

NY-198の細菌学的評価 —*in vitro* および *in vivo* 抗菌作用—

桶崎 英一・大道 光一・小池 祥二・高橋 慶衛・牧野 栄一

北陸製薬株式会社 中央研究所

新規ピリドンカルボン酸系抗菌剤 NY-198 ((±)-1-ethyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX) および pipemidic acid (PPA) と比較評価し、以下の成績を得た。

1. NY-198はグラム陽性、陰性菌群および嫌気性菌群に対し、幅広い抗菌スペクトラムを有し、NFLX および OFLX とほぼ同等の抗菌力を示した。
2. 臨床分離株に対する抗菌力では、NY-198は NFLX および OFLX とほぼ同程度の抗菌力を示し、PPA より優れていた。
3. NY-198の抗菌力は培地の種類、接種菌量および馬血清により影響をうけなかったが、培地 pH が酸性側で低下した。
4. NY-198の MBC は、MIC とほぼ同程度であった。
5. NY-198はマウス腹腔内感染モデルにおいて、経口投与で良好な防御効果を示し、その結果は NFLX, OFLX および PPA より優れていた。

また、マウス尿路感染モデルに対する治療効果においても、NY-198は用量依存的な腎内の生菌数減少を示し、NFLX, OFLX および PPA より優れた効果を示した。

以上の結果より NY-198は *in vitro* では PPA より非常に優れた抗菌力を示し、NFLX および OFLX と同等であったが、*in vivo* では経口投与で NFLX および OFLX より優れた効果を示し、経口剤としてより優れた効果が期待される。

1962年に合成抗菌剤ナリジク酸¹⁾が開発されて以来、化学療法剤の発展はめざましく、後に pipemidic acid (PPA)^{2,3)}が開発され、近年に至り、norfloxacin (NFLX) 等の開発により、さらに広範囲なスペクトルと強い *in vitro* 抗菌力を示すものが見出されてきた⁴⁻⁹⁾。我々は、強い *in vitro* 抗菌力を持ち、更に経口吸収および尿中排泄に優れ、代謝的に安定でかつ安全性の高い合成抗菌剤を目指し、フッ素置換キノロンカルボン酸骨格を有する化合物を種々検討した結果、Fig. 1 に示す化学構造を有する NY-198を見出した¹⁰⁾。

今回は NY-198の細菌学的評価を NFLX, ofloxacin (OFLX) 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。

I 試験材料および方法

1. 使用薬剤

NY-198(906 μ g 力価/mg), NFLX, OFLX は北陸製

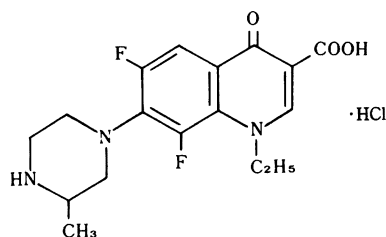


Fig. 1. Chemical structure of NY-198, [(±)-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride.

薬中央研究所で合成したものを使用した。PPA は大日本製薬㈱の市販品から抽出したものを使用した。

2. 使用菌株

日本化学療法学会設定の標準菌株¹¹⁾および各種臨床分

離株を用いた。今回使用した菌株のうち標準菌株は群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設, *Escherichia coli* KC-14は京都薬科大学微生物学教室, *Bacteroides fragilis* 1010および *Clostridium perfringens* PB6Kは金沢大学医学部口腔外科学講座, それ以外の嫌気性菌は岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設から分与されたものを用い, 臨床分離株は最近の臨床材料から分離されたものを同定して使用した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

特に記載しないかぎり日本化学療法学会感受性測定法¹¹⁾および日本化学療法学会嫌気性菌感受性測定法¹²⁾に従って行なった。使用培地は Table 1 に示した。

4. 諸因子の影響

下記の6菌株を用いて検討を行った。

Staphylococcus aureus FDA 209P JC-1

E. coli NIHJ JC-2

E. coli K-12 C600

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Morganella morganii IFO 3848

Enterobacter aerogenes ATCC 13048

1) 培地の種類

Mueller-Hinton agar (MHA : Difco), heart infusion agar (HIA : 日水), 普通寒天培地 (NA : Difco), および trypticase soy agar (TSA : BBL) を用いて, 各種培地における MIC 値を 10^6 CFU/mlの接種菌量で日本化学療法学会標準法¹¹⁾に従い測定した。

2) 培地の pH

培地の pH を 5~9 まで 5 段階変え, 各 pH における MIC 値を MHA 培地を用い, 接種菌量 10^6 CFU/mlで寒天平板希釈法¹¹⁾によって測定した。

3) 接種菌量

接種菌量の濃度を 10^5 ~ 10^9 CFU/mlまで 5 段階変えて, それぞれの接種菌量に対する MIC 値を MHA 培地を用いて, 日本化学療法学会標準法に従い測定した。

4) 血清

MHA 培地に馬血清 (M. A. Bioproducts 製) を無添加, 10%, 20%又は, 50%添加した場合の MIC 値を接種菌量 10^6 CFU/mlで寒天平板希釈法によって測定した。

5. 最小殺菌濃度 (MBC) 測定

試験菌は標準菌株を用い, MIC 測定には液体培地希釈法¹³⁾を用いた。即ち, 増菌培地で 37°C , 18時間培養した菌液を buffered saline with gelatin を用いて希釈し, 2 倍希釈系列の薬剤を含む Muller-Hinton broth (MHB : Difco) 又は brain heart infusion broth (BHIB : 日水) 中に, 接種菌量が約 10^5 CFU/mlとなるように接種した。 37°C , 18時間培養後, 肉眼で濁度を観察し, 濁度が全く認められないところをもって MIC と

した。MBC の測定は, MIC 以上の試験管から薬剤を含まない MHA 又は brain heart infusion agar (BHIA : 日水) 平板に 1 白金耳 (約 $2 \mu\text{l}$) ずつ接種し, 37°C , 18時間培養後, 生菌の有無を判定した。生育菌がみられない一番低い濃度をもって MBC とした。

