

日本化学療法学会により定められた最小発育阻止濃度測定法¹²⁾ に準じて MIC を測定した。使用培地は菌種により異なるため、Table 1 に示した。

Neisseria および *Haemophilus* はローソク培養法を使

Table 1 Media used

Medium	Organism
Preculture	
TODD HEWITT Broth (Difco)	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>S. faecalis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>Neisseria perflava</i>
Blood agar ¹⁾	<i>Corynebacterium pyogenes</i>
Chocolate agar ²⁾	<i>Haemophilus influenzae</i>
DUBOS Medium ⁴⁾	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TSB ⁵⁾	The other organisms
MIC determination	
Blood agar	<i>S. pyogenes</i> <i>S. faecalis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>N. perflava</i> <i>C. pyogenes</i>
Chocolate agar	<i>H. influenzae</i>
DUBOS Medium	<i>M. tuberculosis</i>
HIA ⁶⁾	The other organisms

1) TODD HEWITT Broth (Difco)

2) Blood agar: Brain Heart Infusion (Eiken) + 10% defibrinated horse blood

3) Chocolate agar: Brain Heart Infusion + 10% defibrinated horse blood

4) DUBOS Medium (Eiken)

5) TSB: Tryptosoya Broth (Nissan)

6) HIA: Heart Infusion Agar (Nissan)

用し、*Mycobacterium phlei* および *M. smegmatis* は 48 時間後、*M. tuberculosis* は 4 週間後に判定した。接種菌量は 10^8 cells/ml とした。以下の MIC 測定はこれに準じた。

4. MIC 値におよぼす諸因子の影響

1) 接種菌量

7 株の標準菌株を使用して、接種菌液の菌濃度を $10^4 \sim 10^9$ cells/ml まで 6 段階変えて、それぞれの接種菌量に対する MIC 値を Heart infusion agar (HIA, ニッスイ) を用いて日本化学療法学会標準法¹²⁾に従い測定した。

2) 培地の種類

6 株の標準菌株を使用して、HIA, Trypto soya agar (ニッスイ)、普通寒天培地(栄研)、Brain heart infusion agar (栄研)そして感性ディスク用培地(ニッスイ)を用いて、各種培地における MIC 値を 10^8 cells/ml の接種菌量で、日本化学療法学会標準法に従い測定した。

3) 培地の pH

培地の pH を 5~9 まで 5 段階変え、各 pH における 6 株の標準菌株に対する MIC 値を HIA 培地を用い、接種菌量 10^8 cells/ml で寒天平板希釈法¹²⁾によって測定した。

4) 金属イオン

金属イオンによる AM-715 の MIC 値におよぼす影響を調べる目的で基本培地 (KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g, glucose 2 g, L-asparagine 3 g, L-cysteine 0.1 g, nicotinic acid 0.02 g, thiamine 0.04 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) に NaCl (17 mM と 85 mM), KCl (13 mM と 65 mM), CaCl_2 (0.1 mM と 0.5 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mM と 2.5 mM), ZnCl_2 (0.1 mM と 0.5 mM) および $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05 mM と 0.25 mM) を別々に加え、それぞれの金属イオンを含む液体培地を作製し、 10^5 cells/ml になるように 6 種の標準菌株を接種し、 37°C , 20 時間培養後 MIC を求めた。

5) 血清

7 株の標準菌株を使用して、Heart infusion broth (ニッスイ) にヒト血清 (Consera, ニッスイ) を無添加または 50% 添加した場合の MIC 値を接種菌量 10^5 cells/ml で液体希釈法によって測定した。

6) コール酸ナトリウム

HIA 培地にコール酸ナトリウムを 0, 1 および 5% をそれぞれ添加した際の 7 株の標準菌株に対する MIC 値を接種菌量 10^8 cells/ml で日本化学療法学会標準法に従い測定した。

5. *in vitro* における耐性獲得様式および得られた耐性菌の薬剤感受性

E. coli NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO12689 そして *S. aureus* 209P の 3 株を使用して、AM-715, PPA そして NA に対する試験管内での耐性獲得様式を検討した。Heart infusion broth 10 ml で、各薬剤の 2 倍希釈系列を作製し、 10^5 cells/ml になるように、それぞれの菌株を接種し 37°C , 24 時間培養した。培養液の濁りの有無により MIC 値を求め、 $1/2$ MIC において生育した菌 0.1 ml を新たに作製した薬剤希釈系列に接種し、同様に MIC 値を測定した。この増量継代法を 10 代継代して、耐性値の上昇を検討した。次いでそれぞれの薬剤に対して得られた耐性菌を用いて、交叉耐性を見る目的で他剤の MIC 値を日本化学療法学会標準法によって測定した。

6. 併用効果

GM, CBPC そして ABPC の 2 倍希釈系列に、AM-715 の 2 倍希釈系列を添加した HIA 培地を使用して、*P. aeruginosa* V-1, *S. marcescens* IID618 そして *S. aureus* 209P に対する MIC 値を、日本化学療法学会標準法に従い測定した。

7. 感染防禦実験

マウスにおける *P. aeruginosa* IID1210 の実験全身感染および *E. coli* NIHJ JC-2 の実験上行性腎感染を用いて感染防禦効果を他剤と比較した。AM-715, PPA, NA そして MLX は 0.5% carboxymethylcellulose に懸濁し

経口投与した。GM と CBPC は精製水に溶解して皮下投与した。ED₅₀ 値はプロビット法¹³⁾により、95%信頼限界は、LITCHFIELD-WILCOXON 法¹⁴⁾により算出した。各実験感染は次に述べる方法によった。

1) 実験全身感染

ddY 系雄性マウス (体重 28~33 g 6 週齢) を一群 10~30 匹にわけ、感染は 5% ムチン (半井化学) 加 Brain heart infusion (栄研) 0.5 ml に *P. aeruginosa* IID1210 3.5×10^4 cells (LD₅₀ の 70 倍) を懸濁し腹腔内に投与し感染を惹起せしめた。薬剤は菌投与直後および 6 時間後の 2 回投与し、感染 1 週間後の生存率より ED₅₀ 値を計算した。なお薬剤非投与群は全例死亡した。

