

AT-2266 に関する細菌学的評価

西野武志・柏本茂樹・中澤季美・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

新しい合成化学療法剤 AT-2266 に関する細菌学的評価を Pipemidic acid (PPA) と Norfloxacin (NFLX) を比較薬として検討し、以下の成績を得た。

1. AT-2266 はグラム陽性、陰性菌群および嫌気性菌に対し幅広い抗菌スペクトラムを有し、NFLX とほぼ同様の抗菌力を示した。
2. 臨床分離株に対する感受性分布では、AT-2266 は PPA より優れた抗菌力を示し、また、*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* および *Serratia marcescens* に対しては NFLX とほぼ同様の抗菌力を示したが、*Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, インドール陽性の *Proteus* spp., *Haemophilus influenzae* および *Pseudomonas aeruginosa* に対しては NFLX の方が AT-2266 に比べ 2 倍程度抗菌力が良好であった。しかし、*Acinetobacter calcoaceticus* に対する抗菌力は AT-2266 の方が NFLX に比べ 2 倍程度優れていた。
3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響では、培地 pH がアルカリ側で、また接種菌量が減少した場合に抗菌力がやや良好となる傾向を示した。馬血清添加による抗菌力の変動はほとんど見られなかった。
4. *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* および *A. calcoaceticus* の増殖曲線に及ぼす影響を検討した結果、いずれの菌株においても 1 MIC 濃度で殺菌作用を示した。
5. 位相差顕微鏡による形態観察を行ったところ、*S. aureus* に対しては AT-2266 の 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用で菌体の膨化像が、*E. coli* に対しては 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で菌の伸長化像が、*P. aeruginosa* に対しては 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度から伸長化した菌体内に空胞が、そして、*A. calcoaceticus* に対しては 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度から膨化を伴った伸長化像がそれぞれ観察された。
6. マウス実験の全身感染症に対する AT-2266 の治療効果をグラム陽性菌 1 株とグラム陰性菌 8 株について検討した結果、AT-2266 はこれらすべての感染症に対して優れた治療効果を示し、その効果は PPA および NFLX より勝っていた。また、投与回数の増加および感染菌量の減少により、AT-2266 の ED₅₀ 値は低下する傾向を示し、いずれの条件においても PPA および NFLX より低値を示した。
7. 実験的尿路感染症に対する治療効果を腎内生菌数の消長で比較検討した結果、AT-2266 は低投与量で菌数減少を認め、PPA および NFLX より良好な効果を示した。
8. 実験的肺感染症に対する治療効果では延命的な効果を示すと共に、短時間で肺内生菌数の減少を示し、その効果は PPA および NFLX に比べ優れていた。
9. 肺感染マウスを用いて AT-2266, PPA および NFLX の血漿中および肺内濃度を測定した結果、AT-2266 および PPA は血漿中濃度に比べ肺内濃度が 2 倍程度高かった。これに対し NFLX はほぼ同程度の濃度であった。また、AT-2266 は NFLX に比べピーク時では血漿中で 4 倍、肺中では 7 倍の高い薬物濃度を示した。

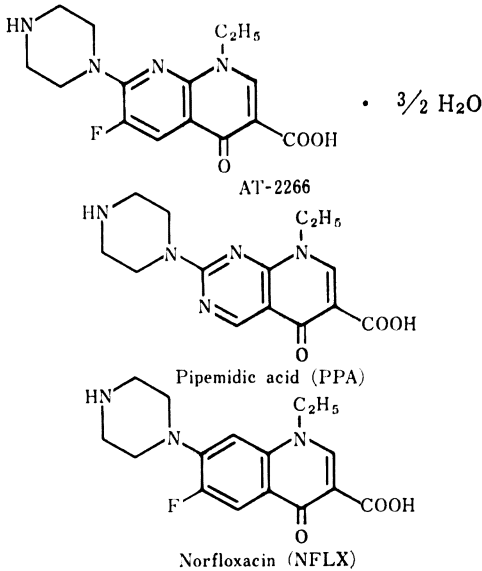
AT-2266 は大日本製薬株式会社総合研究所において開発された新しいピリドンカルボン酸系合成化学療法剤である。

化学名は 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid で、その水合物の分子式は $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 、分子量は 347.35 で、白

色ないし微黄色の結晶または結晶性の粉末である。AT-2266 の化学構造式を比較薬と共に Fig. 1 に示した。

本剤の特徴はグラム陽性菌 および グラム陰性菌群に対して広範囲に強い抗菌力を示し、経口投与によって優れた治療効果を示すことであるといわれている¹⁾。すなわち、従来のピリドンカ

Fig. 1 Chemical structures of AT-2266, Pipemicid acid and Norfloxacin



ルボン酸系合成抗菌剤である Nalidixic acid, Piromidic acid および PPA では、比較的抗菌力が弱かった *S. aureus*, *S. pyogenes* および *P. aeruginosa* などに対しても AT-2266 は *in vitro* および *in vivo* において強い抗菌力を示すとされている。今回、われわれは PPA^{2,3)} と NFLX⁴⁾ を比較薬として、AT-2266 に関する種々の細菌学的評価を行ったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬物

AT-2266, PPA および NFLX はいずれも力価の明らかな標品を用いた。

2. 抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌18株とグラム陰性菌34株に対する試験管内抗菌力は前培養に sensitivity test broth (STB; Eiken) を、感受性測定には sensitivity test agar (STA; Eiken) を用い、日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法⁵⁾ に準じて求めた。ただし、*Streptococcus* 属および *Corynebacterium diphtheriae* は10%馬脱繊維血液加 Heart infusion agar (HIA; Nissui) を用い、37°C 20時間培養後に、また、*Neisseria* 属は1%の割合に supplement (Eiken) を加えた GC agar (Nissui) を用い、37°C 48時間ローツク培養後に MIC を求めた。そして嫌気性菌11株に対する MIC 測定には GAM agar (Nissui) を用い、anaerobic system (N₂: 80%, CO₂: 10%, H₂: 10%) 内で37°C, 24時間嫌気培養後の MIC を求めた⁶⁾。

3. 臨床分離株の感受性分布

臨床材料から分離された菌株の感受性は 10⁶ cells/ml の菌液1白金耳を接種菌量として前述の寒天平板希釈法⁷⁾により求めた。

S. pyogenes は前培養に10%馬血清加 tryptose broth (TSB; Nissui) を、感受性測定には10%馬脱繊維血液加 HIA 培地を用い、*H. influenzae* は前培養に5% Fildes enrichment 加 TSB 培地を、感受性測定には5% Fildes enrichment 加 HIA 培地を用いた。その他の菌株は前培養に TSB 培地を、感受性測定には HIA 培地を用いた。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加ならびに接種菌量の影響は *S. aureus* 209-P JC, *E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1 および *P. aeruginosa* E-2 を試験菌として STA 培地を用いた寒天平板希釈法で検討した。

なお記載しないかぎり接種菌量は 10⁶ cells/ml で行った。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

TSB 培地で 37°C, 18時間培養した *S. aureus* Smith, *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55, *P. aeruginosa* E-2 および *A. calcoaceticus* Ac-54 を試験菌とし、これらの前培養した菌液を Heart infusion broth (HIB; Nissui) で希釈した後、約3時間振盪培養した対数期の菌 (約10⁷ cells/ml) に種々の濃度の薬物を作用させ、4時間後までの生菌数を経時的に測定した。

6. 形態変化

S. aureus 209-P JC, *E. coli* K-12, *P. aeruginosa* E-2 および *A. calcoaceticus* Ac-54 の対数増殖期の菌液 (約10⁷ cells/ml) をスライドガラス上の AT-2266 を含んだフィルム寒天上に塗抹し、カバーガラスを載せてパラフィンで封入後、37°C で培養し、位相差顕微鏡 (日本光学, 倍率×1000) を用いて菌の形態変化を観察した。

7. マウス実験の全身感染症に対する治療効果

1) 1回投与における治療効果

使用動物は雌性 ddY マウス (4週齢, 18~21g) を用い、1群10匹とした。感染菌として用いた *S. aureus* Smith, *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55, *Proteus morganii* No. 101, *P. aeruginosa* E-2, 15878, 15426 および *A. calcoaceticus* Ac-54 は nutrient broth (NB; Nissui) で37°C 一夜培養後、NB培地で希釈を行い、等量の6% gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) と混合した後、その0.5ml をマウス腹腔内に接種した。菌接種2時間後に

Table 1 Antibacterial spectrum (Gram-positive bacteria)

(10⁸ cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AT-2266	PPA	NFLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.78	12.5	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.78	12.5	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.78	25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	0.78	25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.78	25	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80	0.78	50	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.13	200	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	12.5	200	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook*	50	200	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203*	12.5	200	3.13
<i>Streptococcus faecalis</i> *	50	800	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I*	12.5	400	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II*	25	200	6.25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III*	6.25	400	3.13
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	3.13	12.5	1.56
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	25	100	25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	6.25	0.39
<i>Bacillus anthracis</i>	0.78	12.5	0.39

Medium : Sensitivity test agar (Eiken)

*Heart infusion agar supplemented with 10% horse blood

Table 2 Antibacterial spectrum (Gram-positive bacteria)

(10⁸ cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AT-2266	PPA	NFLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.39	12.5	0.19
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.39	6.25	0.19
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.39	12.5	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	0.39	12.5	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.78	12.5	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80	0.78	25	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.56	100	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23*	3.13	200	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook*	1.56	200	0.78
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203*	6.25	200	1.56
<i>Streptococcus faecalis</i> *	6.25	800	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I*	3.13	200	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type II*	6.25	200	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III*	3.13	200	1.56
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	0.78	12.5	0.39
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12.5	100	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	6.25	0.19
<i>Bacillus anthracis</i>	0.39	6.25	0.19

Medium : Sensitivity test agar (Eiken)

*Heart infusion agar supplemented with 10% horse blood

Table 3 Antibacterial spectrum (Gram-negative bacteria)

(10⁸ cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AT-2266	PPA	NFLX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0.05	0.78	0.025
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.05	0.78	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.19	3.13	0.19
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.10	1.56	0.10
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.19	1.56	0.10
<i>Escherichia coli</i> KC-14	0.19	1.56	0.10
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	1.56	6.25	0.78
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.10	3.13	0.10
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.10	1.56	0.025
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.10	0.78	0.05
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.19	3.13	0.10
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.19	1.56	0.19
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.39	1.56	0.10
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.19	1.56	0.10
<i>Shigella flexneri</i> Komagome	0.19	1.56	0.10
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	1.56	0.05
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.19	1.56	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.19	1.56	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.19	1.56	0.10
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.39	6.25	0.39
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.39	1.56	0.10
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.39	6.25	0.39
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.10	1.56	0.05
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	1.56	12.5	0.78
<i>Serratia marcescens</i> T-55	0.78	3.13	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.19	6.25	0.10
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.19	3.13	0.10
<i>Proteus morgani</i> Kono	0.39	6.25	0.19
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.10	1.56	0.05
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.39	3.13	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	1.56	12.5	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	0.19	3.13	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	1.56	50	0.78
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	6.25	100	6.25

Medium : Sensitivity test agar (Eiken)

*GC medium (Nissui)

0.5% Carboxymethylcellulose に懸濁した薬物を1回経口投与し、その後7日間、生死の観察を行い生存率を求め Litchfield-Wilcoxon 法⁷⁾により ED₅₀ 値を算出した。

2) 投与回数ならびに感染菌量の影響

感染菌は *P. aeruginosa* 15846 を用い、菌液を適宜希

釈し、1群8匹のマウスに 6×10^5 、 6×10^4 および 6×10^3 cells/mouse 腹腔内接種した。感染2時間後に1回、感染2時間と8時間後の2回および感染2時間、8時間および14時間後の3回薬物投与を行い治療効果を比較検討した。また、*S. marcescens* 15701 に対しては1回と3回投与における薬効の比較を行った。

Table 4 Antibacterial spectrum (Gram-negative bacteria)

(10⁶ cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AT-2266	PPA	NFLX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0.05	0.78	0.013
<i>Neisseria meningitidis</i> *	0.05	0.78	0.025
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0.19	1.56	0.10
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.10	0.78	0.05
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.10	1.56	0.05
<i>Escherichia coli</i> KC-14	0.19	1.56	0.10
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.39	3.13	0.39
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.10	3.13	0.10
<i>Salmonella typhi</i> O-901	0.10	1.56	0.025
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.10	0.78	0.025
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0.19	1.56	0.05
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.19	1.56	0.10
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.19	1.56	0.10
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	0.19	1.56	0.05
<i>Shigella flexneri</i> Komagome	0.10	1.56	0.05
<i>Shigella boydii</i> EW-28	0.10	0.78	0.05
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.10	1.56	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0.10	1.56	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.19	1.56	0.10
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	0.39	3.13	0.19
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.10	1.56	0.05
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	0.39	3.13	0.19
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	0.05	0.78	0.025
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	0.78	6.25	0.19
<i>Serratia marcescens</i> T-55	0.78	3.13	0.39
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.19	3.13	0.05
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.19	1.56	0.10
<i>Proteus morgani</i> Kono	0.19	1.56	0.10
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	0.05	1.56	0.05
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	0.39	1.56	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	0.78	12.5	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	0.19	1.56	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	0.78	12.5	0.39
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	1.56	50	3.13