6. マウス腹腔内感染防御効果

ICR 系, 雄マウス (日本クレア) 25~27g のものを 1 群 10 匹として用いた。試験菌は *E. coli* K-4001, *Klebsiella pneumoniae* K-4027, *P. aeruginosa* K-4022 を用い, nutrient broth (NB, Difco) で 37°C , 一夜培養したのち, 6% mucin (Difco) を含む NB に添加し, マウスの腹腔内に接種して感染を惹起した。薬剤は 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) 水溶液に懸濁し, 感染直後に 1 回経口投与を行った。感染後 7 日間の生存率から Litchfield-Wilcoxon 法¹⁴⁾により 50% 有効用量 (ED_{50} 値) およびその 95% 信頼限界値を求めた。

7. マウス上行性腎盂炎治療効果^{15,16)}

ICR 系, 雌マウス (日本クレア), 18~22g のものを 1 群 8~16 匹として用いた。試験菌は *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* K-4027, *P. aeruginosa* K-4022 を用い, NB で 37°C , 一夜培養後 NB で適当に希釈して試験菌液とした。

前日より約 24 時間給水制限したマウスにペントバルビタールナトリウム (大日本製薬) を 50mg/kg 腹腔内投与して麻酔し, 尿道口周辺をアルコール綿で十分消毒した後, 先を丸めた注射針を用いて, 各試験菌液 0.1ml を経尿道的に膀胱内に注入した。直ちに外尿道口をセルフインで閉鎖して排尿阻止を行ない, 菌接種 4 時間後にセルフインをはずし, 0.5% CMC 水溶液に懸濁させた薬剤を 1 回経口投与した。感染 48 時間後に両腎を摘出, 重量を測定し, 生理食塩水を加えてホモジナイズした後, 10 倍希釈系列を作製した。その 0.1ml を用いて寒天平板塗抹法により生菌数を測定し, 腎内生菌数を算出した。生菌数が 10^4 CFU/g 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 Litchfield-Wilcoxon 法¹⁴⁾により 50% 有効用量 (ED_{50} 値) およびその 95% 信頼限界値を求めた。生菌数測定培地として *E. coli* および *K. pneumoniae* では desoxycholate agar (栄研), *P. aeruginosa* では NAC agar (日水) を用いた。

II 実験結果

1. 標準菌株に対する抗菌力 (抗菌スペクトル)

NY-198 の標準菌株に対する抗菌作用を NFLX, OFLX および PPA と比較した。

Table 2 は好気性菌に対する成績で, NY-198 は *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* お

Table 1. Media used for pre-culture and MIC determination

Media *	Organisms
For preculture	
BHIB	<i>S. pyogenes</i>
BHIB + 5% Fildes enrichment	<i>Haemophilus</i> spp
GAMB	Obligate anaerobes
MHB	Other organisms
For MIC determination	
BHIA	<i>S. pyogenes</i>
BHIA +5 % Fildes enrichment	<i>Haemophilus</i> spp
GAMA	Obligate anaerobes
MHA	Other organisms

*Abbreviations : BHIB, brain heart infusion broth (Nissui) ; GAMB, GAM broth (Nissui) ; MHB, Mueller-Hinton broth (Difco) ; BHIA, brain heart infusion agar (Nissui) ; GAMA, GAM agar (Nissui) ; MHA, Mueller-Hinton agar (Difco).

Table 2. Antibacterial activity of NY-198, NFLX, OFLX and PPA against aerobic bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	NY-198		NFLX		OFLX		PPA	
	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.78	0.78	0.39	0.39	0.39	0.78	12.5	50
<i>S. aureus</i> Terajima	0.78	0.78	0.78	1.56	0.39	0.78	25	50
<i>S. aureus</i> MS 353	0.78	0.78	1.56	1.56	0.39	0.78	50	100
<i>S. pyogenes</i> Cook	1.56	6.25	1.56	6.25	1.56	3.13	>100	>100
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	6.25	12.5	6.25	12.5	1.56	3.13	100	>100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.39	0.10	0.20	0.10	0.20	3.13	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.05	0.05	0.10	0.10	1.56	6.25
<i>E. coli</i> K-12 C600	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	3.13	6.25
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025	0.05	1.56	6.25
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56	6.25
<i>S. typhi</i> 901	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025	0.05	3.13	3.13
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1.56	1.56
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.05	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	1.56	1.56
<i>S. enteritidis</i> G 14	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10	0.20	3.13	3.13
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.20	0.20	0.20	0.20	0.10	0.10	1.56	1.56
<i>E. cloacae</i> 963	0.20	0.20	0.20	0.20	0.10	0.10	15.6	1.56
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.39	0.78	0.10	0.20	0.39	0.39	6.25	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.05	0.10	0.05	0.10	0.05	0.05	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.05	0.10	0.025	0.05	0.025	0.05	1.56	6.25
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.20	0.39	0.05	0.05	0.10	0.10	1.56	6.52
<i>M. morgani</i> IFO 3848	0.05	0.05	0.025	0.05	0.05	0.05	1.56	3.12
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.39	0.39	0.10	0.10	0.39	0.39	3.13	6.25
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	1.56	3.13	0.78	3.13	0.78	3.13	12.5	25
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.78	3.13	0.39	1.56	0.39	1.56	6.25	50
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	1.56	1.56	0.39	0.78	0.78	1.56	12.5	12.5

よび *Bacillus subtilis* のグラム陽性菌に対して 0.20~6.25 μ g/ml の MIC 値を示し、その抗菌力は NFLX および OFLX とほぼ同程度であった。*P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌に対して NY-198 は 0.05~1.56 μ g/ml の MIC 値を示し、NFLX、OFLX および PPA はそれぞれ 0.025~0.78, 0.025~0.78 および 1.56~12.5 μ g/ml であった。

Table 3 に嫌気性菌に対する成績を示した。

NY-198 の抗菌力は OFLX とほぼ同等で、NFLX および PPA に比べて強いものであった。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

1985~1986年に当研究所に集積した臨床分離株559株に対する NY-198 の抗菌力を NFLX、OFLX および PPA と比較して測定した。その MIC 分布より使用菌株の 50% および 90% を阻止する濃度 (MIC₅₀ および MIC₉₀) を算出した結果を Table 4 に示した。