2) 実験上行性腎感染

ddY 系雌性マウス (体重 22~26 g 6 週齢) を一群 15 匹とし、感染は Tryptosoya broth (ニッスイ) 0.04 ml に *E. coli* NIHJ JC-2 3.2×10^7 cells を懸濁し、ペントバルビタール (大日本製薬) 麻酔下に、ゾンデにてマウス尿道口より膀胱内に注入し、尿道口をクランプにて固定し、径 25 mm のプラスチック製の管の内に入れ、6 時間固定し感染を惹起せしめた。薬剤は、菌接種 3 時間後に投与した。判定は菌接種 6 時間後にクランプをはずし固定より開放した。48 時間後にマウスを屠殺し、両腎を摘出して滅菌カミソリにて 2 分割した後 Deoxycholate 培地 (ニッスイ) 上にスタンプし、 37°C , 20 時間培養後赤色のコロニーを呈する菌の発育の有無を調べ、発育の認められない場合を有効と判定した。なお薬剤非投与群の両腎からは常に感染菌が検出された。

8. 電子顕微鏡による細菌像の観察

E. coli NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* V-1 および *S. aureus* 209P 株を nutrient broth (栄研) で培養し、培養 2 時間後の対数増殖期に AM-715 の MIC 値の濃度 (*E. coli* 0.1 $\mu\text{g/ml}$, *P. aeruginosa* 0.4 $\mu\text{g/ml}$, *S. aureus* 0.8 $\mu\text{g/ml}$) を添加しさらに 3 時間培養したものを試料とした。

1) 透過型電子顕微鏡用試料の調製

培養液を遠沈管に分注し、3,000 r.p.m. 20 分遠沈し、上清の培養液を除去し残渣に充分量の 1.5% ホルマリン溶液を加えて 12 時間固定した。固定後遠沈し上清の固定液を除去し、数回蒸留水で洗浄後、蒸留水に懸濁して、トリアセチルセルロースを張った銅メッシュ上に滴下して自然乾燥させた。これを真空蒸着器において 10^{-5} Torr にてクロムでシャドウウィングを施し、さらにカーボンで補強して日立 11-D 型透過型電子顕微鏡にて観察した。

また大腸菌を上記遠沈法で集菌後、0.9% の生理食塩水で数回洗浄し、さらに 0.15 M のリン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄した後、同じ緩衝液で 1% に調製したオスミウム酸で 12 時間固定した。菌の一部をプラスチック製キャピ

ラリーで採取し 2 mm 程の長さに切断してアルコール脱水を施し、プロピレンオキサイドにて置換した後菌塊をキャピラリーより分離しエポキシ樹脂に包埋した。重合後ガラスナイフで薄切片酢酸ウラニール・鉛塩による二重染色を行ない上記と同様に鏡検した。

2) 走査型電子顕微鏡用試料の調製

培養後 1% のグルタルアルデヒド液 (0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2) で一夜冷蔵庫内で固定した。同緩衝液で数回洗浄後、ミリポアフィルター上に滴下し、放置脱水した後、真空蒸着器内でカーボンをコーティングして、さらにイオンコーターにより金コーティングを約 150~200 Å 行ない、日立 S-450 型走査型電子顕微鏡で観察した。

9. 血清蛋白による不活化率

M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.5) に 0, 10, 20, 50 および 100% の割合でヒト血清 (Consera, ニッスイ) を添加し、AM-715 は 2 µg/ml, MLX は 5 µg/ml の割合に溶解し、25°C 1 時間放置後、溶液中の活性体量を Bioassay 法 (*E. coli* NIHJ JC-2 を検定菌として、感性ディスク用培地を用いる Cup 法) により測定し、次式を用いて不活化率を求めた。

不活化率 (%)

$$= \frac{\text{無血清時の薬剤濃度} - \text{血清中での活性体量}}{\text{無血清時の薬剤濃度}} \times 100$$

II. 実験結果

1. 標準菌株に対する抗菌スペクトル

AM-715 および対照薬剤 NA, PPA, MLX, GM, ABPC および CBPC の標準菌株に対する MIC 値を Table 2 に示した。AM-715 はグラム陽性菌に対して強い抗菌力を示し、特に NA, PPA および MLX に対して自然耐性菌である *Streptococcus* 属および *Corynebacterium* 属に対しても 1.56~3.13 µg/ml の MIC 値を示した。しかし *Mycobacterium* 属の *M. phlei* および *M. smegmatis* に対しては抗菌力を示したが、*M. tuberculosis* に対しては 200 µg/ml の MIC 値しか示さなかった。AM-715 は緑膿菌を含むグラム陰性菌に対して 1.56 µg/ml 以下の MIC 値を示し、他の NA 系化合物のみならず、GM, ABPC および CBPC といった抗生物質よりも強い抗菌力を示した。

以上のように AM-715 はグラム陽性菌および緑膿菌を含むグラム陰性菌に有効な幅広い抗菌スペクトルを有する化合物であった。

2. MIC 値におよぼす諸因子の影響

1) 接種菌量

接種菌量の影響は Table 3 に示したように、菌量が増

加するにつれて MIC 値はやや上昇したが、AM-715 は PPA や NA に比べ上昇の程度は少なかった。

2) 培地の種類

培地の種類による MIC 値の変動は Table 4 に示したように少なかった。

3) 培地の pH

AM-715 は Table 5 に示したように、酸性側に比べてアルカリ性側で MIC 値は小さくなった。PPA も同様の傾向を示したが、NA は中性付近で小さい MIC 値を示した。

4) 金属イオン

AM-715 の MIC 値におよぼす Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺ および Fe⁺⁺ イオンによる影響は、Table 6 に示したように少なかった。

