

DL-8280 の細菌学的評価

長田恭明・采 孟・池内 澄・小河秀正

第一製薬株式会社中央研究所

新規合成ピリドンカルボン酸系抗菌剤 DL-8280 の抗菌活性を、主として同系の norfloxacin (NFLX) あるいは pipemidic acid (PPA) のそれと比較評価した。

1. グラム陽性菌群、特に *Streptococcus* 属に対しては、対照の 2 剤をはるかにしのぐ特徴的な高活性を示した。

2. グラム陰性菌群に対しては、特に *Enterobacteriaceae* 群、*Haemophilus* 属および *N. gonorrhoeae* に NFLX と同等あるいはそれ以上の活性を示し、*P. aeruginosa* 以外の *Pseudomonas* 属および *Acinetobacter* 属等のいわゆる opportunistic pathogen には NFLX 以上の高活性を示した。

3. 偏性嫌気性菌群に対しても比較的強い抗菌力を示した。特に *B. fragilis* 群に対しては、clindamycin (CLDM) 耐性菌をも含めて NFLX および PPA をしのぐ高い活性を示した。

4. マウス実験感染においては、経口投与で良好な防御および治療効果を示し、その結果は、NFLX および PPA よりすぐれていた。

Nalidixic acid (NA)¹⁾が細菌感染治療剤として登場して以来、多くの同系抗菌剤が開発され²⁻⁴⁾、実地医療の場で使用されてきた。その多くは主としてその抗グラム陰性菌 (*P. aeruginosa* を除く)活性のみが評価されたものであった。その後、これらの弱点を補ったものとして PPA⁵⁾が開発され、本系統の抗菌剤としてははじめて広域スペクトルを有する化合物として評価され、今なお広く利用されている。さらに miloxacin⁶⁾、rosoxacin^{7,8)}あるいは NFLX⁷⁻¹⁰⁾等統々と特徴ある広域活性化化合物が開発され、臨床の場でそれぞれの特徴を発揮している。特に NFLX は、*P. aeruginosa* に対する活性増強が著しく、アミノ配糖体系抗生物質のそれを凌駕するほどまでになっている¹¹⁾。DL-8280、(±)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid は、NFLX よりもさらに広域な抗菌スペクトルを示し、かつ高活性であることが明らかにされつつある^{12,13)}。

今回は、DL-8280 の細菌学的評価を、主として NFLX および PPA を対照薬として実施したので、その成績を報告する。

実験材料および方法

使用薬剤

DL-8280 (Fig. 1)、NFLX および PPA は第一製薬中央研究所で合成したものを使用した。その他の対照抗生物質、gentamicin sulfate (GM, 塩野義製薬)、clindamycin hydrochloride (CLDM, 日本アップジョン)、sodium ampicillin (ABPC, 明治製薬) はそれぞれ市販品を用いた。

使用菌株

標準菌株 (72 株) および各種病巣由来細菌 (507 株) は主として研究室保存株を用いた。また、病巣由来の

N. gonorrhoeae (45 株) は、神奈川衛生研究所、小原博士より分与されたものを用いた。

使用培地

一般の通性嫌気性および好気性菌の培養には、Mueller-Hinton broth または agar (MHB または MHA, Difco)、偏性嫌気性菌には GAM broth または agar (GAMB または GAMA, 日本製薬) を用いた。*Streptococcus* 属用としては、Brain heart infusion broth (BHIB, Difco) および Chocolate agar (CA, 滅菌直後の加熱 MHA に 10% の割合に馬脱線維血液を混釈) を用いた。*Haemophilus* 属用としては、100 μ g の hemin, 20 μ g の β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD, Sigma) 含有の BHIB (10 ml) および CA を用いた。*N. gonorrhoeae* 用としては、1% hemoglobin, 1% Iso Vitale X 含有の GC agar (GCA, Difco) を用いた。

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

上記各ブイオン培地で 37°C 一夜培養した菌液を同一の無菌培地で 100 倍に希釈し、その 1 白金耳 (5 μ l) を 2 倍希釈系列の薬剤を含む MHA, CA または GAMA 培地に接種した。その各寒天平板培地を 37°C 18~48 時間好気または嫌気培養後、各薬剤の MIC を測定した。*N.*

Fig. 1 Chemical structure of DL-8280

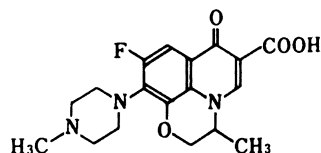


Table 1 Antibacterial spectrum (gram-positive bacteria)