Medium : Sensitivity test agar (Eiken)

*GC medium (Nissui)

8. マウス実験の尿路感染症に対する治療効果⁹⁾

感染菌として *E. coli* KC-14 を用いた。前日より約15時間給水制限した雌性マウスを強制的に排尿させた後、sodium pentobarbital で麻酔し、尿道口周辺をアルコール綿で十分消毒した後、先端をまるめた 1/3 注射針装着の注射筒を用いて菌液 0.1ml (3.8×10^8 cells) を経尿道

的に膀胱内に注入した。膀胱触診によって注入の成否を確認し、直ちに外尿道口を小型クリップで4時間閉鎖した。菌接種4時間後に薬物を経口投与し、翌日両腎を摘出し、生理食塩液を加えてホモジナイズした後、10倍段階希釈して BTB lactose agar (Nissui) による定量培養を行い、両腎当たりの生菌数を求めた。

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Staphylococcus aureus* 69 strains (10⁸ cells/ml)

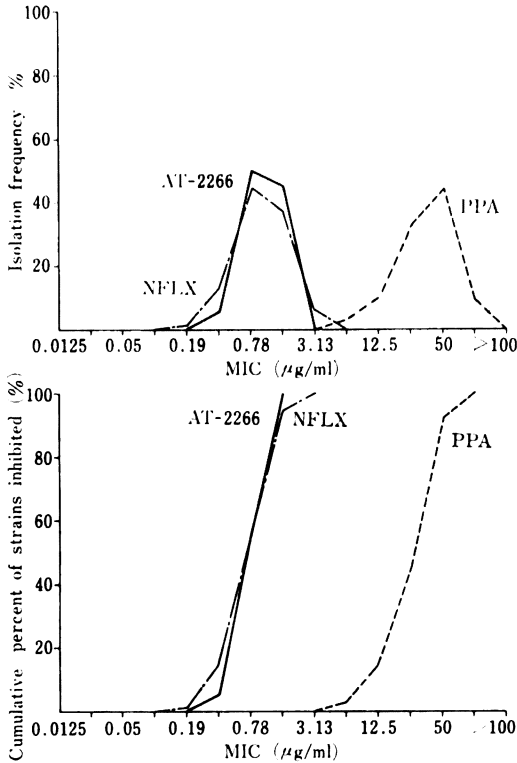
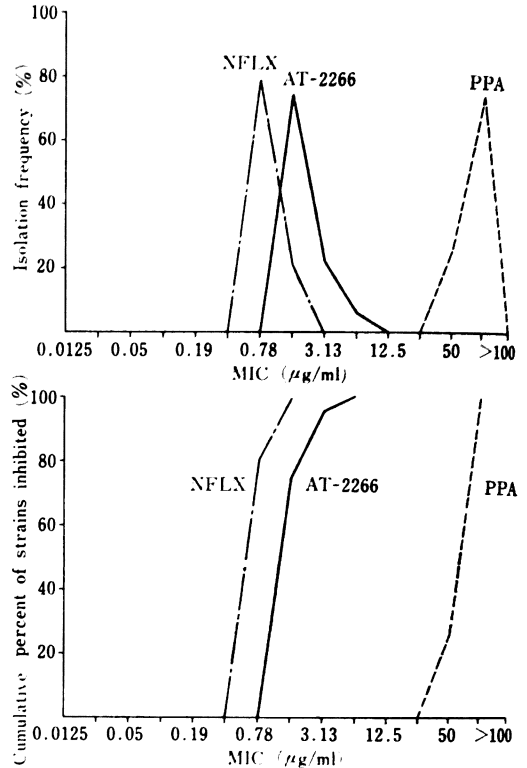


Fig. 3 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Streptococcus pyogenes* 19 strains (10⁸ cells/ml)



1群6匹のマウスを用い、腎内生菌数が 1×10^4 cells 以下の場合を有効と判定し、各投与量における有効率から ED₅₀ 値を算出した。

9. マウス実験の肺感染症に対する治療効果^{9,10)}

感染菌として *K. pneumoniae* DT-S を用いた。長崎大学熱帯医学研究所内科松本教授らの考案された噴霧感染装置を用い、約 1×10^9 cells/ml の菌液 10 ml を 1 kg/cm² 圧で噴霧吸入させ肺に感染させた。感染 15, 21, 39 および 45 時間後、各薬物を経口投与し、7 日目までの生死観察を行った。マウスは 1 群 10 匹とし、5 および 7 日目の生存率を求め ED₅₀ 値を算出した。

また、感染 15 時間後に薬物を 1 回経口投与し、薬物投与 0, 4, 24 および 48 時間後の肺を可及的すみやかに摘出し、ホモジナイズした後、定量培養して肺内生菌数の消長を調べた。

10. 肺感染症マウスにおける血漿および肺内薬物濃度

K. pneumoniae DT-S を噴霧法により感染させたマウスに薬物を感染 15 時間後に 1 回経口投与し 0, 0.25,

0.5, 1, 2, 4, 6 および 8 時間後の血漿と肺内薬物濃度を測定した。

血漿は常法の操作により血液から分離した。また、肺は各グループ (1 群 4 匹) ごとにプールし、その組織重量の 2 倍量の 1/15M リン酸緩衝液 pH 7.0 を加え、ホモジナイズし、80°C で 10 分間加熱後、遠沈により上清を採取して定量用試料とした。

濃度測定は検定菌として *E. coli* Kp を、測定用培地には Mueller-Hinton agar pH 7.0 (Difco) を用いた薄層 disc 法で行い、37°C で一夜培養後、阻止円直径の平均値 (n=3) から濃度を求めた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

教室保存の各種グラム陽性菌、グラム陰性菌および嫌気性菌に対する AT-2266 の試験管内抗菌力を PPA および NFLX と比較検討し、その結果を Table 1~6 に示した。Table 1, 2 はグラム陽性菌に対する抗菌スペクトラムを示しているが、AT-2266 はグラム陽性菌のう

Fig. 4 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Escherichia coli*
62 strains(10^6 cells/ml)

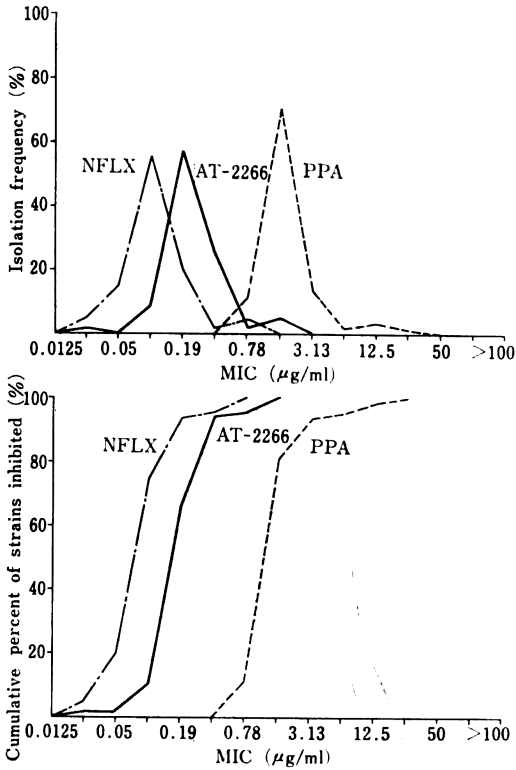
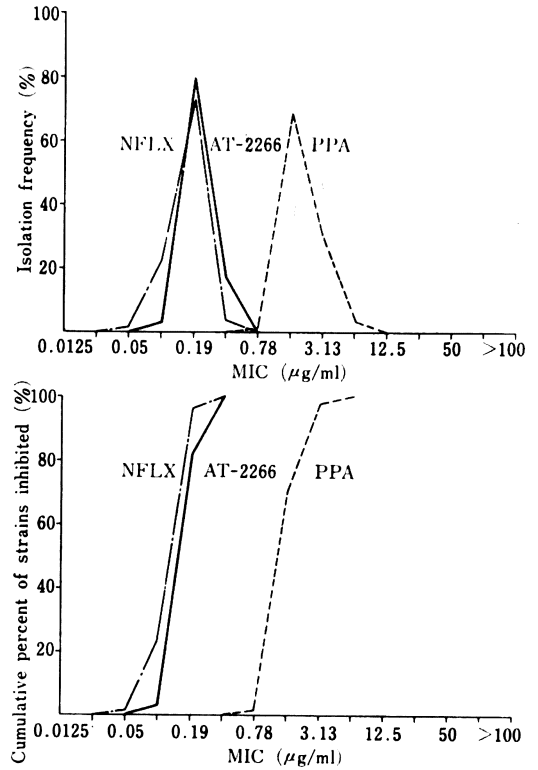


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Klebsiella pneumoniae*
63 strains(10^6 cells/ml)



ち *S. aureus* に対し 10^8 および 10^6 cells/ml の接種で $0.39 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し, NFLX とほぼ同程度の抗菌力を有していた。

また, AT-2266 は *Streptococcus faecalis* および *S. pyogenes* に対しては 10^8 cells/ml で $12.5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の高い MIC 値を示したが, 10^6 cells/ml 接種では $1.56 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示した。

一方, グラム陰性菌に対する AT-2266 の抗菌スペクトラムの結果を Table 3, 4 に示したが, グラム陰性菌のうち *Neisseria* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Hafnia alvei* および *Proteus* spp. に対する AT-2266 の MIC 値は 10^8 cells/ml 接種で $0.05 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ であり, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens* および *P. aeruginosa* に対しても $0.19 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示した。 10^6 cells/ml 接種においてもほとんど同様な MIC 値を示し, その値は NFLX に比べ同等もしくは 2 倍程度高かった。*A. calcoaceticus* に対しては 10^8 cells/ml 接

種で, $6.25 \mu\text{g/ml}$, 10^6 cells/ml で $1.56 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し NFLX とほぼ同等であった。嫌気性菌の 10^8 cells/ml 接種では, グラム陽性菌の *Clostridium* spp. に対し $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示したが, グラム陰性菌の *Bacteroides* spp. には $25 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の高い MIC 値を示した。 10^6 cells/ml の接種でも両菌種の MIC 値は大きな変動を示さず, その値は NFLX に比べ *Clostridium* spp. では 2 倍程度高かったが, *Bacteroides* spp. では 4 倍程度低かった (Table 5, 6)。

2. 臨床分離株の感受性分布

臨床材料から分離された各種菌株の AT-2266 に対する 10^8 cells/ml 接種時の感受性分布を Fig. 2~15 に示した。

S. aureus 69 株の AT-2266 に対する MIC 値は 90% 以上の菌株が $0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ に存在し, その抗菌力は PPA に比べ明らかに優れ, NFLX と同等であった (Fig. 2)。

S. pyogenes 19 株に対して AT-2266 は $1.56 \mu\text{g/ml}$

Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Enterobacter cloacae*
22 strains (10^6 cells/ml)

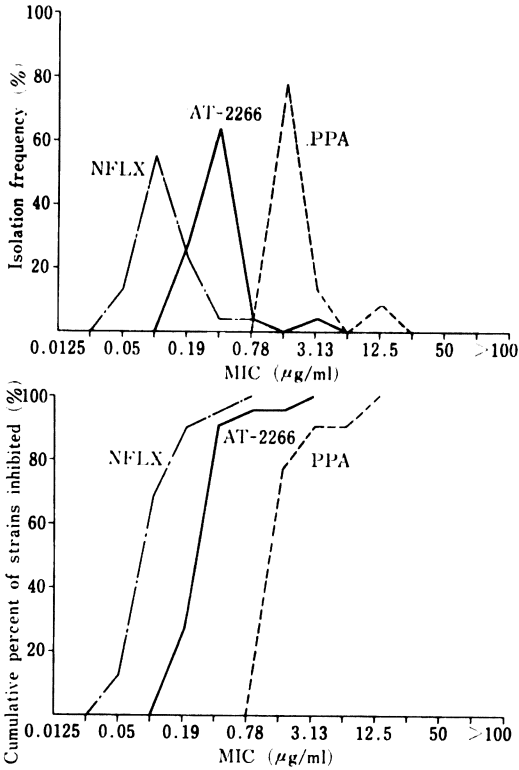


Fig. 7 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Enterobacter aerogenes*
21 strains (10^6 cells/ml)