5) 血清

Table 7 に示したように、AM-715 は血清を添加しても MIC 値におよぼす影響は少なかった。

6) コール酸ナトリウム

AM-715 は Table 8 に示したように、コール酸ナトリウムの含量が増加するにつれて MIC 値が低くなる傾向を示した。これはコール酸ナトリウムによる菌の生育阻害によるものと思われた。

3. *in vitro* での耐性獲得様式および得られた耐性菌の薬剤感受性

AM-715, PPA と NA について *in vitro* における薬剤耐性獲得結果を Fig. 2 に示した。*E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* IFO12689 を使用した実験では、AM-715, PPA, NA 共 1 回目の継代により耐性値の上昇を認めたが、AM-715 は、それぞれ MIC 値が 0.78 µg/ml および 6.25 µg/ml の耐性値までしか上昇せず、一定の限界が存在する傾向があるのに対し、PPA と NA は両菌共 MIC 値が 100 µg/ml 以上の高度耐性菌となった。一方 *S. aureus* 209P に対しては、AM-715 も PPA や NA と同様に 100 µg/ml 以上の MIC 値を示すに至った。

次いでこの実験で得た耐性菌を用いて、他剤の MIC 値を測定した結果を Table 9 に示した。AM-715 の耐性菌 (R-AM-715) に対して、PPA と NA は共に高度耐性を示した。一方 NA 耐性菌 (R-NA) の場合、AM-715 は *S. aureus* には感受性を示したが、*E. coli* にはやや耐性値の上昇を認めた。PPA 耐性菌 (R-PPA) の場合、AM-715 は明らかに耐性値の上昇が認められたが、100 µg/ml の MIC 値を示す高度耐性株は認められなかった。

4. 併用効果

Fig. 3 に示したように、*S. aureus* 209P に対する AM-715 と GM, CBPC および ABPC との併用効果は協力的であった。*P. aeruginosa* V-1 に対しては AM-715

Table 2 Antibacterial spectrum of AM-715 compared with those of nalidixic acid, piperidic acid, miloxacin, gentamicin, ampicillin and carbenicillin

Organism	M I C ($\mu\text{g/ml}$)						
	AM-715	NA	PPA	MLX	GM	ABPC	CBPC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0.78	100	25	12.5	0.10	0.10	0.39
<i>S. aureus</i> ATCC14775	1.56	>100	100	12.5	0.10	3.13	6.25
<i>S. epidermidis</i> IID866	0.78	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-8	1.56	>100	>100	200	6.25	0.0063	0.10
<i>S. pyogenes</i> IID692	3.13	>100	>100	200	6.25	0.0063	0.10
<i>S. faecalis</i> IID682	3.13	—	—	100	50	0.78	100
<i>S. pneumoniae</i> IID552	12.5	>100	>100	200	12.5	0.05	0.39
<i>Corynebacterium pyogenes</i> IID548	3.13	—	100	200	0.78	0.05	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> PCI219	0.39	6.25	6.25	0.78	0.10	0.05	0.39
<i>Mycobacterium phlei</i> IFO3142	0.39	100	12.5	6.25	6.25	200	>200
<i>M. smegmatis</i> IFO3083	1.56	>100	50	6.25	0.20	0.39	6.25
<i>M. tuberculosis</i> IID H ₃₇ R _a	200	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.10	3.13	1.56	0.39	0.39	3.13	1.56
<i>E. coli</i> ATCC10536	0.05	3.13	1.56	0.39	0.39	1.56	1.56
<i>Proteus vulgaris</i> IFO3167	0.05	3.13	3.13	0.39	0.20	100	6.25
<i>P. vulgaris</i> XK Denken	0.20	3.13	6.25	0.39	0.10	0.20	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO3512	0.05	1.56	1.56	0.39	0.20	100	>200
<i>Salmonella enteritidis</i> IID604	0.20	12.5	12.5	6.25	1.56	1.56	12.5
<i>Shigella sonnei</i> IID969	0.10	1.56	1.56	0.39	0.78	1.56	1.56
<i>Haemophilus influenzae</i> IID986	0.05	1.56	3.13	0.39	1.56	0.20	0.39
<i>Neisseria perflava</i> IID856	0.05	1.56	1.56	0.20	0.78	1.56	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> V-1	0.39	100	12.5	50	0.78	50	12.5
<i>P. aeruginosa</i> IFO12689	1.56	>200	25	50	12.5	>200	100
<i>P. aeruginosa</i> IID1210	1.56	>200	50	50	12.5	>200	100
<i>P. aeruginosa</i> IID1130	0.78	>200	25	50	3.13	>200	200
<i>Serratia marcescens</i> IID618	0.20	—	—	0.39	1.56	100	—
<i>S. marcescens</i> IID619	0.20	—	—	0.78	1.56	100	—
<i>S. marcescens</i> IID620	0.20	—	—	0.78	1.56	100	—
<i>Yersinia enterocolitica</i> IID981	0.10	—	—	—	—	—	—
<i>Acinetobacter enitratus</i> IID876	1.56	—	—	—	—	—	—