Organisms	MIC (μg/ml)			
	DL-8280	NFLX	PPA	GM
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0.39	0.39	12.5	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.20	0.20	12.5	0.10
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 56500	0.78	3.13	100	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> G-36	1.56	12.5	>100	3.13
<i>Streptococcus mitis</i> IID 685	3.13	6.25	100	12.5
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19433	3.13	6.25	>100	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.10	0.20	6.25	0.39

NFLX : norfloxacin, PPA : pipemidic acid, GM : gentamicin sulfate

gonorrhoeae は、GCA 培地上に発育した菌苔を Proteose pepton No. 3 broth (Difco) に懸濁し、McFaland 0.5 に希釈した (約 10^8 cells/ml に相当する)。これをさらに 100 倍希釈したものを接種菌液として用いた。

マウス感染防御効果

当研究室常用の標準病原細菌の腹腔接種によるマウス急性菌、敗血症型感染症に対する防御効果を NFLX および PPA を対照薬として検討した。各薬剤 1 dose 当たり 1 群 10 匹の STD : ddY 系雄マウス、体重 20~23 g、を用いた。試験菌としては *S. aureus* E 46, *E. coli* E 77156, *K. pneumoniae* 3167, *S. marcescens* 13001 および *P. aeruginosa* PI-III を使い、各 MHB-一夜培養菌液を 2 MLD に相当する菌数に希釈してマウス腹腔内に接種した。DL-8280, NFLX および PPA は 0.5% CMC 懸濁液として感染直後に 1 回経口投与した。*P. aeruginosa* 感染系の場合はさらに感染 6 時間後に 1 回追加投与した。投薬後 7 日間マウス各群の生死を観察し、7 日目の生存率から LITCHFIELD-WILCOXON 法¹⁴⁾により 50% 有効用量 (ED₅₀ 値) およびその 95% 信頼限界値を算出した。

マウス上向き腎盂腎炎治療効果

生後 8 週齢の Slc : ddY 系雌マウス、体重 25~30 g、を 1 群 6~8 匹として、TANAKA ら¹⁵⁾の方法に従って *P. aeruginosa* No. 15 による実験的上向き腎盂腎炎模型¹⁶⁾を作った。感染成立 (感染後 1 日) 後から 1 日 1 回連続 5 日間 DL-8280 あるいは NFLX の 0.5% CMC 懸濁液を経口投与し、感染後 6 日目に腎内生菌数を計測した。生菌数が 10^2 cells/g (計測下限) 以下になったものを完全治癒とし、感染マウスの 50% が完全治癒するのに要する用量 (ED₅₀ 値) とその 95% 信頼限界値を

LITCHFIELD-WILCOXON 法により算出した。

実験成績

1. 標準菌株に対する抗菌力 (抗菌スペクトル)

DL-8280 の標準菌株に対する抗菌力を NFLX, PPA および GM または CLDM と比較した。

Table 1 はグラム陽性菌群に対する成績で、staphylococci に対して、DL-8280 の MIC は 0.20~0.78 μg/ml NFLX は 0.20~3.13 μg/ml, PPA は 12.5~100 μg/ml, GM は 0.10 μg/ml であった。Streptococci に対しては、それぞれ 1.56~3.13 μg/ml, 6.25~12.5 μg/ml, 100~>100 μg/ml および 3.13~12.5 μg/ml であった。以上のように研究室保存のグラム陽性菌株のうち *S. aureus* 209P および *S. aureus* SMITH に対しては、DL-8280 は NFLX と同等の抗菌活性を示し、他の菌株に対しては、いずれも NFLX および PPA より強い抗菌力を示した。また GM との比較では staphylococci に対して DL-8280 は 1~3 管程度低活性であったが、streptococci および *B. subtilis* ATCC 6633 に対しては 1~2 管高い活性を示した。Table 2 はグラム陰性菌群に対する成績で *Enterobacteriaceae* 群に対して DL-8280, NFLX, PPA および GM の MIC はそれぞれ、<0.05~1.56 μg/ml, <0.05~6.25 μg/ml, 0.78~25 μg/ml および 0.39~50 μg/ml を示した。以上のように DL-8280 の抗菌力は *P. rettgeri* 08500 を除くすべての *Enterobacteriaceae* 群に対して NFLX とほぼ同等ないしそれ以上で、PPA のそれにくらべてはるかに強いものであった。*P. aeruginosa* の 5 株に対し、DL-8280 は 0.20~1.56 μg/ml の MIC を示し、NFLX の 0.10~0.78 μg/ml にくらべて約 1/2 の抗菌力であったが、PPA (3.13~25 μg/ml) の 10 倍以上、GM (0.78