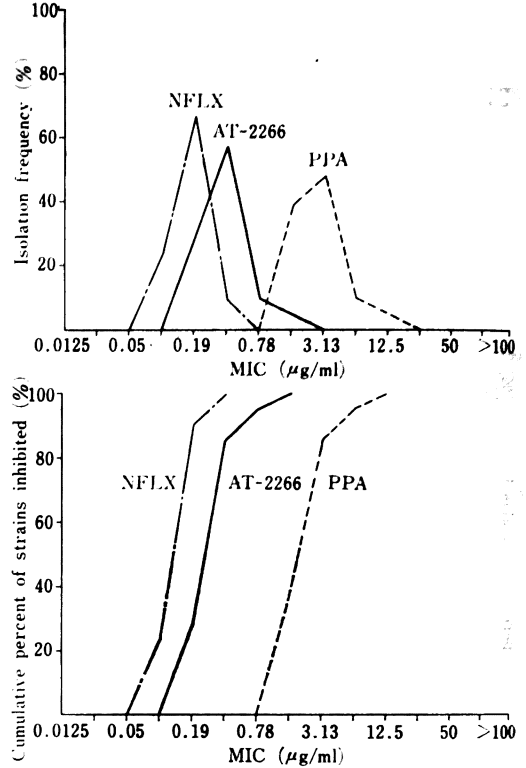


Table 5 Antibacterial spectrum (Anaerobic bacteria)

(10^6 cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AT-2266	PPA	NFLX
<i>Clostridium tetani</i>	1.56	25	0.78
<i>Clostridium perfringens</i>	3.13	50	1.56
<i>Clostridium sporogenes</i>	1.56	25	0.78
<i>Bacteroides fragilis</i> GM7000	25	200	100
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	25	200	25
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	50	200	100
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	25	200	100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	50	400	800
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	50	400	200
<i>Bacteroides vulgatus</i> Es-14	100	800	400
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	100	400	800

Medium : GAM medium (Nissui)

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

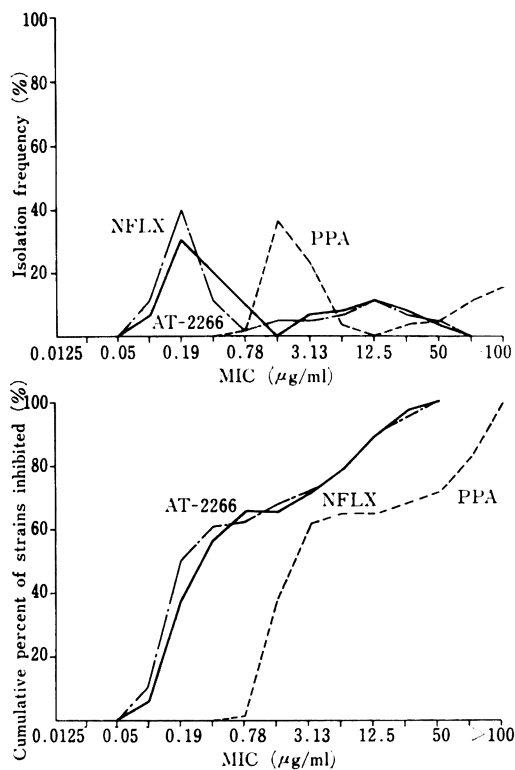


Fig. 9 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Proteus mirabilis*
29 strains (10^8 cells/ml)

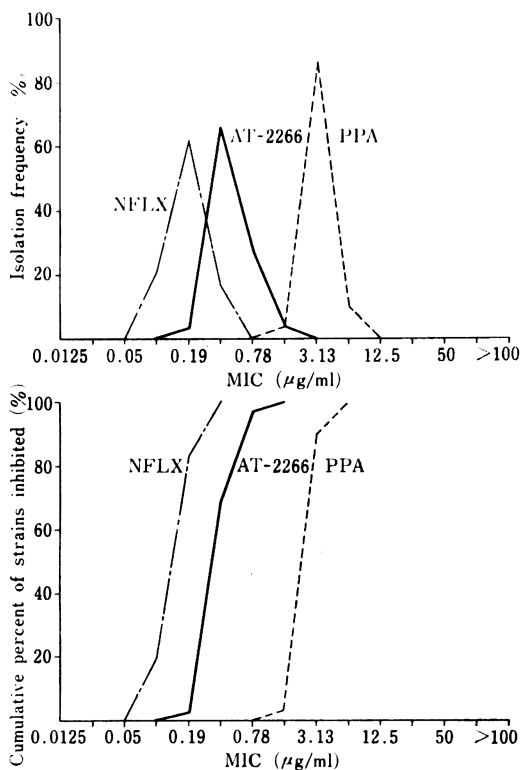


Table 6 Antibacterial spectrum (Anaerobic bacteria)

(10^6 cells/ml)

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AT-2266	PPA	NFLX
<i>Clostridium tetani</i>	0.78	25	0.39
<i>Clostridium perfringens</i>	1.56	25	0.78
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.78	12.5	0.39
<i>Bacteroides fragilis</i> GM7000	25	200	25
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	25	200	25
<i>Bacteroides fragilis</i> V-240-2	25	200	50
<i>Bacteroides fragilis</i> V-283	25	200	50
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5600	50	400	400
<i>Bacteroides distasonis</i> clin-99-3	25	200	200
<i>Bacteroides vulgatus</i> Es-14	50	400	200
<i>Bacteroides ovatus</i> Ju-6-1	100	400	800

Medium : GAM medium (Nissui)

Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus morganii*
28 strains (10^8 cells/ml)

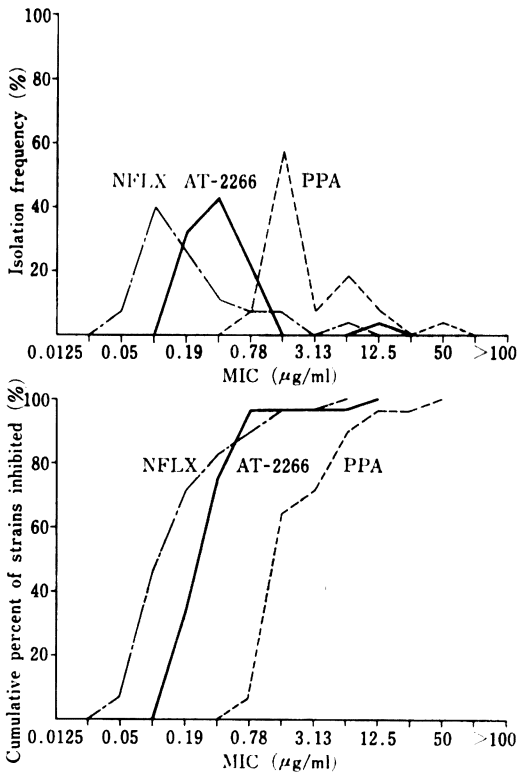
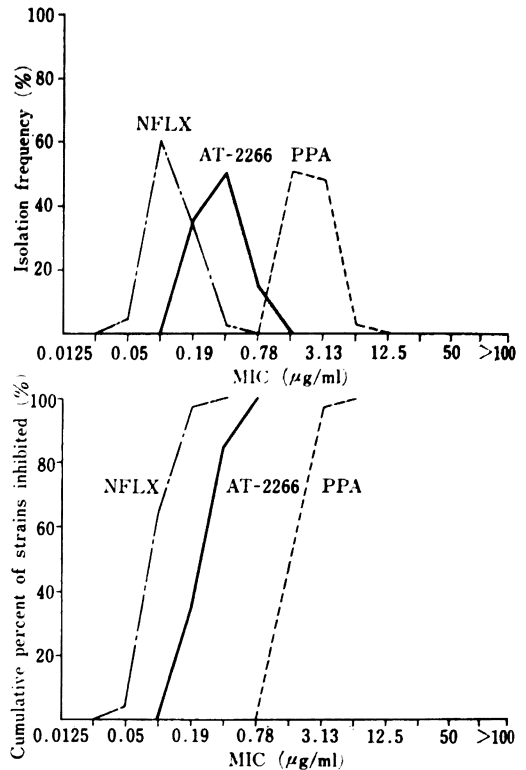


Fig. 11 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Proteus vulgaris*
40 strains (10^8 cells/ml)



に、PPAは100 $\mu\text{g/ml}$ 、NFLXは0.78 $\mu\text{g/ml}$ にいずれもシャープな一峰性のピークを示し、これらの濃度で70~100%の株が阻止された (Fig. 3)。

E. coli 62株では、AT-2266は0.025~1.56 $\mu\text{g/ml}$ 、PPAは0.78~25 $\mu\text{g/ml}$ に、NFLXは0.025~0.78 $\mu\text{g/ml}$ の広範囲にMIC分布を示したが、それぞれのピーク値は0.19, 1.56および0.10 $\mu\text{g/ml}$ であり、AT-2266は0.39 $\mu\text{g/ml}$ で90%以上の株を阻止した (Fig. 4)。

K. pneumoniae 63株に対してAT-2266およびNFLXは0.19 $\mu\text{g/ml}$ に、PPAは1.56 $\mu\text{g/ml}$ にいずれ以上のも一峰性のピークを示し、AT-2266はこの濃度で80%株を阻止した (Fig. 5)。

E. cloacae 22株および*E. aerogenes* 21株の場合、AT-2266のピーク値は0.39 $\mu\text{g/ml}$ に見られ、この濃度で両菌種の80~90%を阻止した (Fig. 6, 7)。

S. marcescens 65株の場合、AT-2266とNFLXは0.19と12.5 $\mu\text{g/ml}$ に、PPAは1.56と>100 $\mu\text{g/ml}$ に2峰性のピークを示し、広範囲なMIC分布を示した

(Fig. 8)。

P. mirabilis 29株とインドール陽性の*P. morganii* 28株および*P. vulgaris* 40株の各菌種に対してAT-2266は0.39 $\mu\text{g/ml}$ に一峰性のピークが見られ、この濃度で70~80%の株が阻止された (Fig. 9~11)。

P. rettgeri 17株の場合、AT-2266は0.19~6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、PPAは1.56~50 $\mu\text{g/ml}$ 、NFLXは0.05~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の広範囲にMIC分布を示していた (Fig. 12)。AT-2266のMIC値はいずれの*Proteus* spp. に対してもPPAに比べ明らかに低値であったが、NFLXよりはやや高かった。

H. influenzae 54株の場合、AT-2266は0.1 $\mu\text{g/ml}$ に高いピークと12.5 $\mu\text{g/ml}$ に低いピークを示したが0.19 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で約90%の株を阻止した (Fig. 13)。

P. aeruginosa 63株の場合、AT-2266は1.56 $\mu\text{g/ml}$ に、PPAは12.5 $\mu\text{g/ml}$ に、そしてNFLXは0.78 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示し、AT-2266はこの濃度で80%の株を阻止した (Fig. 14)。

Fig. 12 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Proteus rettgeri* 17 strains(10⁸ cells/ml)

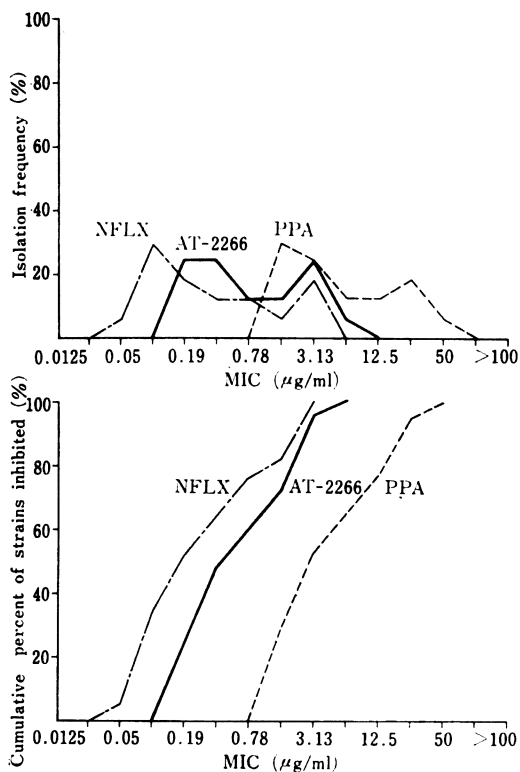


Fig. 13 Sensitivity distribution of clinical isolates : *Haemophilus influenzae* 54 strains(10⁸ cells/ml)