グラム陽性菌では *S. aureus* に対する MIC 分布は NY-198 0.39~1.56 μ g/ml, NFLX 0.39~6.25 μ g/ml, OFLX 0.39~0.78 μ g/ml で、NY-198 と OFLX はほぼ同程度で NFLX がやや劣っていた。

Staphylococcus epidermidis に対してもほぼ同様で MIC 分布は NY-198 0.39~6.25 μ g/ml, NFLX 0.39~25 μ g/ml, OFLX 0.20~3.13 μ g/ml で NFLX の上限値が NY-198 および OFLX に比べ高い値を示した。*Enterococcus faecalis* に対する MIC 分布は NY-198 0.39~50 μ g/ml, NFLX 0.20~100 μ g/ml, OFLX 0.20~50 μ g/ml で *S. aureus* および *S. epidermidis* に比べ上限値は NY-198 および OFLX が 50 μ g/ml, NFLX が 100 μ g/ml と高値を示した。また、PPA はこれらグラム陽性菌に対して NY-198 の 16 倍以上高い MIC 値を示した。

グラム陰性菌では *E. coli* に対する MIC 分布は NY-198 0.10~12.5 μ g/ml, NFLX 0.05~12.5 μ g/ml, OFLX 0.05~6.25 μ g/ml でほぼ同程度の抗菌力を示した。

K. pneumoniae に対しては 3 薬剤とも MIC 分布は 0.10~3.13 μ g/ml で全く同じであった。

Enterobacter cloacae に対する MIC 分布は NY-198 0.10~12.5 μ g/ml, NFLX 0.05~25 μ g/ml, OFLX 0.05~6.25 μ g/ml, *Enterobacter* spp. に対する MIC 分布は NY-198 0.05~6.25 μ g/ml, NFLX 0.05~3.13 μ g/ml, OFLX 0.025~3.13 μ g/ml で両菌種において 3 薬剤とも同程度の抗菌力を示した。

Proteus mirabilis に対する MIC 分布は NY-198 0.20~12.5 μ g/ml, NFLX 0.10~100 μ g/ml, OFLX 0.10~12.5 μ g/ml で NY-198 と OFLX はほぼ同程度であった。NFLX は下限値が 0.10 μ g/ml であったが、上限値は

100 μ g/ml と NY-198 および OFLX に比べ高値を示した。

Serratia marcescens に対しては全薬剤いずれも他の菌株に比べ MIC 値が高く、MIC 分布は NY-198 0.10~12.5 μ g/ml, NFLX 0.10~25 μ g/ml, OFLX 0.20~25 μ g/ml で、NY-198 は OFLX および NFLX と同程度の抗菌力を示した。

また、*P. aeruginosa* に対しても MIC 値は高く MIC 分布は NY-198 0.10~50 μ g/ml, NFLX 0.05~100 μ g/ml, OFLX 0.10~50 μ g/ml で 3 薬剤とも同程度の抗菌力を示した。

Haemophilus spp. の各薬剤に対する MIC は非常に低く、MIC 分布は NY-198 および NFLX が 0.1~3.13 μ g/ml, OFLX が 0.05~1.56 μ g/ml で同程度の抗菌力を示していた。

Acinetobacter calcoaceticus に対する MIC 分布は NY-198 0.20~25 μ g/ml, NFLX 0.39~50 μ g/ml, OFLX 0.20~6.25 μ g/ml で NY-198 は OFLX と同程度で NFLX よりやや強い抗菌力を示した。

Neisseria spp. の各薬剤に対する MIC は低く、MIC 分布は NY-198 0.05~6.25 μ g/ml, NFLX 0.10~50 μ g/ml, OFLX 0.05~3.13 μ g/ml で NY-198 は OFLX と同程度で NFLX より強い抗菌力を示した。

また、これらのグラム陰性菌に対しても PPA は NY-198 の 4 倍以上高い MIC 値を示した。

以上のように今回対象とした臨床分離株では NY-198 は *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. marcescens*, *A. calcoaceticus*, *Neisseria* spp. に対して OFLX と同程度で NFLX より強い抗菌力を示し、他の菌株に対しても NFLX, OFLX とほぼ同程度の抗菌力を示した。また、すべての菌株に対し、PPA よりも優れた抗菌力を示した。

3. MBC

NY-198 の MIC 値と MBC 値の関係を NFLX, OFLX および PPA と比較して Table 5 に示した。

標準菌株に対する NY-198 の MBC 値は MIC 値と同じ、若しくは 1 段階の差であった。

4. 諸因子の MIC 値に及ぼす影響

NY-198 の MIC 値は、Fig. 2~5 に示したように培地の種類、接種菌量および馬血清の添加により、ほとんど影響されなかったが、培地の pH では、グラム陰性菌において酸性側で抗菌力の低下が認められた。これらの結果は NFLX および OFLX についても同様であった。

5. マウス腹腔内感染防御効果

NY-198 の *in vivo* 抗菌力を NFLX, OFLX および PPA と比較して Table 6 に示した。用いた 3 種の感染菌に対する NY-198 の *in vitro* 抗菌力は、NFLX およ

Table 3. Antibacterial activity of NY-198, NFLX, OFLX and PPA against anaerobic bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	NY-198		NFLX		OFLX		PPA	
	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸
<i>B. fragilis</i> GM7000	6.25	12.5	25	25	3.13	3.13	>100	>100
<i>B. fragilis</i> GAI-5524	12.5	12.5	25	25	3.13	3.13	100	>100
<i>B. fragilis</i> GAI-5942	6.25	12.5	50	50	6.25	6.25	>100	>100
<i>B. fragilis</i> GAI-5943	6.25	12.5	25	50	3.13	6.25	100	>100
<i>B. fragilis</i> GAI-5944	12.5	12.5	>100	>100	6.25	12.5	100	>100
<i>B. fragilis</i> 1010	12.5	50	100	>100	50	50	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-6060	25	50	>100	>100	12.5	50	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-6061	6.25	50	>100	>100	12.5	50	>100	>100
<i>B. vulgatus</i> GAI-6169	6.25	12.5	>100	>100	6.25	6.25	100	>100
<i>B. distasonis</i> GAI-6872	6.25	12.5	>100	>100	6.25	25	>100	>100
<i>P. magnus</i> GAI-6026	1.56	3.13	0.78	1.56	3.13	3.13	100	>100
<i>P. anaerobius</i> GAI-5980	1.56	6.25	3.13	6.25	1.56	3.13	100	100
<i>C. perfringens</i> PB6K	1.56	3.13	3.13	6.25	3.13	3.13	50	100