Table 2 Antibacterial spectrum (gram-negative bacteria)

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	DL-8280	NFLX	PPA	GM
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	<0.05	0.10	1.56	0.78
<i>Escherichia coli</i> 05136	0.10	0.20	6.25	3.13
<i>Escherichia coli</i> 05137	0.10	0.10	3.13	3.13
<i>Shigella flexneri</i> 2a 5503	<0.05	0.10	1.56	1.56
<i>Salmonella enteritidis</i> IID 604	0.10	0.10	3.13	3.13
<i>Hafnia alvei</i> IID 978	<0.05	0.10	1.56	1.56
<i>Citrobacter freundii</i> IID 976	0.20	0.20	6.25	0.78
<i>Proteus vulgaris</i> 08601	<0.05	<0.05	1.56	1.56
<i>Proteus vulgaris</i> 08602	0.10	0.10	3.13	3.13
<i>Proteus morganii</i> IID 602	0.10	0.20	3.13	1.56
<i>Proteus rettgeri</i> 08500	1.56	6.25	50	6.25
<i>Proteus inconstans</i> 08303	0.20	0.20	12.5	50
<i>Proteus mirabilis</i> 08103	0.10	0.10	3.13	1.56
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3894	0.20	0.10	3.13	3.13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Type I	0.39	0.39	6.25	0.78
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Type II	0.10	0.39	6.25	0.78
<i>Klebsiella oxytoca</i> 07600	0.10	0.10	3.13	3.13
<i>Enterobacter cloacae</i> 03400	0.10	0.20	6.25	0.78
<i>Enterobacter cloacae</i> 03402	0.10	0.10	1.56	1.56
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 8329	<0.05	0.10	0.78	1.56
<i>Serratia marcescens</i> 10100	0.20	0.20	1.56	3.13
<i>Serratia marcescens</i> 10104	0.39	0.20	1.56	1.56
<i>Serratia marcescens</i> 10114	0.78	1.56	25	1.56
<i>Yersinia enterocolitica</i> Te 591	0.10	0.10	1.56	0.39
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 19108	0.78	3.13	12.5	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32104	1.56	0.78	12.5	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32233	1.56	0.78	25	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32234	1.56	0.78	12.5	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32121	0.20	0.10	3.13	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32122	1.56	0.78	12.5	3.13
<i>Pseudomonas cepacia</i> IID 1340	6.25	12.5	50	100
<i>Pseudomonas maltophilia</i> IID 1275	1.56	12.5	50	3.13
<i>Pseudomonas putida</i> IID 5121	1.56	6.25	50	6.25
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> ATCC 13253	6.25	12.5	100	50
<i>Acinetobacter anitratus</i> ATCC 19606	0.78	25	>100	25
<i>Achromobacter xylosoxydans</i> ATCC 27061	50	100	>100	>100

NFLX : norfloxacin, PPA : pipemidic acid, GM : gentamicin sulfate

~3.13 $\mu\text{g/ml}$) とほぼ同等ないし数倍の抗菌力を示した。一方 *P. aeruginosa* 以外の *Pseudomonas* 属に対しては、DL-8280 はいずれの対照薬よりも数倍以上の抗菌力を示した。このことは、*F. meningosepticum*, *A. anitr-*

atus, *A. xylosoxydans* に対しても同様であった。Table 3 は偏性嫌気性菌群に対する成績で、DL-8280 は *F. varium* ATCC 8501 および *F. perfoetus* CCI を除くほとんどすべての菌株に対して MIC 0.78~6.25 $\mu\text{g/}$

Table 3 Antibacterial spectrum (obligate anaerobes)