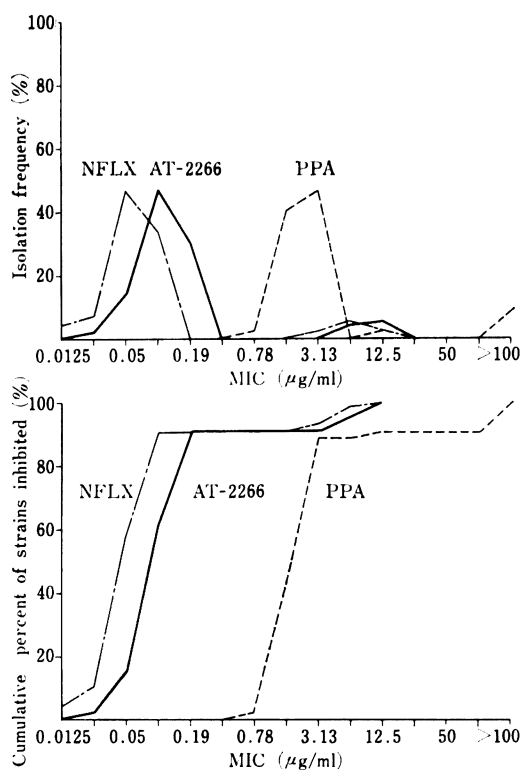


Table 7 Effect of medium pH on the antibacterial activity

Organism	Medium pH	MIC : μg/ml		
		AT-2266	PPA	NFLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	6.0	0.78	12.5	0.39
	7.0	0.39	12.5	0.19
	8.0	0.39	12.5	0.19
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.0	0.39	3.13	0.19
	7.0	0.19	1.56	0.10
	8.0	0.10	0.78	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	6.0	0.19	3.13	0.10
	7.0	0.10	1.56	0.05
	8.0	0.10	1.56	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	6.0	1.56	12.5	0.78
	7.0	0.78	12.5	0.39
	8.0	0.78	12.5	0.39

A. calcoaceticus 45 株の場合, AT-2266 は 0.39~6.25 $\mu\text{g/ml}$, PPA は 6.25~>100 $\mu\text{g/ml}$, NFLX は 0.39~12.5 $\mu\text{g/ml}$ に MIC 分布を示し, そのピークは AT-2266 で 1.56 $\mu\text{g/ml}$, PPA で 25 $\mu\text{g/ml}$, そして NFLX では 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり, AT-2266 はこの濃度で約70%の株を阻止した (Fig. 15)。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

S. aureus 209-P JC, *E. coli* NIH JC-2, *K. pneumoniae* KC-1 および *P. aeruginosa* E-2 を試験菌として抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加および接種菌量の影響について検討した結果を Table 7~9 に示した。

培地 pH を 6.0, 7.0 および 8.0 に調整した時の抗菌力

Table 8 Effect of horse serum on the antibacterial activity

Organism	Horse serum (%)	MIC : $\mu\text{g/ml}$		
		AT-2266	PPA	NFLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0	0.39	12.5	0.19
	10	0.39	12.5	0.39
	50	0.78	12.5	0.39
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	0	0.19	1.56	0.10
	10	0.19	1.56	0.10
	50	0.19	1.56	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	0	0.10	1.56	0.05
	10	0.10	3.13	0.05
	50	0.19	3.13	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	0	0.78	12.5	0.39
	10	0.78	12.5	0.39
	50	0.78	12.5	0.39

Table 9 Effect of inoculum size on the antibacterial activity

Organism	Inoculum size (cells/ml)	MIC : $\mu\text{g/ml}$		
		AT-2266	PPA	NFLX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	5.3×10^8	0.78	25	0.39
	5.3×10^7	0.78	12.5	0.39
	5.3×10^6	0.39	12.5	0.19
	5.3×10^5	0.19	6.25	0.19
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	4.4×10^8	0.19	1.56	0.10
	4.4×10^7	0.19	1.56	0.10
	4.4×10^6	0.19	1.56	0.10
	4.4×10^5	0.10	1.56	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	3.1×10^8	0.19	1.56	0.10
	3.1×10^7	0.19	1.56	0.10
	3.1×10^6	0.10	1.56	0.05
	3.1×10^5	0.10	1.56	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	2.5×10^8	1.56	25	0.78
	2.5×10^7	0.78	12.5	0.39
	2.5×10^6	0.78	12.5	0.39
	2.5×10^5	0.39	6.25	0.39

Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Pseudomonas aeruginosa*
63 strains (10^6 cells/ml)

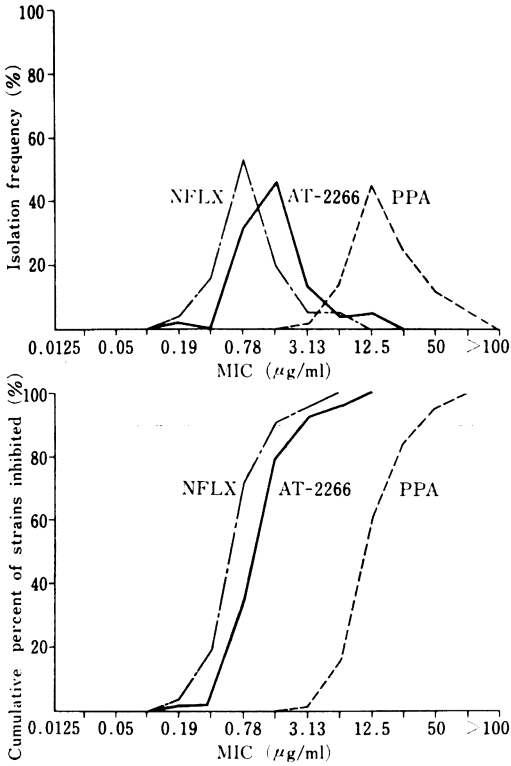


Fig. 15 Sensitivity distribution of clinical isolates: *Acinetobacter calcoaceticus*
45 strains (10^6 cells/ml)

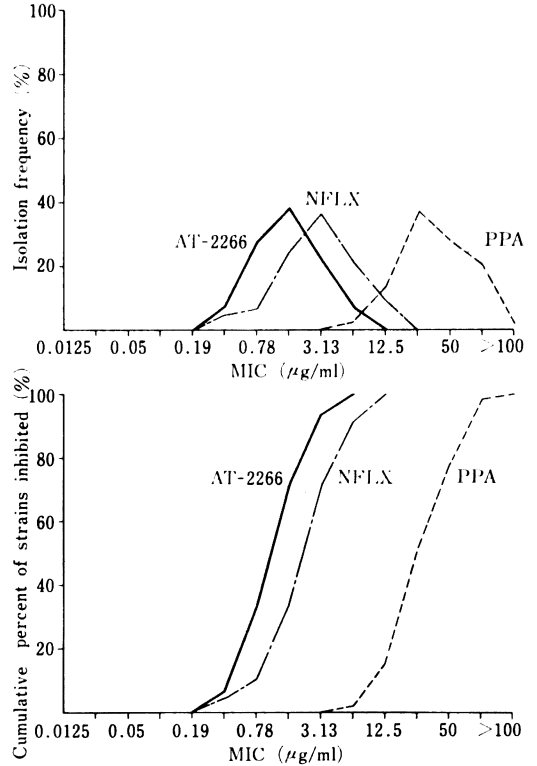


Fig. 16 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX on viability of *Staphylococcus aureus* Smith

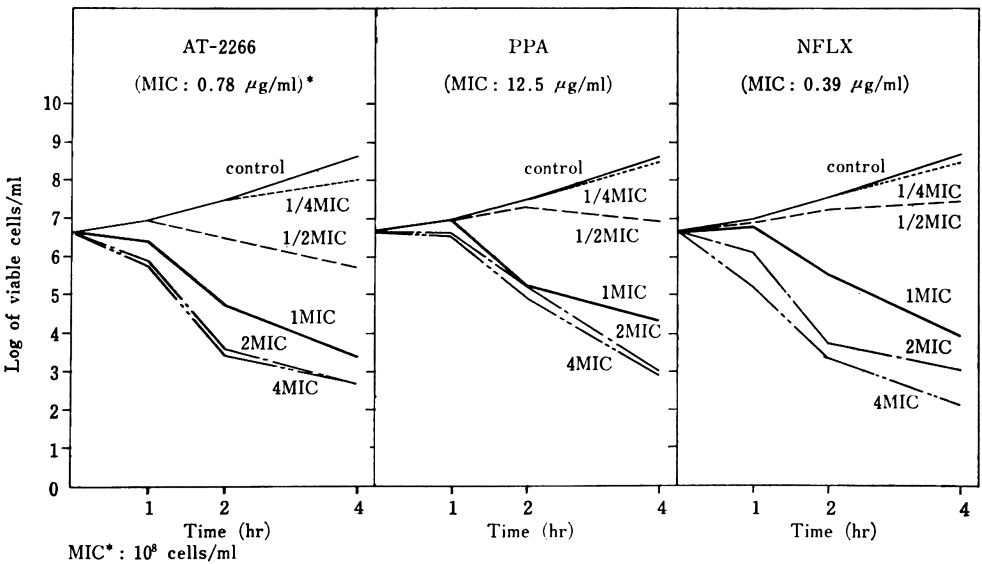
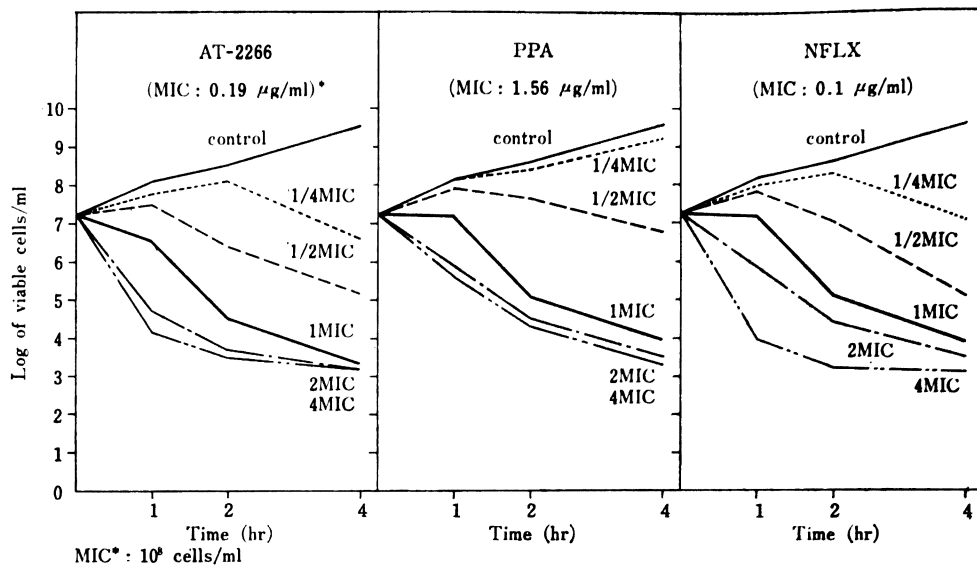
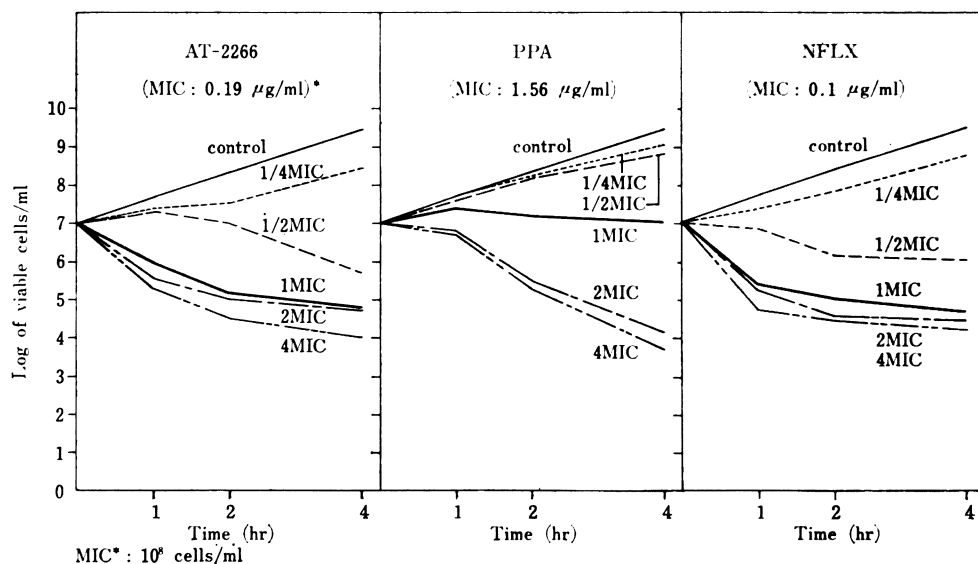


Fig. 17 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX on viability of *Escherichia coli* KC-14Fig. 18 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX on viability of *Klebsiella pneumoniae* KC-1

を測定した結果、AT-2266は比較薬であるPPAおよびNFLXと同様にアルカリ側で抗菌力がわずかに良好となった (Table 7)。また、馬血清を10および50%添加して抗菌力を測定したが、MIC値の変動はほとんどみられなかった (Table 8)。抗菌力に及ぼす接種菌量の影響は $10^5 \sim 10^9$ cells/mlを1白耳接種した時の条件下で検討したが、接種菌量の減少に応じて抗菌力も僅かに良