び OFLX と比較して、同等若しくはやや弱かった。

E. coli K-4001 感染に対する NY-198 の ED₅₀ 値は 5.73mg/kg で、NFLX の 2.8 倍、OFLX の 1.7 倍優れた効果を示した。*K. pneumoniae* K-4027 感染に対しては、NY-198 の ED₅₀ 値は 9.10mg/kg で、NFLX の 3.4 倍優れた効果を示し、OFLX とほぼ同等であった。*P. aeruginosa* K-4022 感染に対しては NY-198 の ED₅₀ 値は 22.9mg/kg で、NFLX の 2.5 倍優れた効果を示し、OFLX よりやや優れていた。また、PPA との比較では、NY-198 は各菌株において約 6～20 倍優れた効果を示した。

6. マウス上行性腎盂炎に対する治療効果

実験的上行性腎盂炎に対する NY-198 の治療効果を腎内生菌数を測定することにより、NFLX、OFLX および PPA と比較検討した結果を Fig. 6～8 に示した。*E. coli* 感染の場合、NY-198 投与群では用量依存的な腎内生菌数の減少がみられ、NFLX、OFLX および PPA よりも優れていた。

K. pneumoniae 感染の場合にも、NY-198 投与群は用量依存的な腎内生菌数の減少がみられ、NFLX、OFLX および PPA よりも優れた効果を示した。

また、*P. aeruginosa* 感染では、腎内生菌数は 10mg/kg 以上で減少傾向を示したが、OFLX 投与群では、30mg/kg 以上で菌数減少を認めた。

腎臓 1g 当たりの腎内生菌数が 1×10^4 CFU 以下のマウスを有効として求めた NY-198 の ED₅₀ 値は Table 7 に示したように *E. coli* 感染に対しては 0.81mg/kg で、NFLX の 23 倍、OFLX の 4.2 倍、PPA の 37 倍優れた効果を示し、*K. pneumoniae* 感染に対しても NY-198 の

ED₅₀ 値は 0.65mg/kg で NFLX の 12 倍、OFLX の 3.0 倍および PPA の 56 倍優れた効果を示した。また、*P. aeruginosa* 感染に対しては NY-198 の ED₅₀ 値は 2.66mg/kg で、NFLX の 7.4 倍、OFLX の 1.7 倍、PPA の 17 倍優れた効果を示した。

III 考 察

NY-198 はグラム陽性菌、ブドウ糖非酸酵菌および嫌気性菌を含むグラム陰性菌に対して幅広いスペクトルを示し、抗菌力は NFLX および OFLX と同程度であった。また、臨床分離株に対しても幅広い抗菌スペクトルを示した。

諸因子の MIC 値に及ぼす影響では、培地、菌の接種量、および血清の添加による影響はみられなかったが、培地 pH が 5 以下の酸性の場合、MIC 値はグラム陰性菌で高くなった。この結果は NFLX、OFLX でも同様であった。

一方、*in vivo* 抗菌力においては腹腔内感染実験に用いた菌株に対する *in vitro* 抗菌力が NFLX および OFLX より弱かったにもかかわらず、NY-198 は、経口投与で優れた有効性を示した。このことは、NY-198 が NFLX および OFLX と比較して経口吸収性が良好なこと、組織内移行性が優れていることと密接な関連があると考えられる。

また、尿路感染においては、OFLX の約 2～4 倍優れた治療効果を発揮し、腹腔内感染より尿路感染モデルでより有効であった。

以上、NY-198 は *in vitro* で NFLX および OFLX と

Table 4. Antibacterial activities of NY-198, NFLX, OFLX and PPA against clinical isolates

Organism (no. of strains)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	For 50% of strains	For 90% of strains
<i>S. aureus</i> (50)	NY-198	0.39 ~ 1.56	0.53	0.88
	NFLX	0.39 ~ 6.25	0.74	1.56
	OFLX	0.39 ~ 0.78	0.34	0.53
	PPA	12.5 ~ 100<	25.0	100
<i>S. epidermidis</i> (50)	NY-198	0.39 ~ 6.25	0.56	1.10
	NFLX	0.39 ~ 25	0.42	3.60
	OFLX	0.20 ~ 3.13	0.32	0.67
	PPA	6.25 ~ 100<	10.6	>100
<i>E. faecalis</i> (50)	NY-198	0.39 ~ 50	3.35	5.80
	NFLX	0.20 ~ 100	1.85	6.20
	OFLX	0.20 ~ 50	1.30	3.60
	PPA	6.25 ~ 100<	>100	>100
<i>E. coli</i> (78)	NY-198	0.10 ~ 12.5	0.10	0.66
	NFLX	0.05 ~ 12.5	0.082	0.58
	OFLX	0.05 ~ 6.25	0.079	0.54
	PPA	0.78 ~ 100<	1.30	17.5
<i>K. pneumoniae</i> (50)	NY-198	0.10 ~ 3.13	0.16	1.56
	NFLX	0.10 ~ 3.13	0.15	1.40
	OFLX	0.10 ~ 3.13	0.12	1.15
	PPA	0.78 ~ 100<	1.85	32.0
<i>E. cloacae</i> (24)	NY-198	0.10 ~ 12.5	0.095	1.20
	NFLX	0.05 ~ 25	0.078	2.55
	OFLX	0.05 ~ 6.25	0.070	0.95
	PPA	0.78 ~ 100<	1.20	>100
<i>Enterobacter</i> spp. (21)	NY-198	0.05 ~ 6.25	0.50	2.50
	NFLX	0.05 ~ 3.13	0.48	1.54
	OFLX	0.025 ~ 3.13	0.28	1.00
	PPA	0.78 ~ 100<	11.2	86.0
<i>P. mirabilis</i> (20)	NY-198	0.20 ~ 12.5	0.20	3.13
	NFLX	0.10 ~ 100	0.10	1.56
	OFLX	0.10 ~ 12.5	0.16	2.45
	PPA	0.78 ~ 100<	1.10	100
<i>S. marcescens</i> (60)	NY-198	0.10 ~ 12.5	1.24	7.00
	NFLX	0.10 ~ 25	2.60	17.0
	OFLX	0.20 ~ 25	1.37	8.00
	PPA	1.56 ~ 100<	40.0	>100
<i>P. aeruginosa</i> (80)	NY-198	0.10 ~ 50	2.05	10.0
	NFLX	0.05 ~ 100	1.08	9.00
	OFLX	0.10 ~ 50	1.95	9.00
	PPA	1.56 ~ 100<	20.0	>100
<i>Haemophilus</i> spp. (12)	NY-198	0.10 ~ 3.13	0.085	0.34
	NFLX	0.10 ~ 3.13	0.085	0.19
	OFLX	0.05 ~ 1.56	0.080	0.18
	PPA	1.56 ~ 100<	3.13	11.0
<i>A. calcoaceticus</i> (39)	NY-198	0.20 ~ 25	0.45	7.60
	NFLX	0.39 ~ 50	2.20	29.5
	OFLX	0.20 ~ 6.25	0.29	4.00
	PPA	3.13 ~ 100<	31.9	>100
<i>Neisseria</i> spp. (25)	NY-198	0.05 ~ 6.25	0.16	3.50
	NFLX	0.10 ~ 50	0.24	5.60
	OFLX	0.05 ~ 3.13	0.14	1.45
	PPA	0.78 ~ 100	1.50	65.0