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	DL-8280	NFLX	PPA	CLDM
<i>Bacteroides fragilis</i>				
subsp. <i>fragilis</i> Pa 2-11	1.56	100	>100	>100
subsp. <i>fragilis</i> NCTC 9343	1.56	50	>100	0.39
subsp. <i>thetaiotaomicron</i> AS-126	6.25	>100	>100	3.13
subsp. <i>thetaiotaomicron</i> E-50	3.13	>100	>100	0.39
subsp. <i>vulgatus</i> AM-45	1.56	25	>100	0.20
subsp. <i>vulgatus</i> F-92	1.56	25	>100	0.20
subsp. <i>distasonis</i> E-32	3.13	100	>100	>100
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 2377	25	100	>100	3.13
<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 8501	100	>100	>100	6.25
<i>Fusobacterium perfoetus</i> CCI	100	>100	>100	0.39
<i>Fusobacterium mortiferum</i> ATCC 9817	12.5	12.5	>100	0.39
<i>Fusobacterium symbiosus</i> ATCC 14940	1.56	100	>100	0.39
<i>Veillonella alcalescens</i> ATCC 17745	0.78	3.13	50	0.10
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	0.78	1.56	25	0.10
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	0.78	1.56	25	<0.05
<i>Eubacterium moniliformis</i> VPI 15518	50	25	100	<0.05
<i>Eubacterium tortosum</i> VPI III 01A	6.25	3.13	>100	<0.05
<i>Bifidobacterium eriksonii</i> VPI 1935	0.78	25	>100	0.10
<i>Clostridium perfringens</i> 22	3.13	3.13	50	0.20
<i>Clostridium ramosum</i> VPI 1679	3.13	3.13	50	0.39
<i>Clostridium indolis</i> ATCC 25771	0.78	12.5	100	<0.05
<i>Clostridium oroticum</i> ATCC 13619	3.13	3.13	>100	0.10
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> VPI 5045	1.56	12.5	100	0.78
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> VPI 3372	1.56	>100	>100	0.39

NFLX : norfloxacin, PPA : pipemidic acid, CLDM : clindamycin hydrochloride

mlの強い抗菌力を示した。特に NFLX および PPA の MIC が 25~>100 $\mu\text{g/ml}$ である *B. fragilis* 群に対して DL-8280 は 1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、本菌群に対して特徴的に強い抗菌力を示した。*B. fragilis* subsp. *fragilis* Pa 2-11 および subsp. *distasonis* E-32 は CLDM 耐性菌 (MIC>100 $\mu\text{g/ml}$) であるが、この2菌株に対して DL-8280 はそれぞれ MIC が 1.56 および 3.13 $\mu\text{g/ml}$ の強い抗菌力を示した。

以上のように、DL-8280 はグラム陽性および陰性の通性嫌気性菌、好気性菌、偏性嫌気性菌のいずれに対しても強い抗菌力を示し、抗菌スペクトルの広いことが明らかにされた。

2. 臨床分離株の感受分布

1979~1981年に当研究室に集積した患者病巣由来細菌(以下臨床分離株)507株に対する DL-8280 および NFLX の抗菌力を測定し、その MIC 分布を求め、使用各菌株の 50% および 90% を阻止する濃度 (MIC₅₀, MIC₉₀) を算出した。

Table 4 は、グラム陽性菌群での成績で、*S. aureus* に対する DL-8280 と NFLX の MIC はそれぞれ 0.20~0.39 $\mu\text{g/ml}$ および 0.39~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の範囲に分布し、DL-8280 がきわめて狭い濃度域で有効なことが明らかにされた。その他の菌種においても DL-8280 は NFLX の約 1/10 以下の濃度域で全株の発育を阻止した。Table

Table 4 Antibacterial activities of DL-8280 and norfloxacin against clinical isolates (gram-positive bacteria)

Organisms (No. of strains tested)	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
<i>Staphylococcus aureus</i> (50)	DL-8280	0.20~0.39	0.18	0.34
	NFLX	0.39~3.13	0.75	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (43)	DL-8280	0.10~1.56	0.27	0.66
	NFLX	0.10~12.5	0.57	2.35
<i>Streptococcus faecalis</i> (47)	DL-8280	0.39~3.13	0.81	1.40
	NFLX	1.56~6.25	2.05	3.30
Other <i>Streptococcus</i> sp. (26)	DL-8280	0.78~3.13	0.89	1.43
	NFLX	0.78~25	2.50	5.95

Table 5 Antibacterial activities of DL-8280 and norfloxacin against clinical isolates (gram-negative bacteria)

Organisms (No. of strains tested)	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
<i>Escherichia coli</i> (50)	DL-8280	<0.05~3.13	<0.05	0.28
	NFLX	<0.05~12.5	0.06	0.32
<i>Klebsiella</i> sp. (50)	DL-8280	0.10~12.5	0.14	3.13
	NFLX	<0.05~12.5	0.16	6.25
<i>Enterobacter</i> sp. (50)	DL-8280	<0.05~12.5	0.09	0.39
	NFLX	<0.05~12.5	0.08	0.27
<i>Proteus mirabilis</i> (40)	DL-8280	0.10~0.20	0.12	0.18
	NFLX	<0.05~0.39	0.09	0.18
Indole (+) <i>Proteus</i> sp. (50)	DL-8280	<0.05~0.78	0.08	0.25
	NFLX	<0.05~1.56	0.06	0.18
<i>Serratia marcescens</i> (36)	DL-8280	0.20~25	0.55	9.50
	NFLX	0.20~50	0.55	16.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (45)	DL-8280	0.10~25	0.52	2.23
	NFLX	0.10~12.5	0.28	1.06
<i>Haemophilus</i> sp. (20)	DL-8280	<0.05~1.56	0.29	1.12
	NFLX	<0.05~3.13	0.26	1.34
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (45)	DL-8280	<0.006~0.05	0.009	0.02
	NFLX	0.013~0.05	0.018	0.04
	ABPC	0.013~25	0.14	0.43