好となった (Table 9)。

4. 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus Smith, *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1, *S. marcescens* T-55, *P. aeruginosa* E-2および*A. calcoaceticus* Ac-54を試験菌としてAT-2266の増殖曲線に及ぼす影響を検討し、その結果をFig. 16~21に示した。

Fig. 19 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX on viability of *Serratia marcescens* T-55

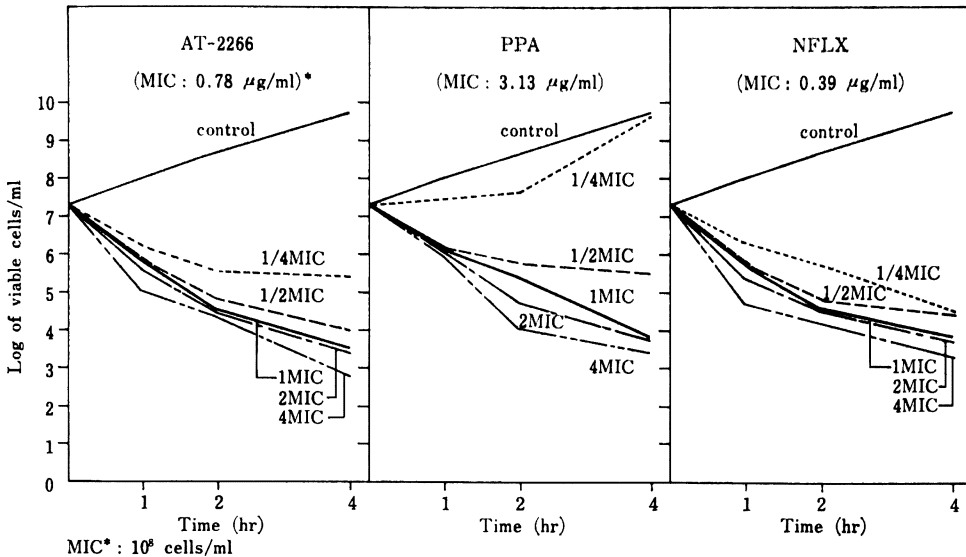
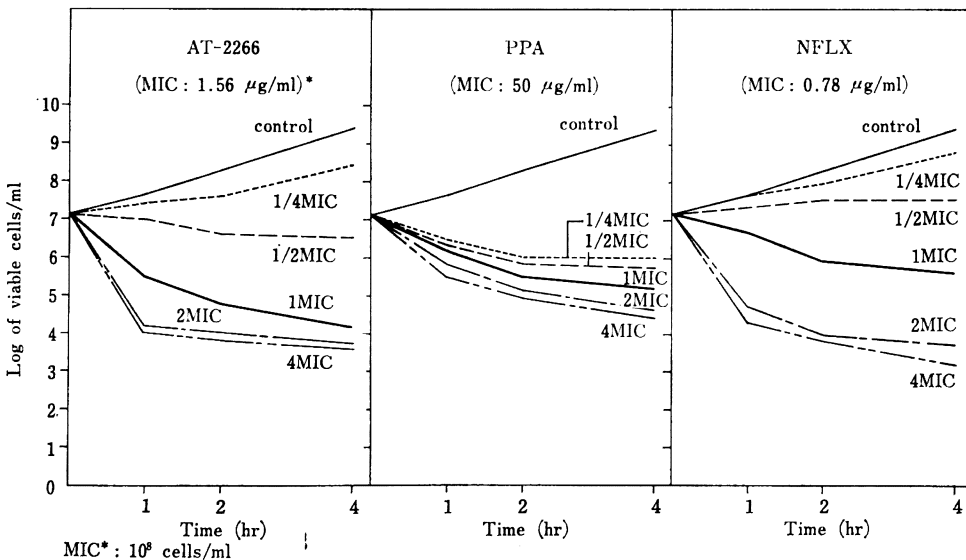


Fig. 20 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX on viability of *Pseudomonas aeruginosa* E-2



S. aureus Smith に AT-2266 を作用させたところ、AT-2266 は殺菌的作用を示し、1 MIC 以上の濃度の添加で生菌数は減少し、4 時間後には 3×10^3 cells/ml 以下となった。また、1/2MIC では静菌的であった (Fig. 16)。

E. coli KC-14 の場合、AT-2266 は 1 MIC 以上の濃度の添加では速やかに殺菌作用を示し、4 時間後には約 3×10^3 cells/ml に減少した。また、MIC 以下の濃度

(1/2 および 1/4 MIC) の添加では 1 ~ 2 時間後より生菌数の減少が認められた (Fig. 17)。

K. pneumoniae KC-1 の場合、AT-2266 は 1 MIC で速やかに殺菌的に作用し、1/2 MIC では静菌的な傾向を示した (Fig. 18)。

S. marcescens T-55 の場合、AT-2266 は 1/2 MIC 濃度から殺菌的に作用し、1/4 MIC でも生菌数の減少を

示した (Fig. 19)。

P. aeruginosa E-2 の場合, AT-2266 は 1 MIC 濃度から殺菌的に作用し, 1/2 MIC では静菌的であった (Fig. 20)。

A. calcoaceticus Ac-54 の場合, AT-2266 は 1/2 MIC 濃度から殺菌的に作用し, 1/4 MIC では静菌的であった (Fig. 21)。

5. 形態変化

対数増殖期の菌に AT-2266 を作用させ位相差顕微鏡による形態観察を行い, その観察像を Plate 1 ~ 4 に示した。

S. aureus 209-P JC の場合, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ の作用濃度において菌の分裂は抑制され 2 時間後より膨化した菌体像が見られ, 3 時間後には一部に溶菌が観察された。また, 0.78 $\mu\text{g/ml}$ では 2 ~ 3 時間後に菌体の膨化像が観察されたが, 0.19 $\mu\text{g/ml}$ の作用濃度ではほとんど正常と思われる形態で増殖した (Plate 1)。

E. coli K-12 の場合, いずれの使用濃度においても作用後 1 時間まで分裂する菌が観察されたが, その後, 分裂が抑制され伸長化が認められた。その伸長化は濃度の低いほど著明に観察されたが, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の 3 時間後では伸長化している菌の一部に分裂像が観察された (Plate 2)。

P. aeruginosa E-2 に AT-2266 を 6.25 および 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 作用させると菌体は伸長化し, 1 時間以後に菌体内容物が脱出したために生じた vacuole 像が観察され

た。しかし, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ ではほぼ正常な分裂増殖像が観察された (Plate 3)。

A. calcoaceticus Ac-54 の場合, 25 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用では分裂が抑制され, 1 時間後より菌体内がゴースト化し, 密度の高い顆粒が細胞内に見られた。また, 伸長化は濃度の低いほど著明に見られ, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ では膨化を伴った伸長化像が観察された (Plate 4)。

6. マウス実験的全身感染症に対する治療効果

1) 1 回投与における治療効果

グラム陽性菌 1 株とグラム陰性菌 8 株を用いたマウス実験的全身感染症に対する治療効果の結果を Table 10 に示した。

S. aureus Smith に対する AT-2266 の ED_{50} 値は 0.19 mg/mouse であり PPA の約 13 倍, NFLX の約 2 倍強い治療効果を示した。

グラム陰性菌 8 菌株に対する AT-2266 の ED_{50} 値は 0.038 ~ 0.76 mg/mouse であり, PPA および NFLX よりも優れていた。用いた感染菌の MIC は NFLX の方が AT-2266 より 2 倍程度優れていたにもかかわらず, 治療効果は AT-2266 の方がいずれの感染菌に対しても勝っていた。特に, *P. aeruginosa* 15426 および *A. calcoaceticus* Ac-54 感染系では 5 ~ 13 倍良好であった。また, PPA と比較すると AT-2266 はすべての感染系に対して 6 ~ 27 倍以上良好な ED_{50} 値を示した。

2) 投与回数と感染菌量による治療効果の変動

AT-2266 は各種の実験的全身感染症に対して 1 回投

Fig. 21 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX on viability of *Acinetobacter calcoaceticus* Ac-54

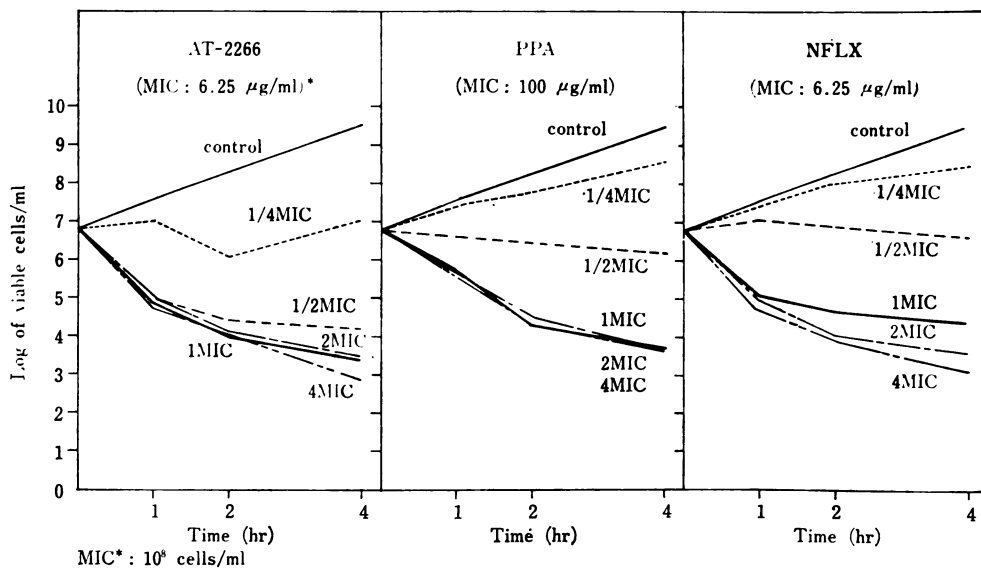
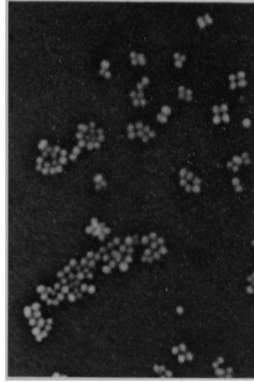


Plate 1 Phase-contrast micrographs of *Staphylococcus aureus* 209-P JC exposed to AT-2266

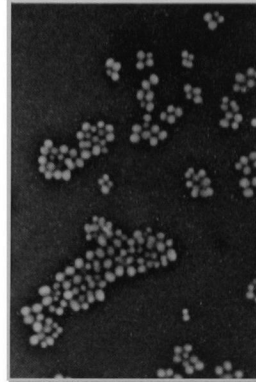
3.13 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)



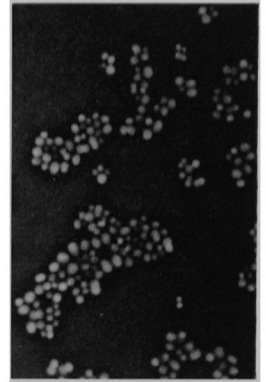
0 hr



1 hr



2 hr

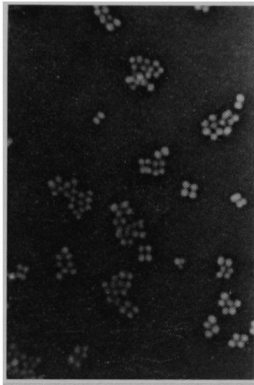


3 hr

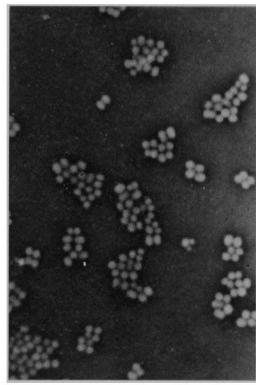
0.78 $\mu\text{g/ml}$ (1MIC)



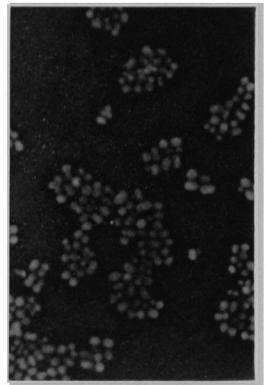
0 hr



1 hr

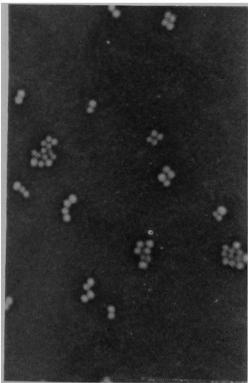


2 hr

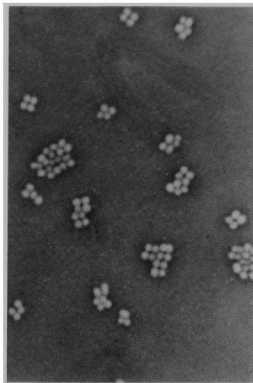


3 hr

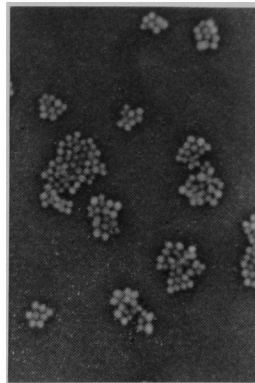
0.19 $\mu\text{g/ml}$ (1/4MIC)