Table 3 Influence of inoculum size on the MIC

Organism	Inoculum size (cells/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		AM-715	NA	PPA
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	1.3×10^9	0.78	100	50
	1.3×10^8	0.39	100	25
	1.3×10^7	0.39	50	25
	1.3×10^6	0.39	25	12.5
	1.3×10^5	0.39	25	12.5
	1.3×10^4	0.20	12.5	12.5
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	2.1×10^9	0.10	1.56	1.56
	2.1×10^8	0.05	1.56	1.56
	2.1×10^7	0.05	0.78	1.56
	2.1×10^6	0.05	0.78	0.78
	2.1×10^5	0.05	0.78	0.78
	2.1×10^4	0.05	0.78	0.78
<i>Proteus vulgaris</i> IFO3167	1.3×10^9	0.05	1.56	3.13
	1.3×10^8	0.05	1.56	3.13
	1.3×10^7	0.05	1.56	3.13
	1.3×10^6	0.05	0.78	3.13
	1.3×10^5	0.05	0.78	3.13
	1.3×10^4	0.025	0.78	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO3512	1.2×10^9	0.05	1.56	1.56
	1.2×10^8	0.05	1.56	1.56
	1.2×10^7	0.05	1.56	0.78
	1.2×10^6	0.05	0.78	0.78
	1.2×10^5	0.05	0.78	0.78
	1.2×10^4	0.05	0.78	0.39
<i>Serratia marcescens</i> IID620	1.6×10^9	0.10	3.13	1.56
	1.6×10^8	0.10	3.13	1.56
	1.6×10^7	0.10	3.13	1.56
	1.6×10^6	0.10	3.13	0.78
	1.6×10^5	0.10	3.13	0.78
	1.6×10^4	0.05	1.56	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> V-1	1.3×10^9	0.39	>100	12.5
	1.3×10^8	0.39	>100	12.5
	1.3×10^7	0.39	>100	12.5
	1.3×10^6	0.20	>100	12.5
	1.3×10^5	0.10	>100	6.25
	1.3×10^4	0.10	100	6.25
<i>P. aeruginosa</i> IFO12689	2.7×10^9	0.78	>100	25
	2.7×10^8	0.78	>100	25
	2.7×10^7	0.78	>100	25
	2.7×10^6	0.78	>100	25
	2.7×10^5	0.78	>100	25
	2.7×10^4	0.78	>100	12.5

Table 4 Influence of agar medium on the MIC

	Organism	M I C (μg/ml)				
		TSA ¹⁾	BHIA ²⁾	HIA ³⁾	NA ⁴⁾	MMH ⁵⁾
AM-715	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	1.56	1.56	0.39	0.39	0.78
	<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.20	0.10	0.10	0.10	0.20
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO3512	0.05	0.20	0.05	0.05	0.20
	<i>Proteus vulgaris</i> IFO3167	0.39	0.10	0.39	0.05	0.39
	<i>Serratia marcescens</i> IID620	0.39	0.20	0.20	0.10	0.39
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> V-1	0.78	0.39	0.39	0.20	0.78
PPA	<i>S. aureus</i> 209P	50	100	25	25	100
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	3.13	0.78	0.78	1.56
	<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	1.56	1.56	1.56	0.78	1.56
	<i>P. vulgaris</i> IFO3167	12.5	6.25	12.5	1.56	6.25
	<i>S. marcescens</i> IID620	6.25	3.13	1.56	1.56	3.13
	<i>P. aeruginosa</i> V-1	12.5	6.25	6.25	12.5	6.25
NA	<i>S. aureus</i> 209P	100	>100	100	25	100
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	1.56	1.56	0.78	1.56
	<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78
	<i>P. vulgaris</i> IFO3167	6.25	3.13	12.5	3.13	12.5
	<i>S. marcescens</i> IID620	12.5	12.5	6.25	0.78	6.25
	<i>P. aeruginosa</i> V-1	>100	>100	>100	>100	>100

- 1) TSA : Tryptosoya Agar (Nissuia)
- 2) BHIA: Brain Heart Infusion Agar (Difco)
- 3) HIA : Heart Infusion Agar (Nissui)
- 4) NA : Nutrient Agar (Difco)
- 5) MMH: Modified MÜLLER HINTON Medium (Nissui)

は GM および CBPC と併用すると協力効果が認められた。*S. marcescens* IID 618 に対しては、AM-715 は GM とのみ協力効果を認めたが、CBPC とは協力効果は認められなかった。

5. 感染防禦実験

マウスによる *P. aeruginosa* IID1210 の実験全身感染および *E. coli* NIHJ JC-2 の上行性腎感染における AM-715 の感染防禦 50% 有効率 (ED₅₀) ならびに PPA, NA, MLX, GM そして CBPC の ED₅₀ 値を Table 10 に示した。緑膿菌全身感染における AM-715 の ED₅₀ 値は 98 mg/kg であって、PPA の 4 倍、CBPC の 8 倍の効力を示したが、GM の皮下投与と比べると効力は 1/2 であった。大腸菌の上行性腎感染における AM-715 の ED₅₀

値は 15 mg/kg であって、PPA, NA, MLX, そして CBPC のそれぞれ、5, 6, 9, そして 7 倍強い効力を示した。しかし GM の皮下投与と比べると効力は 1/2 以下であった。

6. 電子顕微鏡による細菌像の観察

1) 透過型電子顕微鏡による観察

Fig. 4 (a) は正常な *E. coli* NIHJ JC-2 の電頭像で分裂がみられるのに対し、Fig. 4 (b) は AM-715 0.1 μg/ml 添加した場合の電頭像で、菌体の細胞分裂がおさえられ、糸状化が認められた。Fig. 5 (a) の *P. aeruginosa* V-1 の正常像に比べ、AM-715 0.4 μg/ml 添加した場合の Fig. 5 (b) では菌体の分裂がおさえられると共に溶菌像が観察された。Fig. 6 (a) は正常な *E. coli* NIHJ JC-2 の薄