Table 5. Comparison between MIC and MBC of NY-198, NFLX, OFLX and PPA

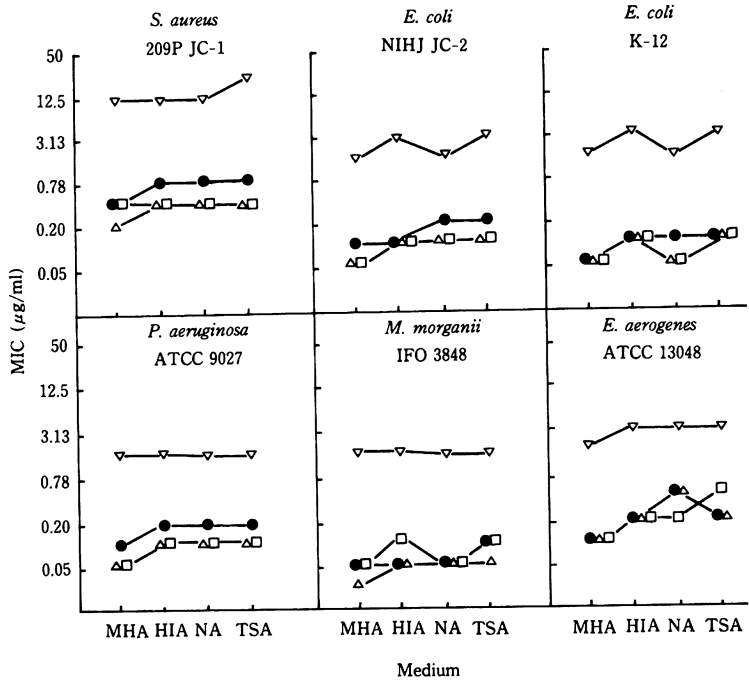
Organism	NY-198		NFLX		OFLX		PPA	
	MIC*	MBC*	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	0.39	0.78	0.20	0.20	0.39	0.39	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> Terajima	0.39	0.78	0.39	0.78	0.20	0.39	25	25
<i>S. aureus</i> MS 353	0.78	0.78	1.56	3.13	0.39	0.78	50	>100
<i>S. pyogenes</i> Cook	3.13	6.25	1.56	1.56	1.56	1.56	>100	>100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.20	0.20	0.20	0.10	0.20	3.13	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10	1.56	1.56
<i>E. coli</i> K-12 C600	0.05	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10	1.56	3.13
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.025	0.05	0.05	0.05	0.025	0.025	1.56	3.13
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56	3.13
<i>S. typhi</i> 901	0.05	0.05	0.05	0.10	0.025	0.05	1.56	3.13
<i>S. paratyphi</i> 1015	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025	0.05	0.78	0.78
<i>S. schottmuelleri</i> 8006	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025	0.025	0.78	1.56
<i>S. enteritidis</i> G 14	0.10	0.10	0.20	0.20	0.10	0.10	1.56	3.13
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.10	0.10	0.10	0.20	0.10	0.10	3.13	3.13
<i>E. cloacae</i> 963	0.10	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56	1.56
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	0.39	0.78	0.10	0.20	0.39	0.39	3.13	6.25
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.10	1.56	3.13
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.05	0.10	0.05	0.05	0.025	0.025	1.56	1.56
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.10	0.20	0.05	0.10	0.10	0.10	1.56	1.56
<i>M. morgani</i> IFO 3848	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.78	0.78
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	0.39	0.78	0.20	0.20	0.39	0.39	1.56	3.13
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	0.78	1.56	0.39	1.56	0.39	1.56	6.25	12.5
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.20	0.39	0.10	0.78	0.20	0.20	3.13	6.25
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	0.78	1.56	0.39	0.78	0.78	0.78	12.5	25

* $\mu\text{g/ml}$

Table 6. Protective effect against systemic infections in mice

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limits)
<i>E. coli</i> K-4001 (8.1×10^7) *	NY-198	0.10	5.73 [3.75 ~ 8.74]
	NFLX	0.05	15.9 [9.69 ~ 26.0]
	OFLX	0.10	10.0 [6.67 ~ 15.0]
	PPA	1.56	108 [71.2 ~ 165]
<i>K. pneumoniae</i> K-4027 (4.5×10^7) *	NY-198	0.20	9.10 [5.99 ~ 13.8]
	NFLX	0.10	30.9 [20.3 ~ 47.0]
	OFLX	0.10	10.8 [7.19 ~ 16.1]
	PPA	1.56	50.7 [35.0 ~ 73.6]
<i>P. aeruginosa</i> K-4022 (4.25×10^6) *	NY-198	1.56	22.9 [17.0 ~ 30.9]
	NFLX	0.78	56.4 [37.9 ~ 84.0]
	OFLX	0.78	26.5 [19.4 ~ 36.1]
	PPA	12.5	164 [111 ~ 243]

* Inoculum size (CFU/mouse)



Abbreviations: MHA, Mueller-Hinton agar; HIA, heart infusion agar; NA, nutrient agar; TSA, tripticase soy agar.