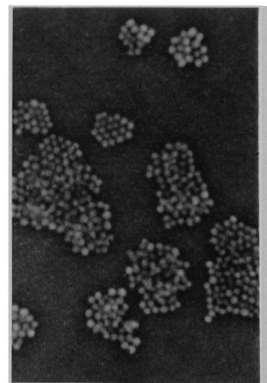
0 hr



1 hr



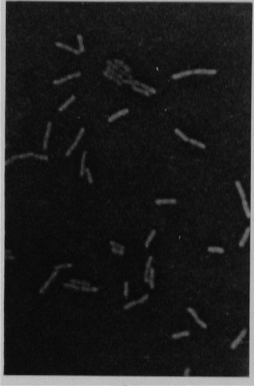
2 hr



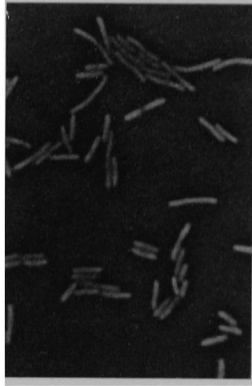
3 hr

Plate 2 Phase contrast micrographs of *Escherichia coli* K 12 exposed to AT 2266

0.78 μ g/ml (4MIC)



0 hr



1 hr

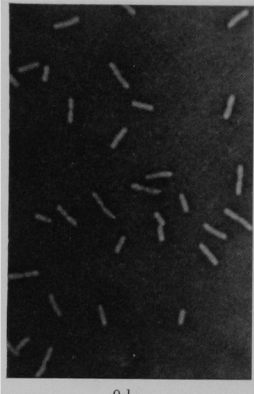


2 hr

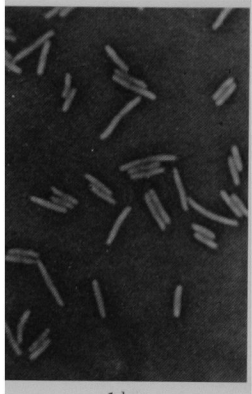


3 hr

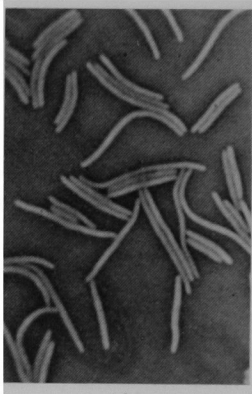
0.19 μ g/ml (1MIC)



0 hr



1 hr

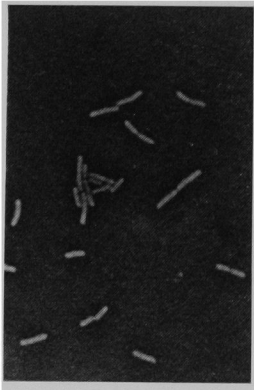


2 hr

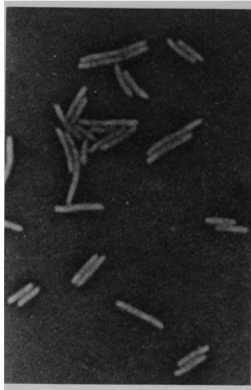


3 hr

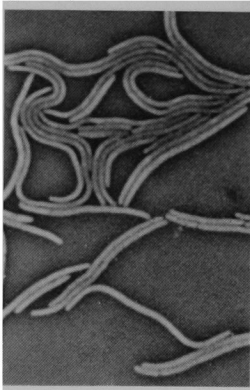
0.05 μ g/ml (1/4MIC)



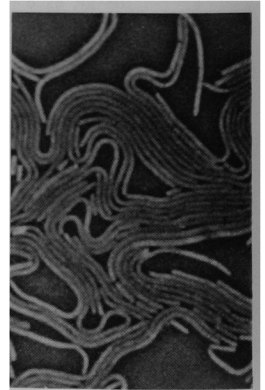
0 hr



1 hr



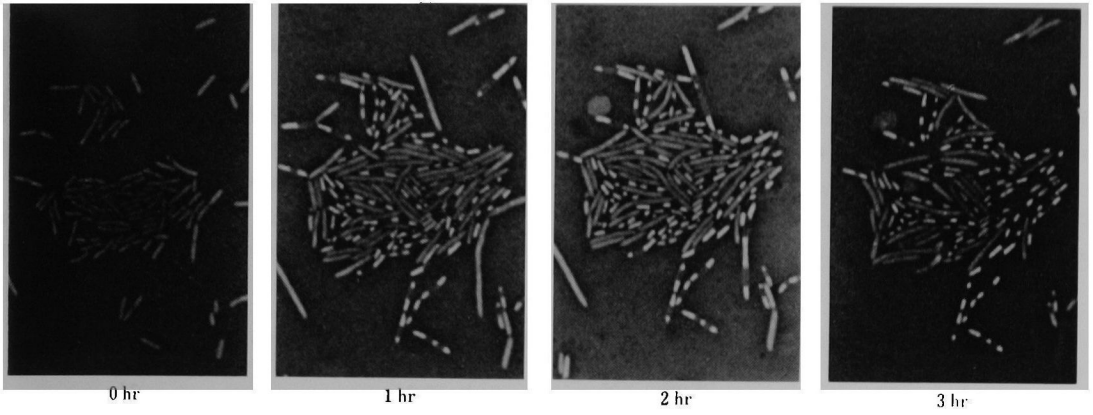
2 hr



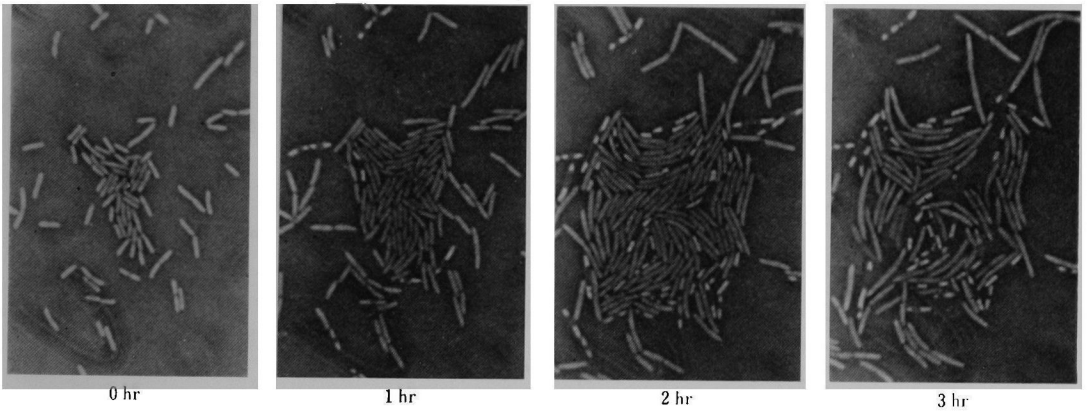
3 hr

Plate 3 Phase-contrast micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* E 2 exposed to AT 2266

6.25 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)



1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1MIC)



0.39 $\mu\text{g/ml}$ (1/4MIC)

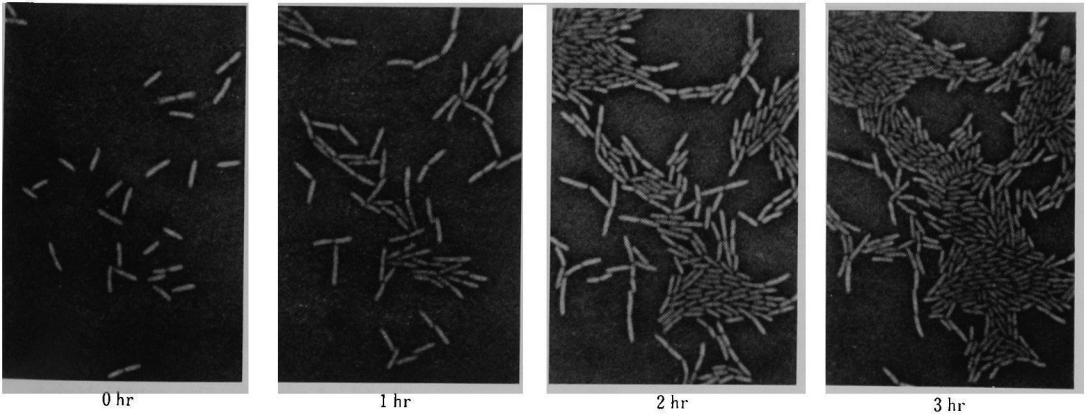
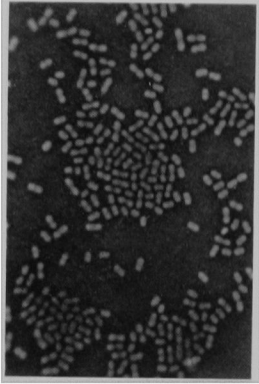
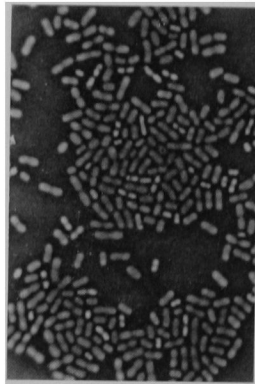


Plate 4 Phase-contrast micrographs of *Acinetobacter calcoaceticus* Ac-54 exposed to AT-226625 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)

0 hr



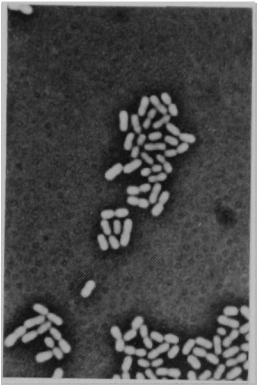
1 hr



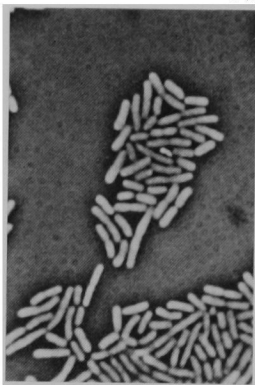
2 hr



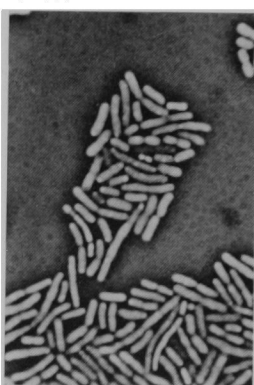
3 hr

6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1MIC)

0 hr



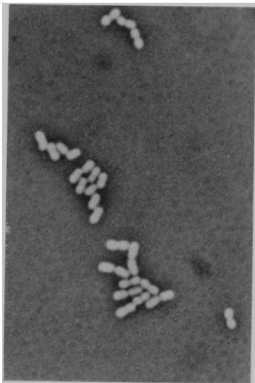
1 hr



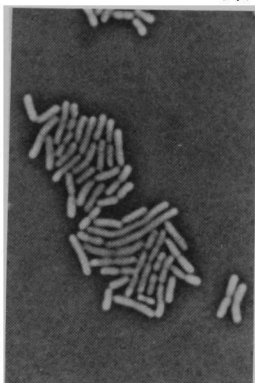
2 hr



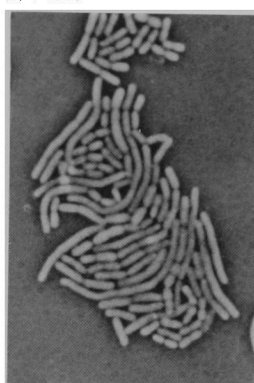
3 hr

1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/4MIC)

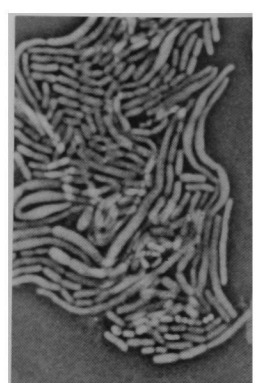
0 hr



1 hr



2 hr



3 hr

与において優れた治療効果を示したが、投与回数と感染菌量の影響によって ED₅₀ 値がどのように変動するか *P. aeruginosa* 15846 と *S. marcescens* 15701 を用いて検討し、その結果を Table 11, 12 に示した。