Table 6 Influence of metal ion on the MIC

Drug	Organism	M I C (µg/ml)												
		Basal medium	Na ⁺ 17mM	Na ⁺ 85mM	Na ⁺ 13mM	K ⁺ 65mM	Ca ⁺⁺ 0.1mM	Ca ⁺⁺ 0.5mM	Mg ⁺⁺ 0.5mM	Mg ⁺⁺ 2.5mM	Zn ⁺⁺ 0.1mM	Zn ⁺⁺ 0.5mM	Fe ⁺⁺ 0.05mM	Fe ⁺⁺ 0.25mM
AM-715	<i>S. aureus</i> 209P	0.39	0.10	0.10	0.39	-*	-	-	0.39	0.39	-	-	0.05	0.05
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.20	0.05	0.10	0.05	0.39	0.20	0.05	0.05	0.05	0.05
	<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	0.39	0.10	0.10	0.39	0.05	0.20	0.05	0.78	0.78	0.10	0.05	0.20	0.10
	<i>P. vulgaris</i> IFO3167	0.20	0.10	0.05	0.39	0.05	0.20	0.20	0.10	0.10	-	-	0.10	0.10
	<i>S. marcescens</i> IID620	0.20	0.20	0.10	0.39	0.10	0.39	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	<i>P. aeruginosa</i> V-1	0.39	0.39	0.20	0.39	0.10	0.20	0.10	0.78	0.78	0.10	-	0.20	0.20
PPA	<i>S. aureus</i> 209P	1.56	0.78	0.78	6.25	-	-	-	6.25	6.25	-	-	0.39	0.39
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	1.56	1.56	3.13	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	1.56	1.56
	<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	6.25	3.13	1.56	6.25	1.56	3.13	1.56	6.25	6.25	0.78	0.78	6.25	3.13
	<i>P. vulgaris</i> IFO3167	3.13	3.13	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	-	-	3.13	3.13
	<i>S. marcescens</i> IID620	1.56	1.56	1.56	6.25	0.78	3.13	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
	<i>P. aeruginosa</i> V-1	6.25	3.13	3.13	6.25	1.56	6.25	3.13	12.5	12.5	1.56	-	3.13	3.13
NA	<i>S. aureus</i> 209P	1.56	1.56	1.56	3.13	-	-	-	3.13	3.13	-	-	0.39	0.39
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	0.78	0.78	3.13	0.78	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	0.39	0.78	0.78
	<i>K. pneumoniae</i> IFO3512	1.56	1.56	1.56	3.13	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	0.78	0.39	1.56	1.56
	<i>P. vulgaris</i> IFO3167	1.56	1.56	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	3.13	-	-	3.13	1.56
	<i>S. marcescens</i> IID620	6.25	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13
	<i>P. aeruginosa</i> V-1	6.25	6.25	6.25	3.13	1.56	>100	12.5	>100	>100	3.13	-	6.25	6.25

* -: Cell growth was inhibited by metal ion concentration itself

Table 7 Influence of human serum on the MIC

Organism	Human serum (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		AM-715	PPA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0	1.56	50	400
	50	1.56	50	400
<i>Escherichia coli</i> JC-2	0	0.10	6.25	6.25
	50	0.10	6.25	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> V-1	0	0.39	25	400
	50	0.39	25	400
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO3512	0	0.05	6.25	3.13
	50	0.20	6.25	12.5
<i>Proteus vulgaris</i> IFO3167	0	0.05	3.13	3.13
	50	0.20	3.13	12.5
<i>Serratia marcescens</i> IDD620	0	0.39	12.5	6.25
	50	0.78	12.5	12.5

inoculum size 10^5 cells/ml

Table 8 Influence of sodium cholate on the MIC

Organism	Sodium cholate (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		AM-715	PPA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0	1.56	50	400
	1	—	—	—*
	5	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0	0.10	6.25	6.25
	1	0.10	1.56	1.56
	5	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> V-1	0	0.78	25	400
	1	0.39	12.5	400
	5	0.20	6.25	400
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO3512	0	0.10	6.25	3.13
	1	0.05	0.39	0.20
	5	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i> IFO3167	0	0.10	3.13	3.13
	1	0.10	3.13	1.56
	5	0.05	0.39	0.39
<i>Serratia marcescens</i> IID620	0	0.20	12.5	6.25
	1	0.10	1.56	0.78
	5	—	—	—

inoculum size 10^8 cells/ml

*—: The cell growth was inhibited by sodium cholate concentration itself

Fig. 3 Combination effect of AM-715 and gentamicin, carbenicillin or ampicillin

G M ($\mu\text{g/ml}$)	<u>S. aureus</u> 209P					<u>P. aeruginosa</u> V-1					<u>S. marcescens</u> IID618								
	AM-715 ($\mu\text{g/ml}$)					AM-715 ($\mu\text{g/ml}$)					AM-715 ($\mu\text{g/ml}$)								
	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0.025	0
0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<hr/>																			
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<hr/>																			
0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Inhibition of bacterial growth
 + : No inhibition of bacterial growth

Table 9 *In vitro* antibacterial activity of each drugs against resistant strains to AM-715, piperimidic acid and nalidixic acid

Organism		MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		AM-715	PPA	NA
<i>S. aureus</i> 209P	Parent	0.78	50	50
	R-AM-715*	>100	>100	>100
	R-PPA**	6.25	>100	>100
	R-NA**	0.78	50	>100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	Parent	0.05	1.56	3.13
	R-AM-715	0.78	50	50
	R-PPA	1.56	>100	>100
	R-NA	0.78	50	>100
<i>P. aeruginosa</i> IFO12689	Parent	1.56	50	>100
	R-AM-715	12.5	>100	>100
	R-PPA	6.25	>100	>100

R-AM-715*: AM-715-resistant strain

R-PPA**: PPA-resistant strain

R-NA**: NA-resistant strain

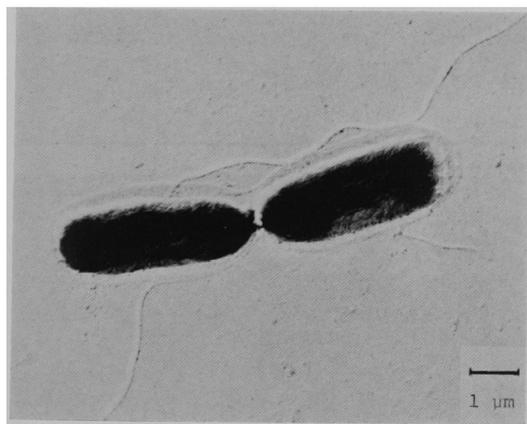


Fig. 4(a) Electron micrograph of normal *E. coli* NIHJ JC-2 cells



Fig. 4(b) Electron micrograph of *E. coli* NIHJ JC-2 cells exposed to 0.10 $\mu\text{g/ml}$ of AM-715 for 3 hours