Fig. 2. Influence of medium on the MIC of NY-198 (●), NFLX (△), OFLX (□) and PPA (▽).

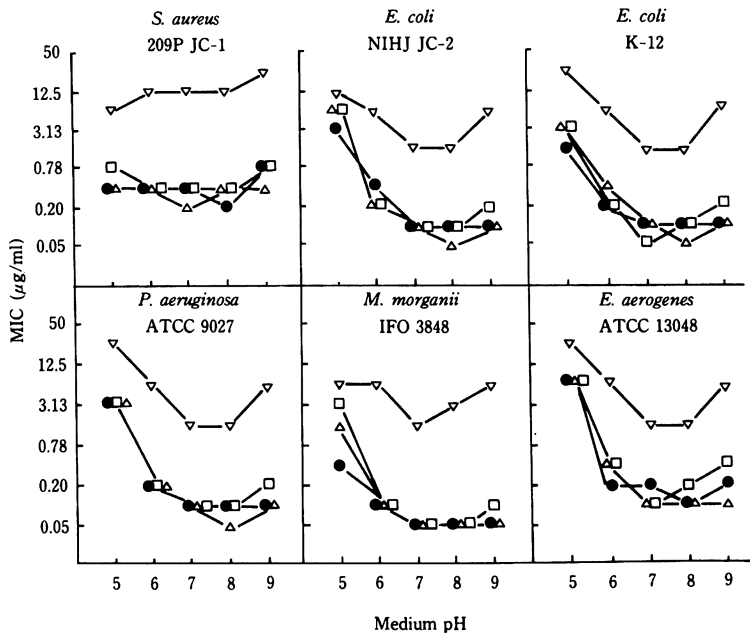


Fig. 3. Influence of medium pH on the MIC of NY-198 (●), NFLX (△), OFLX (□) and PPA (▽).

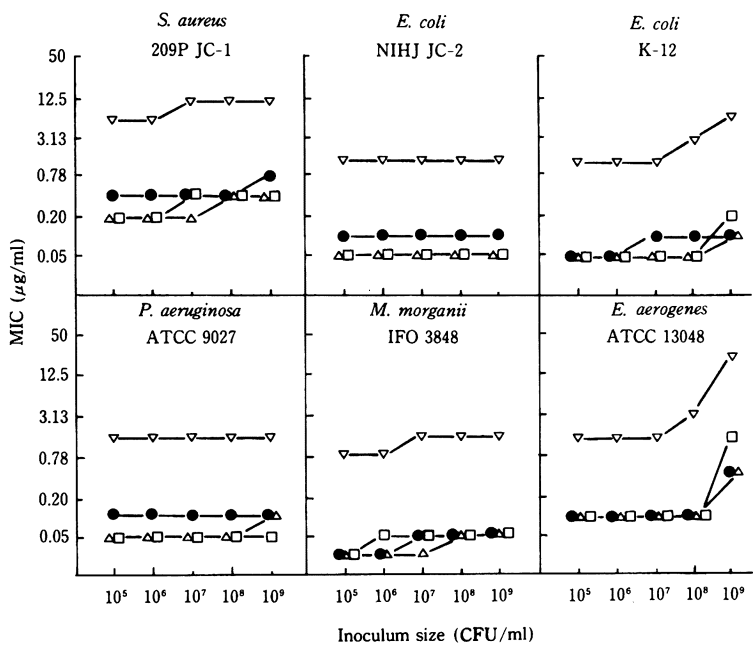


Fig. 4. Influence of inoculum size on the MIC of NY-198 (●), NFLX (△), OFLX (□) and PPA (▽).