AT-2266 は感染菌量の増加により ED₅₀ 値の高くなる傾向が見られたが、投与回数を増加させると ED₅₀ 値の低下が認められた。

Table 11 に示した *P. aeruginosa* 15846 感染系において、PPA および NFLX が治療効果を示さなかった 1843 LD₅₀ および 184 LD₅₀ の感染菌量においても AT-

2266 は治療効果を示した。

PPA および NFLX が治療効果を示した 18LD₅₀ 感染菌量の 2 回投与群で 3 剤を比較すると、AT-2266 は PPA の約 15 倍、NFLX の約 6 倍優れた治療効果を示した。

Table 12 には *S. marcescens* 15701 の感染症に対する結果を示した。AT-2266 は 1 回投与で 1.95 mg/mouse, 3 回投与で 0.84 mg/mouse の ED₅₀ 値を示したが、NFLX は 1 回投与では > 4 mg/mouse, 3 回投与で 2.83 mg/mouse の ED₅₀ 値を示した。なお、AT-2266 の 1

Table 10 Protecting effect of AT-2266, PPA, and NFLX against experimental infections in mice

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	MIC (μg/ml)		Drug	ED ₅₀ (mg/mouse/dose)
		10 ⁸	10 ⁶		
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	5.3 × 10 ⁴ [130LD ₅₀]	0.78	0.39	AT-2266	0.19 (0.16-0.22)*
		12.5	6.25	PPA	2.4 (2.08-2.77)
		0.39	0.19	NFLX	0.42 (0.36-0.49)
<i>Escherichia coli</i> KC-14	4.0 × 10 ⁴ [889LD ₅₀]	0.19	0.19	AT-2266	0.038 (0.030-0.048)
		1.56	1.56	PPA	0.30 (0.25-0.35)
		0.10	0.10	NFLX	0.063 (0.052-0.077)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	4.5 × 10 ³ [1875LD ₅₀]	0.19	0.10	AT-2266	0.054 (0.045-0.065)
		1.56	1.56	PPA	0.77 (0.68-0.88)
		0.10	0.05	NFLX	0.097 (0.084-0.113)
<i>Serratia marcescens</i> T-55	7.8 × 10 ⁵ [156LD ₅₀]	0.78	0.78	AT-2266	0.053 (0.041-0.069)
		3.13	3.13	PPA	0.30 (0.27-0.33)
		0.39	0.39	NFLX	0.076 (0.065-0.103)
<i>Proteus morgani</i> No. 101	5.0 × 10 ⁶ [200LD ₅₀]	0.19	0.10	AT-2266	0.061 (0.048-0.078)
		1.56	0.78	PPA	0.47 (0.39-0.57)
		0.10	0.05	NFLX	0.087 (0.067-0.113)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	1.6 × 10 ⁴ [172LD ₅₀]	1.56	0.78	AT-2266	0.32 (0.29-0.36)
		50	12.5	PPA	3.5 (3.0-4.1)
		0.78	0.39	NFLX	0.76 (0.59-0.97)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15878	7.5 × 10 ⁵ [32LD ₅₀]	6.25	3.13	AT-2266	0.22 (0.14-0.35)
		200	100	PPA	2.60 (1.83-3.68)
		3.13	1.56	NFLX	0.70 (0.53-0.91)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15426	8.5 × 10 ³ [32LD ₅₀]	6.25	3.13	AT-2266	0.76 (0.47-1.24)
		50	50	PPA	5.7 (3.4-9.6)
		3.13	3.13	NFLX	>4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Ac-54	2.1 × 10 ⁵ [16LD ₅₀]	6.25	1.56	AT-2266	0.37 (0.30-0.45)
		100	50	PPA	>10
		6.25	3.13	NFLX	4.7 (3.8-5.9)

* : 95% confidence limits

Table 11 Protecting effect of AT-2266, PPA, and NFLX against experimental *Pseudomonas aeruginosa* 15846 infection in mice

Challenge dose (cells/mouse)	Medication (h)	ED ₅₀ (95% confidence limit)*		
		AT-2266	PPA	NFLX
6 × 10 ⁸ [1843LD ₅₀]	2	2.60 (1.83-3.68)	>8	>4
	2, 8	1.38 (0.78-2.43)	>8	>4
	2, 8, 14	1.30 (0.916-1.84)	>8	>4
6 × 10 ⁴ [184LD ₅₀]	2	2.77 (2.21-3.48)	>8	>4
	2, 8	1.17 (0.69-1.97)	>8	>4
	2, 8, 14	0.71 (0.47-1.08)	>8	>4
6 × 10 ⁸ [18LD ₅₀]	2	1.00 (0.58-1.71)	>8	>4
	2, 8	0.49 (0.32-0.75)	7.22 (4.77-10.9)	2.83 (1.86-4.30)
	2, 8, 14	0.39 (0.27-0.55)	6.68 (4.52-9.85)	1.54 (1.09-2.18)
MIC (μg/ml)	10 ⁸ cells/ml	6.25	100	6.25
	10 ⁸ cells/ml	6.25	50	6.25

* : mg/mouse/dose

Table 12 Protecting effect of AT-2266, PPA, and NFLX against experimental *Serratia marcescens* 15701 infection in mice

Challenge dose (cells/mouse)	Medication (h)	ED ₅₀ (95% confidence limit)*		
		AT-2266	PPA	NFLX
1.2 × 10 ⁶ [526LD ₅₀]	2	1.95 (1.27-3.01)	>8	>4
	2, 8, 14	0.84 (0.57-1.23)	>8	2.83 (1.86-4.30)
MIC (μg/ml)	10 ⁸ cells/ml	50	400	50
	10 ⁶ cells/ml	6.25	100	6.25

* : mg/mouse/dose

回投与時の治療効果はNFLXの3回投与時の治療効果より優れていた。また、PPAではいずれの投与回数でも治療効果が認められなかった。

7. 実験的尿路感染症に対する治療効果

E. coli KC-14を用いたマウス実験的尿路感染症に対するAT-2266の治療効果を腎内生菌数を測定することにより検討し、その結果をFig. 22に示した。

AT-2266の投与群ではdose responseのある結果が得られ、4 mg/mouse投与群では 3.5×10^2 cellsの腎内生菌数を示した。また、0.04 mg/mouse (4.6×10^5 cells/kidney)においても非投与群 (2.6×10^7 cells/kidney)に比べ明らかに菌数減少を認めた。また、比較薬のPPAおよびNFLXにおいてもdose responseのある結果を得たが、菌数減少はAT-2266の方が勝っていた。

Table 13 Protecting effect of AT-2266, PPA, and NFLX against experimental urinary-tract infection with *Escherichia coli* KC-14 in mice

Drug	MIC (μg/ml)		ED ₅₀ (95% confidence limit) (mg/mouse/dose)
	10 ⁸	10 ⁶	
AT-2266	0.19	0.19	0.47 (0.121-1.83)
PPA	1.56	1.56	6.39 (3.72-12.9)
NFLX	0.10	0.10	1.30 (0.92-1.83)

腎内生菌数が 1×10^4 cells/kidney以下のマウスを有効として求めたED₅₀値はTable 13に示したごとく、AT-2266は0.47 mg/mouseで、PPAは6.39 mg/mo-

use, NFLX は 1.30 mg/mouse であり, AT-2266 が最も低い ED₅₀ 値を示し, PPA の14倍, NFLX の3倍程度勝っていた。

8. 実験的肺感染症に対する治療効果

K. pneumoniae DT-S を肺に感染させたマウスに対する AT-2266 の治療効果と肺内生菌数の消長を検討した結果を Table 14 および Fig. 23 に示した。感染マウスの非投与群は 48~72 時間で 100% の死亡率を示したが, 薬物を投与することにより延命的な効果を示した。すなわち, AT-2266 は Table 14 に示したごとく, 5 日および 7 日後の ED₅₀ 値はそれぞれ 0.2 および 0.76 mg/mouse であり, NFLX の 2 倍程度良好な値であった。

Fig. 23 には AT-2266 投与後の肺内生菌数を 48 時間まで測定した結果を示した。AT-2266 の各投与群は投与直後より速やかに肺内生菌数の減少を示し, その減少率は PPA および NFLX に比べ速やかであった。すなわち, AT-2266 の 4 mg/mouse 投与群では投与後 4 時間で生菌数は 3.1×10^5 から 3.5×10^2 cells/lung に減少し, その後も生菌数の減少が認められた。1 mg/mouse 投与群においても 4 時間までに生菌数は 4.7×10^4 から 3.6×10^2 cells/lung に減少し, その後 48 時間まで NFLX の 4 mg/mouse 投与群と同等の減少を示した。また, 0.25

Table 14 Protecting effect of AT-2266, PPA, and NFLX against experimental pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice

Drug	MIC (μ g/ml)		ED ₅₀ (mg/mouse/dose)	
	10 ⁶	10 ⁸	Day 5	Day 7
AT-2266	0.19	0.10	0.20	0.76
PPA	1.56	0.78	1.83	>4.00
NFLX	0.10	0.05	0.48	1.57

mg/mouse 投与群においても 4 時間までに生菌数は 3.1×10^5 cells/lung から 2.5×10^8 cells/lung に減少し, その後再増殖を認めたが, その程度は PPA の 4 mg/mouse 投与群とはほぼ同様であった。

9. 実験的肺感染マウスにおける血漿中および肺内薬物濃度

K. pneumoniae DT-S 感染マウスに各薬物 2 mg/mouse を 1 回投与し, 8 時間までの血漿中および肺内濃度を測定した結果を Fig. 24 に示した。AT-2266 の血漿中濃度は投与後 15 分に 4.84 μ g/ml のピーク値を示し, 30

Fig. 22 Viable cells in kidney of mice bearing *Escherichia coli* KC-14 induced urinary-tract infection and treated with AT-2266, PPA, and NFLX

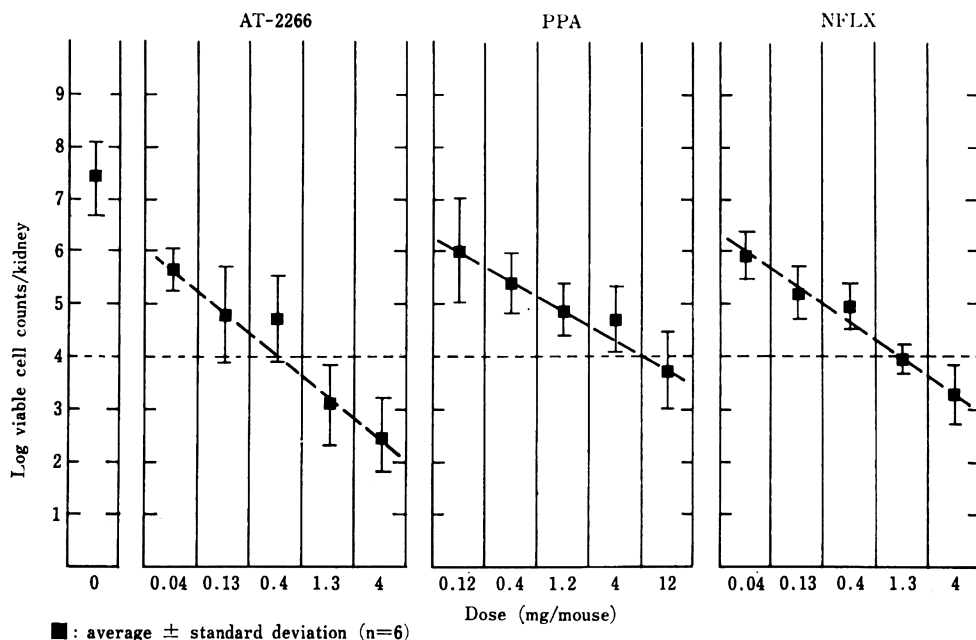
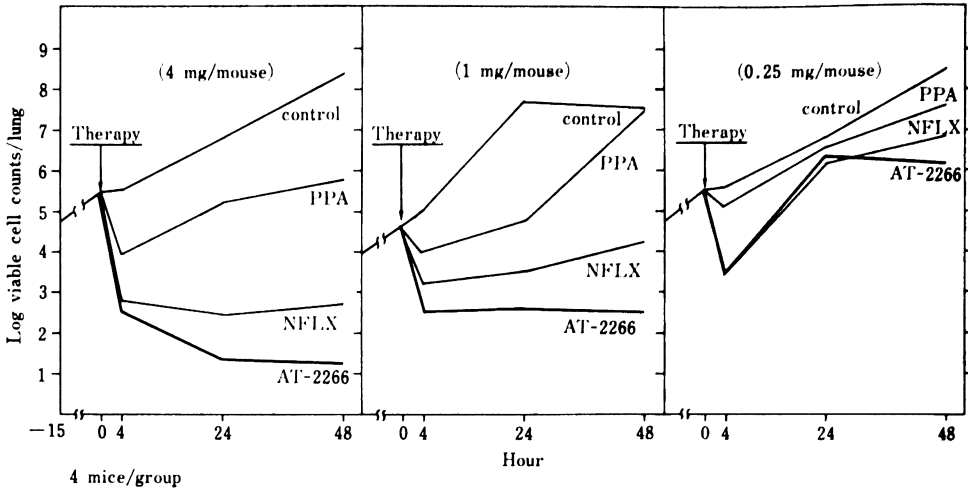