切電顕像であり、AM-715 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 処理した場合の Fig. 6 (b) では細胞分裂がおさえられ菌体が伸長すると共に細胞質が粗くなっていた。

2) 走査型電子顕微鏡による観察

Fig. 7 (a) は正常な *E. coli* NIHJ JC-2 の電顕像で、

桿状を示し細胞分裂像が認められた。Fig. 7 (b) は AM-715 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 処理された *E. coli* 像で Filament 形成が認められた。Fig. 8 (a) は正常な *P. aeruginosa* V-1 の電顕像で、表面は滑らかで桿状構造を有し細胞分裂も正常であったが、Fig. 8 (b) に示したように AM-715 0.4 $\mu\text{g/ml}$

Table 10 Effect on the systemic and the ascending kidney experimental infection in mice

Challenge organism	Challenge (cells/body)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Route*	ED ₅₀ (mg/kg)	95% confidence limit (mg/kg)
Systemic infection						
<i>P. aeruginosa</i> IID1210	3.5×10 ⁴	AM-715	1.56	p.o.	98.0	79.7~ 121
		PPA	50	p.o.	400	317 ~ 504
		GM	12.5	s.c.	50.0	37.0~ 67.5
		CBPC	100	s.c.	800	630 ~1016
Ascending kidney infection						
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.2×10 ⁷	AM-715	0.10	p.o.	15.0	8.6~ 26.3
		PPA	1.56	p.o.	74.0	51.0~ 107
		NA	3.13	p.o.	86.0	45.3~ 163
		MLX	0.39	p.o.	135	75.0~ 243
		GM	0.39	s.c.	6.0	2.9~ 12.6

*Route: p.o., oral and s.c., subcutaneous administration

Table 11 Inhibition of antibacterial activity of AM-715 and miloxacin by human serum on *E. coli* NIHJ JC-2

Serum (%)	Inactivation rate (%)			
	100	50	20	10
AM-715	16.6 ± 8.4	3.5 ± 3.5	1.8 ± 1.8	3.5 ± 3.5
Miloxacin	73.5 ± 7.9	65.3 ± 2.1	50.8 ± 2.0	30.5 ± 2.5

(mean ± SE, n=3)



Fig. 5(a) Electron micrograph of normal *P. aeruginosa* V-1 cells

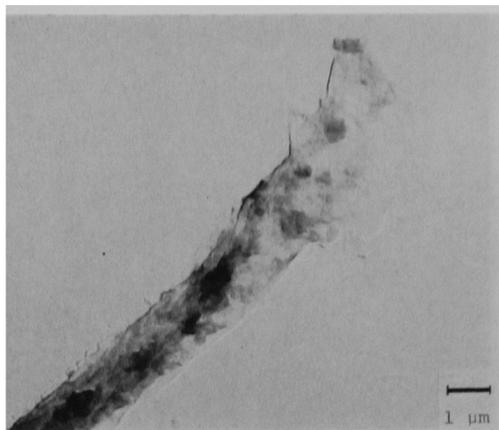


Fig. 5(b) Electron micrograph of *P. aeruginosa* V-1 cells exposed to 0.40 $\mu\text{g/ml}$ of AM-715 for 3 hours

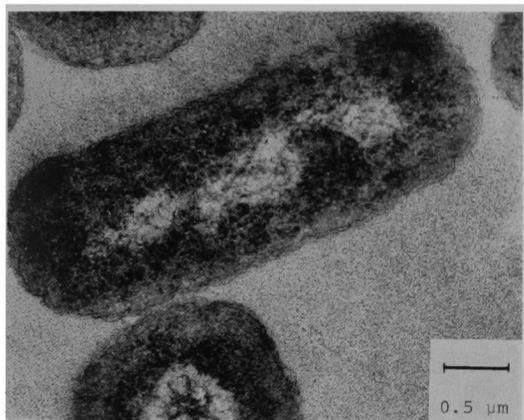


Fig. 6(a) Electron micrograph of ultrathin section of normal *E. coli* NIHJ JC-2 cells

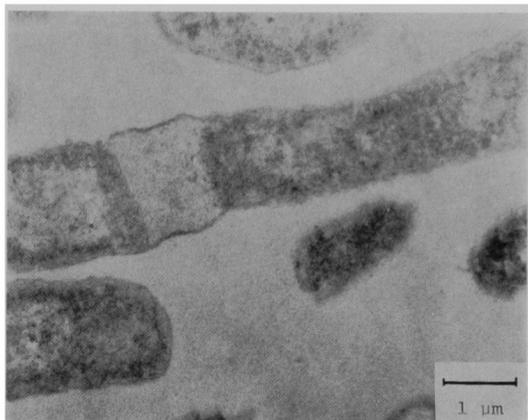


Fig. 6(b) Electron micrograph of ultrathin section of *E. coli* NIHJ JC-2 cells exposed to 0.025 $\mu\text{g/ml}$ of AM-715 for 3 hours

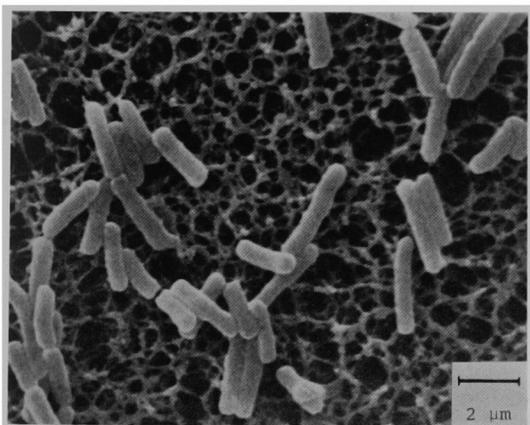


Fig. 7(a) Scanning electron micrograph of normal *E. coli* NIHJ JC-2 cells

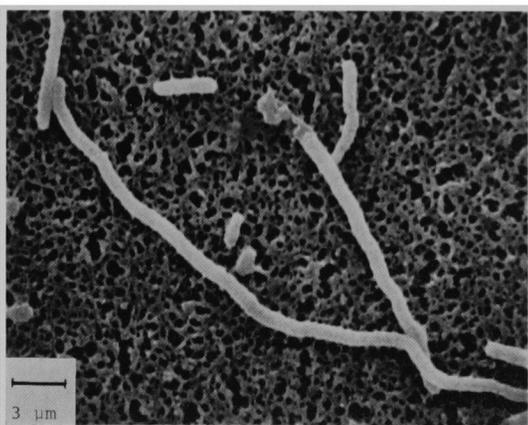


Fig. 7(b) Scanning electron micrograph of *E. coli* NIHJ JC-2 cells exposed to 0.10 $\mu\text{g/ml}$ of AM-715 for 3 hours