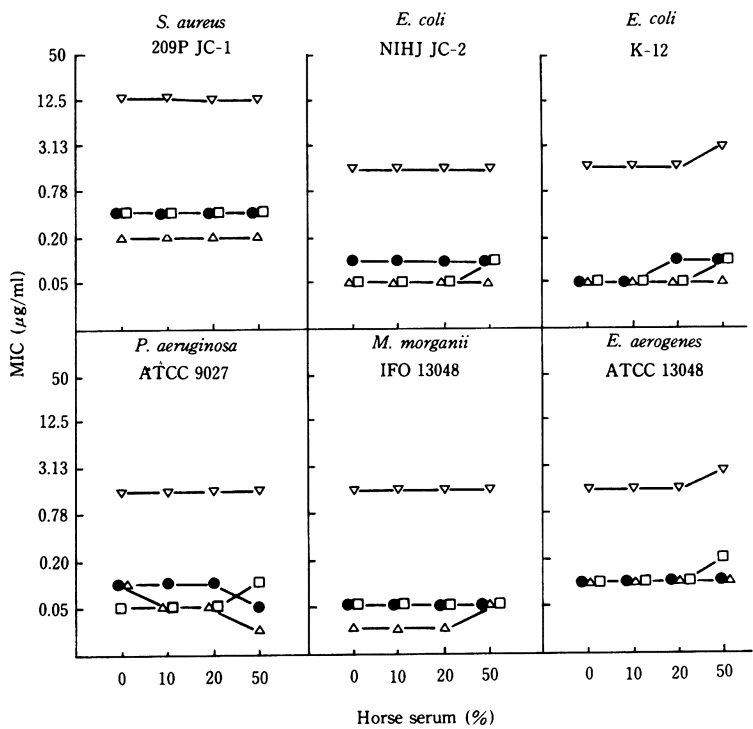
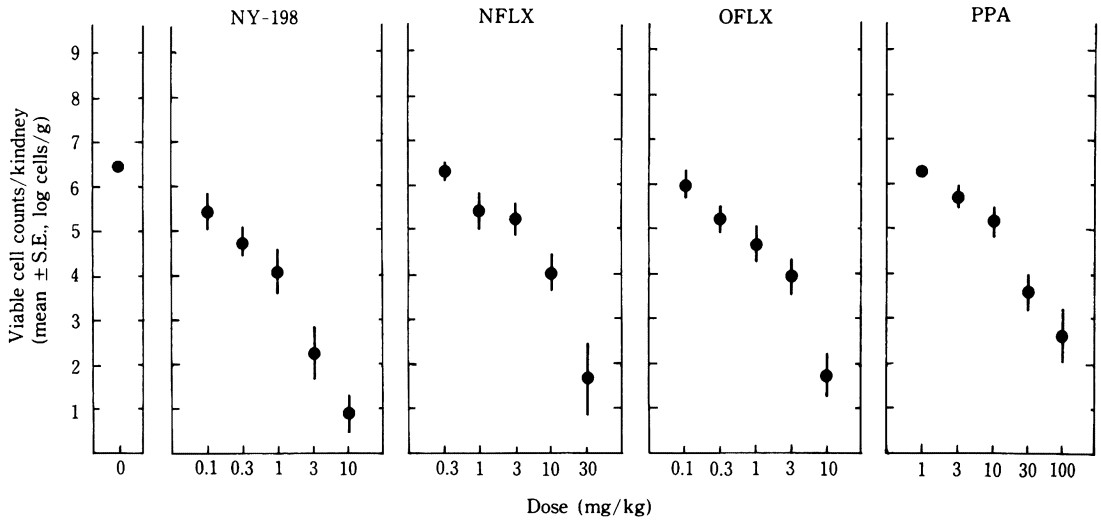
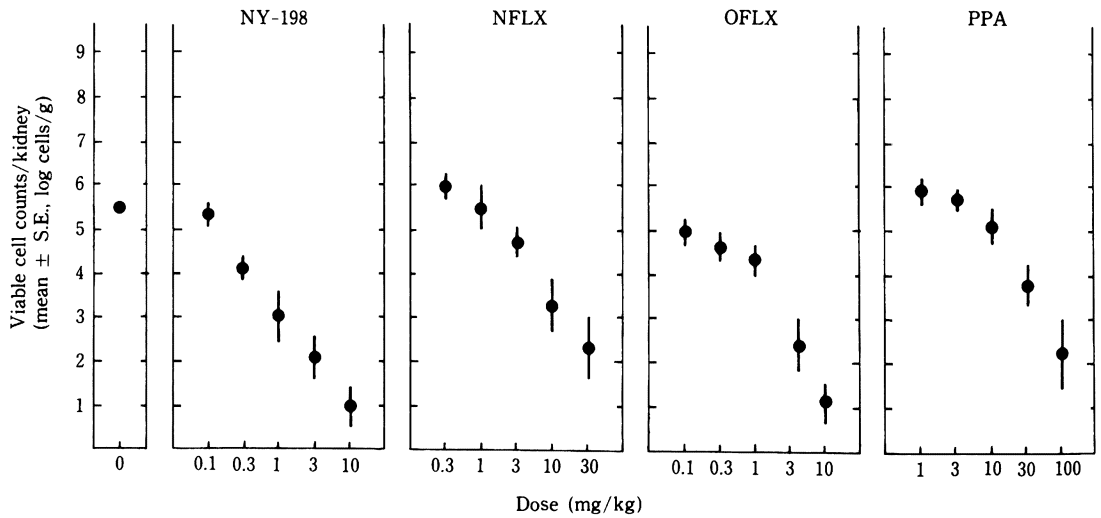


Fig. 5. Influence of horse serum on the MIC of NY-198 (●), NFLX (△), OFLX (□) and PPA (▽).



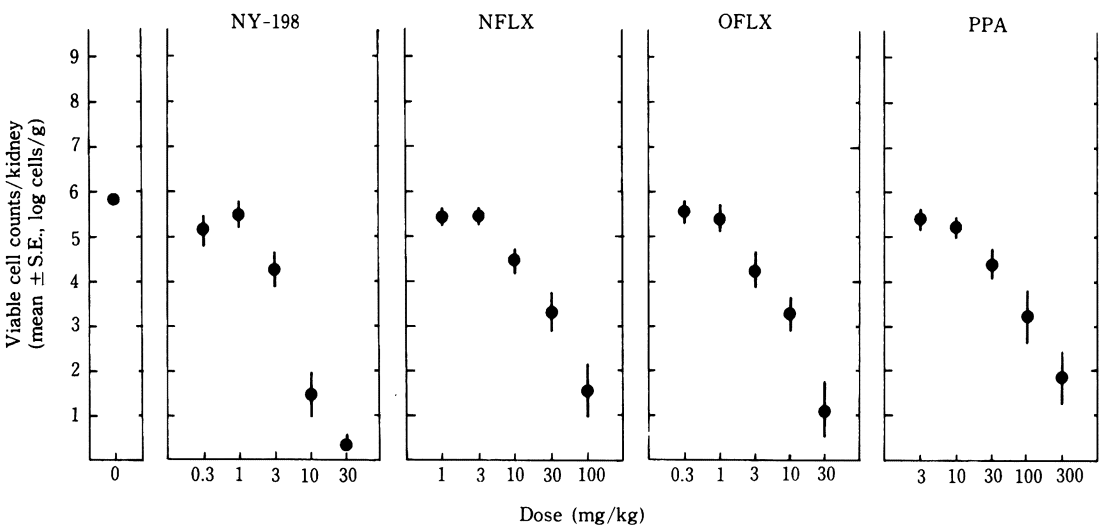
Inoculum size was 7.8×10^2 CFU per mouse. Number of bacteria in the kidneys was measured 48 h after inoculation.

Fig. 6. Therapeutic effect of NY-198, NFLX, OFLX and PPA against experimental urinary tract infection with *E. coli* KC-14 in mice.