NFLX : norfloxacin, ABPC : ampicillin

5 は, グラム陰性菌群での成績で, DL-8280 と NFLX の *E. coli* に対する MIC はそれぞれ <0.05~3.13 $\mu\text{g/ml}$ および <0.05~12.5 $\mu\text{g/ml}$ の範囲に分布し DL-8280 の方が NFLX の 1/4 程低濃度で全株の発育を阻止した。 *Klebsiella* sp. に対しては MIC 上限は同じ (12.5 $\mu\text{g/ml}$) であったが下限は NFLX の方が低く (<0.05 $\mu\text{g/ml}$)

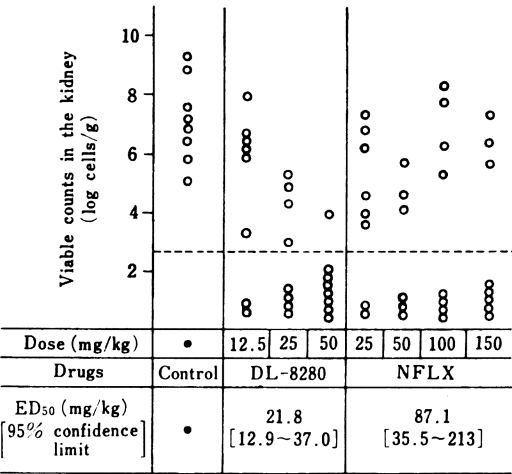
ml), DL-8280 (0.10 $\mu\text{g/ml}$) より低濃度域で発育阻止が認められた。 *Enterobacter* sp. に対しては両剤ともまったく同じ MIC 分布 (<0.05~12.5 $\mu\text{g/ml}$) を示した。 *Proteus* 属に対してもほぼ同様で DL-8280 は <0.05~0.78 $\mu\text{g/ml}$, NFLX は <0.05~1.56 $\mu\text{g/ml}$ の MIC 分布を示した。 *S. marcescens* および *P. aeruginosa* に対

Table 6 Protective effect on bacterial infections in mice

Organisms	Challenge dose (log cells/mouse) [× MLD]	Route	Drugs	MIC (μg/ml)		ED ₅₀ (mg/kg) ^{a)} [95% confidence limit]
				10 ⁶ cells/ml	10 ⁸ cells/ml	
<i>Staphylococcus aureus</i> E46	8.41 [2]	p.o.	DL-8280	0.39	0.39	10.3 [7.60~13.8]
		p.o.	NFLX	1.56	1.56	61.7 [78.4~78.6]
		p.o.	PPA	50	100	>500
<i>Escherichia coli</i> E77156	6.53 [2]	p.o.	DL-8280	0.20	0.20	0.56 [0.33~0.94]
		p.o.	NFLX	0.10	0.10	1.90 [1.28~2.81]
		p.o.	PPA	1.56	1.56	11.4 [8.08~16.1]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3167	1.81 [2]	p.o.	DL-8280	0.20	0.78	1.73 [1.13~2.64]
		p.o.	NFLX	0.20	0.78	14.0 [8.08~24.3]
		p.o.	PPA	3.13	3.13	66.0 [18.2~239]
<i>Serratia marcescens</i> 13001	7.92 [2]	p.o.	DL-8280	0.10	0.20	1.17 [0.52~2.65]
		p.o.	NFLX	0.05	0.10	5.69 [3.12~10.4]
		p.o.	PPA	1.56	1.56	23.4 [16.3~33.5]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PI-III	7.66 [2]	p.o.	DL-8280	0.78	0.78	11.7 [7.82~17.5]
		p.o.	NFLX	0.39	0.39	31.8 [28.2~38.6]
		p.o.	PPA	6.25	12.5	144 [109~190]

^{a)} ED₅₀: 50% effective dose which was calculated according to the method of LITCHFIELD-WILCOXON.