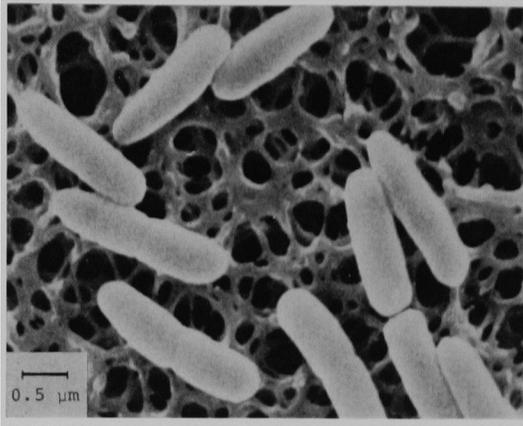


Fig. 8(a) Scanning electron micrograph of normal *P. aeruginosa* V-1 cells

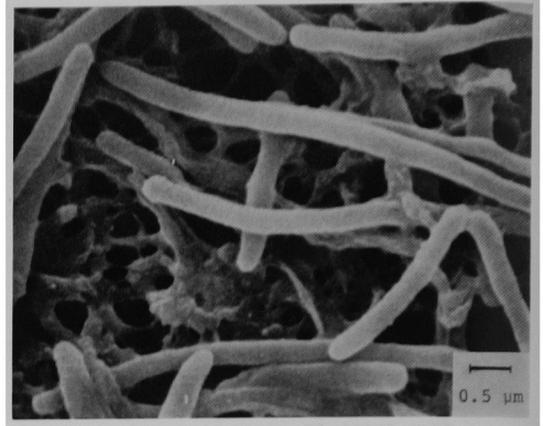


Fig. 8(b) Scanning electron micrograph of *P. aeruginosa* V-1 cells exposed to 0.40 $\mu\text{g/ml}$ of AM-715 for 3 hours

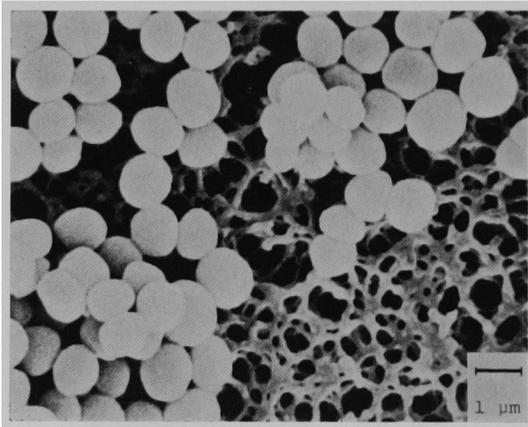


Fig. 9(a) Scanning electron micrograph of normal *S. aureus* 209P cells

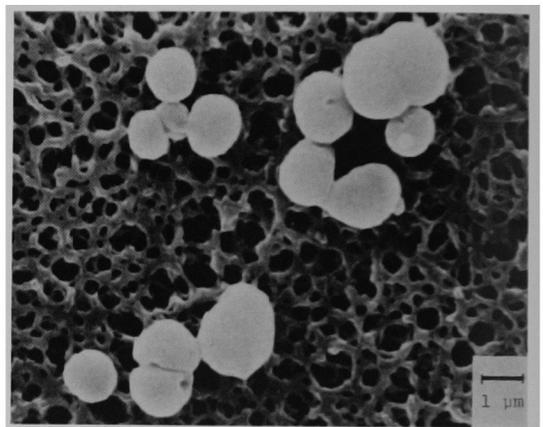


Fig. 9(b) Scanning electron micrograph of *S. aureus* 209P cells exposed to 0.80 $\mu\text{g/ml}$ of AM-715 for 3 hours

ml 処理した場合、大腸菌の場合と同様に、菌体は伸長し細胞分裂がおさえられているのが観察された。Fig. 9 (a) は *S. aureus* 209P の正常像であり、Fig. 9 (b) は AM-715 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 処理した場合で、菌体の膨化像が認められた。

7. 血清蛋白による不活化

AM-715 および MLX のヒト血清による不活性化率を Table 11 に示した。AM-715 は MLX に比べ低い不活性化率であり、血清 100% の条件下で 16.6% であった。

III. 考 察

AM-715 は NA や PPA と類似の構造を有する合成抗菌剤であるにもかかわらず、その抗菌力は、従来の NA 系抗菌剤の枠を越え、グラム陽性菌およびグラム陰性菌

に対して非常に強いものであった。また緑膿菌を含むグラム陰性菌に対しては、GM よりも強い抗菌力を示した。また溶連菌等従来の NA 系の抗菌剤の弱点^{15),16)}であったグラム陽性菌に対しても 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で抗菌力を発揮した。以上のように本剤がグラム陽性菌に対し効果が期待できることと、緑膿菌に抗菌力を有することとあわせて、従来の NA 系化合物の治療領域の拡大が可能と思われた。

MIC 値におよぼす諸因子の影響では、接種菌量、培地の種類および血清による変動は少なく、金属イオンおよびコール酸ナトリウムにより、抗菌力が強くなることはあっても低下は認められなかった。一方培地の pH では、MIC 値は大きく変動した。NA 系化合物の培地 pH による MIC の変動には、NA, MLX⁷⁾、およびシノキサ