Inoculum size was 9.5×10^2 CFU per mouse. Number of bacteria in the kidneys was measured 48 h after inoculation.

Fig. 7. Therapeutic effect of NY-198, NFLX, OFLX and PPA against experimental urinary tract infection with *K. pneumoniae* K-4027 in mice.



Inoculum size was 5.0×10 CFU per mouse. Number of bacteria in the kidneys was measured 48 h after inoculation.

Fig. 8. Therapeutic effect of NY-198, NFLX, OFLX and PPA against experimental urinary tract infection with *P. aeruginosa* K-4022 in mice.

Table 7. Therapeutic effect against urinary tract infections in mice

Organism	Drug	MIC (μ g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg) [95% confidence limits]
<i>E. coli</i> KC-14 (7.8×10^2) *	NY-198	0.05	0.81 [0.35 ~ 1.92]
	NFLX	0.05	18.6 [4.56 ~ 76.1]
	OFLX	0.05	3.42 [1.48 ~ 7.91]
	PPA	0.39	30.1 [15.0 ~ 60.2]
<i>K. pneumoniae</i> K-4027 (9.5×10^2) *	NY-198	0.20	0.65 [0.16 ~ 2.69]
	NFLX	0.10	7.87 [3.05 ~ 20.3]
	OFLX	0.10	1.94 [0.82 ~ 4.62]
	PPA	1.56	36.3 [16.8 ~ 78.5]
<i>P. aeruginosa</i> K-4022 (5.0×10) *	NY-198	1.56	2.66 [0.91 ~ 7.80]
	NFLX	0.78	19.7 [10.7 ~ 36.2]
	OFLX	0.78	4.61 [1.73 ~ 12.3]
	PPA	12.5	43.9 [18.8 ~ 102]

* Inoculum size (CFU/mouse)

同様に高範囲なスペクトルと強い抗菌力を有し、更に *in vivo* での感染モデルに対して経口投与で NFLX および OFLX より優れた効果を示すことから経口剤として臨床における種々の感染症への応用が期待できる薬剤と考えられる。

本試験は昭和59年7月から昭和62年3月の期間に実施した。

文 献

- 1) DEITZ, W. H.; J. H. BAILEY & E. J. FROELICH : *In vitro* antibacterial properties of nalidixic acid, a new drug active agents gram-negative organisms. Antimicrob. Agents Chemother. PP. 583~587, 1963
- 2) 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
- 3) 中田勝久, 井上 了, 石山正光, 久保 雄嗣 : Pipemidic acid の 抗 菌 作 用. Chemotherapy 23 (No. 9) : 2659~2667, 1975
- 4) ITO, A.; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUKE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI : *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. Antimicrob. Agents Chemother. 17 : 103~108, 1980
- 5) 伊藤明, 村山哲, 平井啓二, 阿部泰夫, 入倉勉 : 新しいキノリン誘導体 AM-715の細菌学的研究. Chemotherapy 30 (S-4) : 66~81, 1981
- 6) SATO, K.; Y. MATSUURA, M. INOUE, T. UNE, Y. OSADA & S. MITSUHASHI : *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. Antimicrob. Agents Chemother. 22 : 548~553, 1982
- 7) 長田恭明, 采孟, 池内澄, 小河秀正 : DL-8280の細菌学的評価. Chemotherapy 32 (S-1) : 90~98, 1984
- 8) MATSUMOTO, J.; T. MIYAMOTO, A. MINAMIDA, Y. NISHIMURA, H. EGAWA & H. NISHIMURA : Structure activity relationships of 4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acids including AT-2266, a new oral antipseudomonal agent. Current chemotherapy and infectious disease. J. D. NELSON & C. GRASSI, Ed., Amer. Soc. Microbiol. PP.454~456, 1980
- 9) 中村信一, 片江宏巳, 南 明, 中田勝久, 井上 了, 山岸純一, 高瀬善行, 清水當尚 : AT-2266の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. Chemotherapy 32 (S-3) : 70~85, 1984
- 10) HIROSE T.; E. OKEZAKI, H. KATO, Y. ITO, M. INOUE & S. MITSUHASHI : *In vitro* and *in vivo* activity of NY-198, a new difluorinated quinolone. Antimicrob. Agents Chemother. 31 (6) : 854~859, 1987
- 11) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 12) 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
- 13) 薬剤感受性測定法, 三橋 進編, 講談社, 1980
- 14) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 92 : 99~113, 1948
- 15) 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
- 16) 西野武志, 相本茂樹, 中澤秀美, 谷野輝雄 : AT-2266 に関する細菌学的評価. Chemotherapy 32 (S-3) : 43~69, 1984

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF NY-198

EIICHI OKEZAKI, KOICHI OHMICH, SHOJI KOIKE, YOSHIE TAKAHASHI
and EIICHI MAKINO

Central Research Laboratory, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of NY-198 (($\pm$)-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride), a new pyridone carboxylic acid derivative, were compared with those of norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX) and pipemidic acid (PPA). The results are summarized as follows.

1. NY-198 showed a broad antibacterial spectrum against Gram-positive and -negative bacteria including anaerobic bacteria. The antibacterial activity of NY-198 was equivalent to those of NFLX and OFLX.
2. Antibacterial activity of NY-198 against clinical isolates was higher than that of PPA and similar to those of NFLX and OFLX.
3. Antibacterial activity of NY-198 was not influenced by kind of medium, inoculum size of bacteria or the addition of horse serum, but decreased in acidic medium below pH 5.
4. MBCs of NY-198 showed values similar to the MICs against various species of bacteria.
5. The protective effect of NY-198 per os against intraperitoneal infection in mice was greater than that of NFLX, OFLX or PPA. In urinary tract infection in mice, NY-198 dose-dependently reduced the number of bacteria in the kidney, and the therapeutic effect of NY-198 was superior to that of NFLX, OFLX or PPA.

These results indicate that NY-198 is similar to NFLX and OFLX in *in vitro* antibacterial activity but superior to NFLX, OFLX and PPA in *in vivo* antibacterial activity. Accordingly, NY-198 promises to be an excellent oral antibacterial drug.