Fig. 2 Curative effect of DL-8280 and norfloxacin on pseudomonal ascending pyelonephritis in mice



してはやや活性が低く、DL-8280 と NFLX の MIC 分布はそれぞれ 0.20~25 μg/ml、0.20~50 μg/ml および 0.10~25 μg/ml、0.10~12.5 μg/ml で MIC₉₀ 値も 9.50 μg/ml、16.0 μg/ml および 2.23 μg/ml、1.06 μg/ml と *Klebsiella* sp. を除く上記各菌種の約 10~100 倍高い値を示した。*Haemophilus* sp. に対しては両剤とも上記高感受性腸内細菌群 (*E. coli*, *Proteus* 属) とほぼ同様の

MIC 分布 (<0.05~1.56 μg/ml および <0.05~3.13 μg/ml) を示したが、MIC₉₀ 値は 5~10 倍高値 (1.12 μg/ml および 1.34 μg/ml) で上記腸内細菌群よりもやや低感受性株の多いことを示唆した。*N. gonorrhoeae* は最も高感受性で、両剤の MIC₉₀ 値も DL-8280 が 0.02 μg/ml、NFLX が 0.04 μg/ml と、対照の ABPC (0.43 μg/ml) より 10 倍以上強い抗菌力を示した。

以上のように、今回対象としたグラム陰性臨床分離菌株は DL-8280 および NFLX に対してほぼ同等の高感受性を示し、DL-8280 に対する高度耐性株は認められなかった。またグラム陽性菌株に対しては、DL-8280 は NFLX よりも有意に高い抗菌活性を示した。

3. マウス感染防御効果

DL-8280 の *in vivo* 抗菌力を、各種菌株によるマウス急性菌、敗血症型感染症に対する防御効果により、NFLX と PPA を対照薬として比較検討した (Table 6)。

S. aureus E46 感染系に対し、DL-8280 の ED₅₀ 値は 10.3 mg/kg で、NFLX の 6 倍、PPA の約 50 倍以上すぐれた効果を示した。*E. coli* E77156 感染に対しては、ED₅₀ 値が 0.56 mg/kg であり、NFLX の約 3 倍、PPA の約 20 倍すぐれた効果であった。*K. pneumoniae* 3167 および *S. marcescens* 13001 の感染に対しても、*E. coli* と同様、他剤に比較して 5~38 倍すぐれた効果を示した。*P. aeruginosa* PI-III では、DL-8280 の ED₅₀ 値は 11.7 mg/kg で、NFLX の約 3 倍、PPA の 12 倍すぐれた効果であった。

以上のように、今回対象としたいずれのマウス感染系に対しても DL-8280 は対照薬をはるかに凌駕する高い防御効果を示した。特に *in vitro* (MIC 値) では NFLX の方が強い抗菌力を示した *E. coli* E 77156, *S. marcescens* 13001 および *P. aeruginosa* PI-III の感染系に対しても NFLX に勝る防御効果を示した。

4. マウス上行性腎盂腎炎に対する治療効果

生後 8 週齢の Slc: ddY 系雌マウスに *P. aeruginosa* No. 15 の 10^5 cells をカテーテルを用いて膀胱内接種することにより上行性腎盂腎炎の成立することはすでに TANAKA ら¹⁶⁾ が報告している。今回はこの模型病像に対する DL-8280 の治療効果を NFLX を対照として比較検討した。

DL-8280 50 mg/kg 投与群では感染 1 日後から 1 日 1 回連続 5 日間投与で 8 例中 7 例が完全治癒し、NFLX 50 mg/kg 投与群では 6 例中 3 例が完全治癒した (Fig. 2)。他の DL-8280 投与群の未治癒例では、腎内生菌数が用量の増加とともに有意な減少傾向がみられたが、NFLX 投与群ではそれがみられず、150 mg/kg 投与群でも未治癒例の腎内生菌数はそれ以下の用量 (25, 50, 100 mg/kg) 群のそれと差がなく $10^5 \sim 10^6$ cells/g の菌が生残した。完全治癒例数から算出した ED_{50} 値は DL-8280 が 21.8 mg/kg, NFLX が 87.1 mg/kg で、DL-8280 の方が約 4 倍すぐれた効果を示した。

考 察

ピリドンカルボン酸系薬剤は、従来特にグラム陰性菌用経口抗菌剤として、主に尿路感染症に多用されてきた。そのうち最近開発された NFLX は、グラム陰性菌のみならずグラム陽性菌に対しても強い抗菌力を示すことが認められている^{9,11,17)}。