シン¹⁷⁾のように、酸性側で強い抗菌力を示す化合物と、AM-715 および PPA のようにアルカリ性側で強い抗菌力を示す化合物とがある。AM-715 および PPA は共にピペラジン環を有し、その二級アミンが抗菌活性に重要な働きをしているものと推察された。

in vitro の耐性獲得試験では、AM-715 は大腸菌および緑膿菌に対して、一定の耐性値までしか上昇せず（大腸菌、0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、緑膿菌、6.25 $\mu\text{g/ml}$ ）、高度耐性菌が出現しにくいことを示したが、ブドウ球菌に対しては高度耐性菌を得た。一方 NA および PPA はグラム陽性菌およびグラム陰性菌で高度耐性株を得た。

マウスによる実験緑膿菌全身感染および大腸菌上行性腎感染における感染防禦効果では、いずれの場合も AM-715 は、GM の皮下投与による効力よりは弱かったが、NA、PPA および MLX の4~9 倍すぐれた効力を示し、また緑膿菌全身感染の場合、皮下投与の CBPC の8 倍の効力を示した。このことは、AM-715 が従来の NA 系抗菌剤に比べ、一段と優れた治療効果が期待され、かつ尿路感染症以外の感染症に対しても効果が期待できると思われた。

電子顕微鏡による形態観察から、AM-715 は大腸菌や緑膿菌のような桿菌に対し、MIC 濃度で菌体の分裂を阻止し、Filament 化する。また濃度が MIC あるいはそれ以上に達すると細胞膜が破壊し溶菌し、殺菌的に作用することが示唆された。

ヒト血清による不活化率は NA¹⁸⁾ や MLX は 60% 以上であるのに対し AM-715 は 17% と少なく、このことは生体内で作用発現の上から有利な点と考えられた。

文 献

- 1) LESHNER, 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 & B. S. SCHWARTZ: Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent I. *In vitro* and *in vivo* activity. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 1967: 475~479, 1968
- 3) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & Y. TAKASE: Piromidic acid, a new antibacterial agent. Antibacterial properties. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 1970: 117~122, 1971
- 4) WICK, W. E.; D. A. PRESTON, W. A. WHITE & R. S. GORDEE: Compound 64716, a new synthetic antibacterial agent. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 4: 415~420, 1973
- 5) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, A. MINAMI, K. NAKATA, S. INOUE, M. ISHIYAMA & Y. KUBO: Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*. *In vitro* properties. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 8: 132~138, 1975
- 6) ROHLFING, S. R.; J. F. GERSTER & D. C. KVAM: Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 10: 20~24, 1976
- 7) 井沢昭雄, 他 (2 施設): 新化学療法剤 AB-206 の抗菌作用. *Chemotherapy* 26 (S-4): 48~59, 1978
- 8) ALBRECHT, A.: Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *In Progress in Drug Research*, vol. 21, E. JUCKER, Ed., Birkhäuser Verlag, pp. 9~104, 1977
- 9) KOGA, H.; A. ITOH, S. MURAYAMA, S. SUZUE & T. IRIKURA: Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* 23: 1358~1363, 1980
- 10) MATSUMOTO, J. & S. MINAMI: Pyrido (2,3-d) pyrimidine antibacterial agents. 3. 8-Alkyl- and 8-vinyl-5,8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido (2,3-d) pyrimidine-6-carboxylic acids and their derivatives. *J. Med. Chem.* 18: 74~79, 1975
- 11) AGUI, H.; T. MITANI, A. IZAWA, T. KOMATSU & T. MAKAGOME: Studies on quinoline derivatives and related compounds. 5. Synthesis and antimicrobial activity of novel 1-alkoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids. *J. Med. Chem.* 20: 791~796, 1977
- 12) 日本化学療法学会 MIC 測定改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 13) MILLER, L. C. & M. L. TAINTER: Estimation of the ED₅₀ and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57: 261~264, 1944
- 14) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol.* 96: 99~113, 1949
- 15) DEITZ, W. H.; J. H. BAILEY & E. J. FROELICH: *In vitro* antibacterial properties of nalidixic acid, a new drug active against gram-negative organisms. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 1963: 583~587, 1964
- 16) LUMISH, R. M. & C. W. NORDEN: Cinoxacin. *In vitro* antibacterial studies of a new synthetic organic acid. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 7: 159~163, 1975
- 17) 俵 勝也, 吉田 正, 竹間盛夫, 元川清司: Cinoxacin の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 28 (S-4): 46~65, 1980
- 18) 中澤昭三, 中村教子, 丹羽能子, 余公元子: 新化学療法剤 nalidixic acid に関する基礎的研究. *Chemotherapy* 13: 139~145, 1965

BACTERIOLOGICAL STUDIES OF A NEW QUINOLINE DERIVATIVE AM-715

AKIRA ITO, SATOSHI MURAYAMA, KEIJI HIRAI, YASUO ABE and TSUTOMU IRIKURA
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

AM-715, 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid, is a new nalidixic acid analog. AM-715 has a broader spectrum and more potent antibacterial activity than other drugs of the nalidixic acid type. AM-715 had higher antibacterial activity against gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* than gentamicin (GM).

The antibacterial activity of AM-715 was little influenced by change of inoculum size or medium and the presence of metal ion, serum or sodium cholate. The activity of AM-715 was greater in alkaline medium than in acid medium. The *in vitro* resistance of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 and *P. aeruginosa* IFO12689 to AM-715 was developed slower than that to nalidixic acid (NA) and pipemidic acid (PPA).

AM-715 was shown to have additive effect with GM, carbenicillin and ampicillin.

The activity of AM-715 was clearly greater than that of NA, PPA, and miloxacin in systemic infection with *P. aeruginosa* IID1210 and ascending kidney infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in mice.

When *E. coli* NIHJ JC-2 and *P. aeruginosa* V-1 were treated with AM-715, the filamentation and lysis of cells were observed with electron microscope and scanning electron microscope.