Fig. 23 Effect of AT-2266, PPA, and NFLX administration on number of bacteria in the lung of mice infected with *Klebsiella pneumoniae* DT-S by the aerosol method

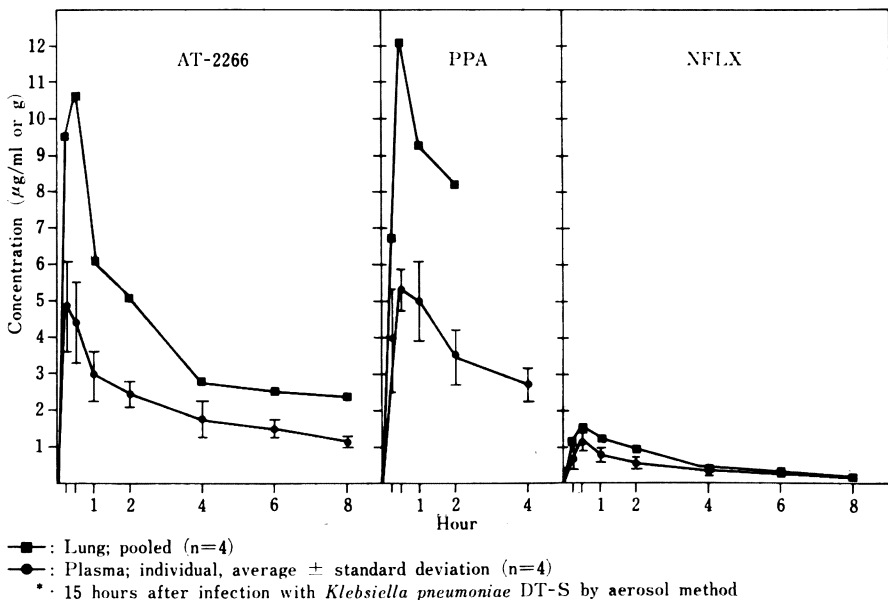


分で 4.39 $\mu\text{g/ml}$, 1 時間で 2.96 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間で 2.44 $\mu\text{g/ml}$, 4 時間で 1.76 $\mu\text{g/ml}$, 6 時間で 1.50 $\mu\text{g/ml}$ と緩やかに低下し, 8 時間後には 1.13 $\mu\text{g/ml}$ となった。

一方, 肺内濃度は 30 分に 10.5 $\mu\text{g/g}$ のピーク値を示し, 8 時間後まで常に血漿中よりも 2 倍程度高い値を示した。比較薬の PPA も血漿中濃度 (ピークは 30 分後で, 5.27 $\mu\text{g/ml}$) に比べ, 肺内濃度の方が常に高く約 2 倍の

高値を示した。NFLX の血漿中濃度は 30 分後にピークが見られ, その濃度は 1.18 $\mu\text{g/ml}$ で, 8 時間後には 0.19 $\mu\text{g/ml}$ となり AT-2266 および PPA に比べ低値を示した。また, 肺内濃度も血漿中濃度よりやや高い程度であり, ピークで 1.57 $\mu\text{g/g}$ であった。8 時間までの AT-2266 と NFLX の血漿中および肺内濃度下面積 (AUC) を比較すると, AT-2266 の血漿中濃度の AUC (16.4

Fig. 24 Plasma and lung levels of AT-2266, PPA, and NFLX in mice* receiving a single oral dose of 2 mg/mouse



■: Lung; pooled (n=4)
 ●: Plasma; individual, average \pm standard deviation (n=4)
 * 15 hours after infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S by aerosol method

h- μ g/ml)はNFLX(3.5 h- μ g/ml)の約5倍、肺内濃度のAUC(31.4 h- μ g/g)はNFLX(5.1 h- μ g/g)の約6倍であった。

III. 総括および考察

大日本製薬総合研究所において合成開発された新しい合成抗菌剤AT-2266に関する細菌学的評価を構造類似化合物であるPPAおよびNFLXと比較検討した。

AT-2266は多くのグラム陽性菌、グラム陰性菌および一部の嫌気性菌に強い抗菌作用を示し、NFLXと同様の広い抗菌スペクトラムと強い抗菌作用を示した。また、臨床分離の*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, インドール陽性の *Proteus* spp., *H. influenzae*, *P. aeruginosa* および *A. calcoaceticus* のMIC分布を調べたところ、AT-2266のMIC値ピークは0.1~1.56 μ g/mlの範囲内にあり、NFLXと比べると*S. aureus*, *K. pneumoniae* および *S. marcescens* では同等であり、*S. pyogenes* およびその他のグラム陰性菌では2~4倍高く、*A. calcoaceticus* では2倍程度低かった。また、PPAと比較するとAT-2266のMIC値は4~64倍低かった。この結果は、AT-2266が既存のピリドンカルボン酸系抗菌剤の中では抗菌力の最も強いNFLXとほぼ同程度の抗菌作用を持っていることを示していると思われる。AT-2266の抗菌作用は殺菌的で、MICの1/2の濃度で生菌数の減少が認められた。

AT-2266の作用下で菌がどのような形態変化を示すか位相差顕微鏡レベルで調べたところ、*S. aureus* では菌の膨化が、*E. coli* では菌の伸長化が見られ、また、*P. aeruginosa* では菌の伸長化と空胞化が見られ、スフェロプラスト様構造物の形成も認められた。AT-2266の抗菌作用機序として*E. coli*のDNA合成阻害作用ならびにDNA gyrase阻害作用が報告されている¹¹⁾。しかしながら、*S. aureus*や*P. aeruginosa*においても同様の阻害作用が認められるかどうかは明らかではなく、菌の形態変化と薬物の作用機序がどのように関連しているかは電子顕微鏡学的微細構造の検討も加えて、今後検討しなければならない点であると考えられる。

マウス実験の全身感染症では、AT-2266はPPAより6~27倍以上良好な治療効果を示し、NFLXより1.4~13倍優れた治療効果を示した。感染菌に対するNFLXのMIC値はAT-2266と同等もしくは2倍程度低いので、この結果は両薬物の*in vivo*効果が*in vitro*抗菌作用と並行しないことを示している。またAT-2266、PPAおよびNFLXに比較的高いMIC値を示す*P. aeruginosa* 15846ならびに*S. marcescens* 15701を用い、し

かも菌量を増加した感染実験においては、PPAおよびNFLXが3回投与でも無効であるのに対し、AT-2266では1回投与でも治療効果を示し、投与回数増加によりED₅₀値はさらに低下する傾向が認められた。このことは比較的MIC値の高い菌株の感染症に対してもAT-2266は治療効果を示すものと思われる。実験的尿路感染症および肺感染症においてもAT-2266はPPAおよびNFLXより良好な治療効果を示した。これらのピリドンカルボン酸系化合物の体内移行を検討するために*K. pneumoniae* DT-Sを噴霧感染したマウスを用い、血中および肺内濃度を測定したところ、AT-2266とPPAの血漿中および肺内濃度はほぼ同レベルであったが、NFLXの血漿中および肺内濃度はAT-2266の1/4~1/7程度であった。AT-2266の組織中濃度は血漿中濃度より高くなることが報告されている¹²⁾、われわれの結果からも、AT-2266の組織への移行性が良好なことが確認できた。したがって、AT-2266の*in vivo*効果がNFLXより優れているのは前者の吸収性ならびに組織移行性のよいことが大きなファクターであろうと考えられる。

以上の実験結果から、AT-2266は*in vitro*ではNFLXと同様の広い抗菌スペクトラムと強い抗菌作用を示し、*in vivo*ではNFLXより良好な治療効果を示す抗菌剤であると考えられ、また、経口剤で*P. aeruginosa*を含むグラム陰性菌に*in vivo*で、良好な効果を示す化合物は少なく、臨床的にどの様な効果が得られるか期待される物質である。

(本研究は昭和57年1月から昭和57年10月にわたり実施したことを付記する。)

文 献

- 1) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, S. INOUE, A. MINAMI, K. NAKATA & Y. SAKAGUCHI: AT-2266, a new oral antipseudomonal agent. *Current chemotherapy and infectious disease*: 451~454, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980
- 2) SHIMIZU, M.; Y. TAKASE, S. NAKAMURA, H. KATAE, A. MINAMI, K. NAKATA & N. KUROBE: Pipemidic acid; Its activity against various experimental infections. *Antimicrob. Agents and Chemother.*: 569~574, 1976
- 3) 中澤昭三, 西野武志, 浜洲泰久, 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, 後藤直正, 石村富喜子, 永田昌宏, 松野和弘, 谷野輝雄: 新しい合成化学療法剤 AM-715に関する細菌学的評価。 *Chemotherapy* 29(S-4): 27~44, 1981
- 5) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29

- (1) : 76~79, 1981
- 6) 嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会 : 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 27 (3) : 559~560, 1979
- 7) LITCHFIELD, J.T & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96 : 99~113, 1949
- 8) 松浦真三, 三和秀明, 東山伊佐夫, 島岡 登 : Cefaclor の *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 27(S-7) : 98~103, 1979
- 9) 松本慶蔵, 守塚良夫, 永武 毅, 尖戸春美, 鈴木 寛, 野口行雄, 玉置公俊, 巖 土易, 井手政利 : 噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。日本胸部疾患学会 雑誌 16 : 581~587, 1978
- 10) 松本慶蔵, 宇手良夫, 永武 毅, 尖戸春美, 鈴木 寛, 野口行雄, 玉置公俊, 井手政利, 渡辺貴和雄 : 肺炎桿菌性マウス実験的肺炎を場とする Cefazolin による化学療法 の解析。Chemotherapy 27 : 109~115, 1979
- 11) INOUE, S. ; J. YAMAGISHI, S. NAKAMURA, Y. FURUTANI & M. SHIMIZU : Novel nalidixic acid-resistance mutations relating to DNA gyrase activity : In S. MITSUHASHI (ed.), Drug Resistance in Bacteria : Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology, Japan Scientific Societies Press, Tokyo. p.411~414, 1982
- 12) NAKAMURA, S. ; Y. TAKASE, N. KUROBE, S. KASHIMOTO & M. SHIMIZU : Pharmacological properties of AT-2266. Current chemotherapy and infectious disease : 456~458, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF AT-2266

TAKESHI NISHINO, SHIGEKI KASHIMOTO, TOSHIMI NAKAZAWA
and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Bacteriological evaluation of AT-2266, a new synthetic chemotherapeutic agent, was carried out compared with piperimic acid (PPA) and norfloxacin (NFLX), and the following results were obtained.

1. AT-2266 showed a broad antibacterial spectrum covering gram-positive, gram-negative and anaerobic bacteria, with antibacterial potencies similar to those of NFLX.

2. The MICs of AT-2266 for clinical isolates were lower than those of PPA for all tested bacteria, equal to those of NFLX for *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae*, about 2 times higher than those of NFLX for *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, indole-positive *Proteus* spp., *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa*, and about one half those of NFLX for *Acinetobacter calcoaceticus*.

3. The MIC values of AT-2266 were lowered in alkaline medium pH or with smaller inoculum sizes, but not affected by the addition of horse serum into medium.

4. The viable cells of *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. calcoaceticus* decreased during exposure to AT-2266 at 1 MIC.

5. Phase-contrast microscopy revealed that AT-2266 induced morphological changes of bacteria; swollen cells of *S. aureus* at 0.78 $\mu\text{g/ml}$, elongated cells of *E. coli* at 0.05 $\mu\text{g/ml}$, elongated cells having vacuoles of *P. aeruginosa* at 1.56 $\mu\text{g/ml}$, and elongated swollen cells of *A. calcoaceticus* at 1.56 $\mu\text{g/ml}$.

6. In the experimental systemic infections with one gram-positive and eight gram-negative bacteria in mice, AT-2266 showed excellent therapeutic activities superior to those of PPA and NFLX. The ED₅₀ values of AT-2266 were lowered by increasing medication times or decreasing challenge bacterial inocula, and they were always lower than those of PPA and NFLX.

7. In the experimental urinary-tract infections in mice, viable bacteria in kidney decreased by dosing AT-2266 at the doses smaller than those of PPA or NFLX.

8. In the experimental pulmonary infections in mice, AT-2266 made survival days of infected mice longer with the decrease of viable bacteria in lung. Such effects were superior to those of PPA and NFLX.

9. The lung levels of AT-2266 in mice with a pulmonary infection was about 2 times higher than the plasma levels, but not so the lung levels of NFLX. The plasma and lung levels of AT-2266 were about 4 and 7 times higher than those of NFLX, respectively.