DL-8280 の *in vitro* の抗菌力を、主としてこの NFLX あるいは PPA と比較したところ、グラム陽性菌群に対しては、NFLX よりも強い抗菌力を示した。特に従来本系統薬剤が無効とされている streptococci に対しても NFLX の数倍強い抗菌力を示すなど、ピリドンカルボン酸系薬剤のなかでは最も強力な活性のあることが明らかにされた。グラム陰性菌群、特に *Enterobacteriaceae* 群に対しては NFLX とほぼ同等あるいはそれ以上、PPA よりはるかに強力な抗菌力を有することが確認された。ブドウ糖非発酵グラム陰性菌群に対しては、*P. aeruginosa* に対し NFLX のほぼ 1/2 程度、GM とほぼ同程度の抗菌力であったが、他の菌種に対しては NFLX や GM より強力な抗菌力を示した。特に *P. maltophilia*, *P. putida*, *A. anitratus* に対して NFLX の 4~16 倍強い抗菌力を示した。偏性嫌気性菌に対して従来のピリドンカルボン酸系薬剤の抗菌力は弱く、NFLX が *Euba-*

cterium 属、*Propionibacterium* 属あるいは *Clostridium* 属の一部の菌種に活性を示すのみであった¹⁸⁾。DL-8280 はこれら菌属をはじめ、*B. fragilis* 群、*Fusobacterium* 属の一部の菌種および *Veillonella* 属に対しても高い抗菌力を示した。さらに各種 *Mycoplasma* 属に対しても DL-8280 はテトラサイクリン系抗生物質と同等もしくはそれ以上の抗菌力を示すことが明らかにされており¹³⁾、本薬剤は従来のピリドンカルボン酸系薬剤にくらべて一段と広い抗菌スペクトルを有することが明らかにされた。このことは、グラム陽性の通性嫌気性菌あるいは好気性菌による感染症のみならず、従来本系統薬剤の臨床使用の対象とならなかった偏性嫌気性菌感染症あるいは各種 *Mycoplasma* 感染症に対する DL-8280 の臨床的応用の可能性を示唆していると思われる。

今回対象とした各種臨床分離菌株中には、DL-8280 あるいは NFLX に対する高度耐性 (MIC >100 μ g/ml) 株がみられなかったが、このことは両薬剤とも開発途上であって臨床使用頻度が低く、各分離菌株とも耐性獲得に至らなかったことが第一の原因と考えられる。さらに自然耐性株あるいは R プラスミドによる伝達耐性株の存在は今のところ否定されると考えられる。また、NA あるいは PPA 耐性菌の DL-8280 交差耐性の有無については今後さらに精査する必要がある、より多数の臨床分離株について検討するとともに、実験的 NA および PPA 耐性株を用いて検討する予定である。

In vivo 抗菌力は、各種菌株によるマウス急性菌、敗血症型感染症および *P. aeruginosa* No. 15 によるマウス上行性腎盂腎炎に対する防御効果および治療効果によって検討した。DL-8280 の感染防御効果は、今回用いたいずれの感染系においても対照の NFLX や PPA の効果よりも有意に高く、単にその抗菌力の強さのみならず、経口吸収性の良さが示唆された。特に MIC 値では NFLX の方がすぐれている菌株 (*E. coli* E 77156, *S. marcescens* 13001, *P. aeruginosa* PI-III) でも、その感染防御効果は DL-8280 の方が数倍以上すぐれており、その経口吸収性あるいは体内動態の優位性が示唆された。今回用いたマウス腎盂腎炎模型では、感染 6 時間後には組織学的に腎盂上皮細胞の剝離と同局所への多形核球の浸潤がみられ、1 日後には間質での菌の増殖が確認されている。2~3 日後には腎内生菌数が 10^8 cells/g 以上となり、他臓器への転移 ($10^2 \sim 10^7$ cells/g) がみられるようになる。腎の化膿性病変はさらに拡大し、5~7 日後には、びまん性の化膿性壊死性腎盂腎炎により約 70% のマウスは死亡する¹⁶⁾。この模型病像に対して DL-8280 あるいは NFLX を感染 1 日後から 1 日 1 回連続 5 日間経口投与したところ、いずれの投与群も死亡例はみられな

った。今回組織所見は示さなかったが、両薬剤の投与によって致死的病変にまでは進展しなかったことが推察される。腎内生菌数は両薬剤間でかなり著しい差がみられ、DL-8280 投与群では投与量 (12.5~50 mg/kg) の増加に呼応した菌数減少がみられ、50 mg/kg 投与群では8例中7例に菌の消失が認められた。これに対して NFLX 投与群では、投与量 (25~150 mg/kg) の増加に伴って菌消失例は用量感応的に増加したが、非消失例では、用量に関係なく多数の菌が生残しており、菌数の上では用量感応性が認められなかった。このことは、病巣中心部に局在している菌にまで NFLX の抗菌効果が及ばなかったことを示唆しており、組織内および病巣内移行性の点で DL-8280 の方がすぐれていることを示唆するものであると考える。

文 献

- 1) 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 & Chemoth.* pp. 583~587, 1963
- 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 & Chemoth.* pp. 475~479, 1967
- 3) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & Y. TAKASE: Pivomidic acid, a new antibacterial agent: antibacterial properties. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* pp. 117~112, 1970
- 4) LUMISH, R.M. & C.W. NORDEN: Cinoxacin: *in vitro* antibacterial studies of new synthetic organic acid. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7: 159~163, 1975
- 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 & Chemoth.* 8: 132~138, 1975
- 6) NAGATE, T.; S. KURASHIGE & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of AB-206, a new naphthyridine derivative. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 17: 203~208, 1980
- 7) KHAN, M.Y.; Y. SIDDIQUI & R.P. GRUNINGER: Comparative *in vitro* activity of MK-0366 and other selected oral antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 20: 265~266, 1981
- 8) O'CONNOR, J.R.; R.A. DOBSON, P.E. CAME & R.B. WAGNER: Rosoxacin, a new synthetic agent for the treatment of systemic gram-negative infections. *In Current Chemotherapy and Infectious Diseases* (J.D. NELSON & C. GRASSI, Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 440~442, 1980
- 9) ITO, A.; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI: *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 17: 103~108, 1980
- 10) KING, A.; C. WARREN, K. SHANNON & I. PHILLIPS: *In vitro* antibacterial activity of norfloxacin (MK-0366). *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 31: 604~607, 1982
- 11) 伊藤 明, 井平敬二, 井上松久, 三橋 進: AM-715に関する細菌学的検討. *Chemotherapy* 29 (S-4): 1~11, 1981
- 12) SATO, K.; Y. MATSUURA, M. INOUE, T. UNE, Y. OSADA, H. OGAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 22: 548~553, 1982
- 13) OSADA, Y. & H. OGAWA: Antimycoplasmal activity of ofloxacin (DL-8280). *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 23: 509~511, 1983
- 14) LITCHFIELD, J.T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol.* 92: 99~113, 1948
- 15) TANAKA, N.; T. UNE & H. OGAWA: Experimental pyelonephritis in mice following ascending infection with *E. coli*. Acute phase. *Acta Pathol. Jpn.* 31: 179~187, 1981
- 16) TANAKA, N.; T. UNE & H. OGAWA: Ascending pyelonephritis with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Acta Pathol. Jpn.* 32: 613~620, 1982
- 17) 五島登智子: 小川正俊, 金子康子, 武藤弓子, 桑原章吾: 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中濃度について. *Chemotherapy* 29 (S-4): 12~26, 1981
- 18) 甲畑俊郎, 後藤加寿美, 江崎孝行, 丸井利軌, 山田 寿, 鈴木祥一郎: AM-715 の嫌気性菌に対する抗菌作用について. *Chemotherapy* 29 (S-4): 45~48, 1981

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DL-8280

YASUAKI OSADA, TSUTOMU UNE, TORU IKEUCHI and HIDEMASA OGAWA

Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Tokyo

DL-8280, ($\pm$)-9-fluoro-2, 3-dihydro-3-methyl-10-(4-methy-1-piperaziny)-7-oxo-7H-pyrido [1, 2, 3-*de*][1, 4]benzoxazine-6-carboxylic acid, is a new nalidixic acid analog with a broad spectrum of antibacterial activity against gram-negative and gram-positive bacteria, including obligate anaerobes. The activity of DL-8280 against *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* sp., *Neisseria gonorrhoeae* and *Clostridium* sp. was roughly comparable to that of norfloxacin and far exceeded that of pipemidic acid. DL-8280 had greater activity against staphylococci, streptococci, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter anitratus* and *Bacteroides fragilis* than did norfloxacin and pipemidic acid. Ampicillin-resistant gonococci and clindamycin-resistant obligate anaerobes were also susceptible to DL-8280. Administered orally to mice experimentally infected with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* or *Pseudomonas aeruginosa*, DL-8280 was 3 to 8 times more active than norfloxacin and 12 to more than 50 times more active than pipemidic acid.