

T-3262 の *in vitro* および *in vivo* における細菌学的評価

藤巻一雄・能見寿彦・浜名洋子・三橋 進

エビゾーム研究所*

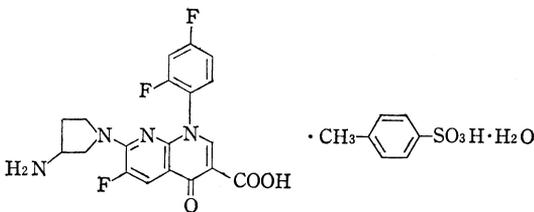
井上松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

1. T-3262 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌群に対し、広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を示した。特に *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* および *Streptococcus pneumoniae* 等のグラム陽性球菌に対し、強い抗菌活性を有していた。
2. T-3262 は nalidixic acid 耐性および gentamicin 耐性グラム陰性菌に対し優れた抗菌活性を示した。
3. T-3262 の抗菌作用は殺菌的であり、*Escherichia coli* (*E. coli*) および *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) の増殖曲線に及ぼす影響では 1 MIC 濃度で菌の増殖を完全に阻止した。
4. T-3262 に対する自然耐性菌出現頻度は低かった。
5. T-3262 は *E. coli* の DNA gyrase 活性を対照薬剤である ciprofloxacin, ofloxacin および norfloxacin よりも強く阻害した。
6. T-3262 のマウス実験的感染症に対する治療効果は *S. aureus* SMITH においては対照薬剤よりもはるかに優れていた。また、*E. coli* ML 4707, *P. aeruginosa* GN 11189 および *Serratia marcescens* GN 7577 においては ciprofloxacin とほぼ同等の優れた治療効果を示した。

Key words : T-3262, ピリドンカルボン酸系抗菌剤, DNA gyrase

T-3262 は富山化学工業(株)総合研究所にて新しく合成されたピリドンカルボン酸系抗菌剤であり、Fig. 1 に示す構造式を有する。今回我々は T-3262 の *in vitro* および *in vivo* における抗菌作用を ciprofloxacin (CPF), ofloxacin (OFLX), norfloxacin (NFLX) および pipemidic acid (PPA) を対照薬剤として比較検討したので報告する。



(±)-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1-(2,4-difluorophenyl)-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid *p*-toluenesulfonate hydrate

Fig. 1. Chemical structure of T-3262.

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

T-3262 は富山化学工業、ciprofloxacin はバイエル薬品、ofloxacin および nalidixic acid (NA) は第一製薬、norfloxacin は杏林製薬、pipemidic acid は大日本製薬、gentamicin (GM) は塩野義製薬、methicillin は萬有製薬より分与を受けた。

2. 使用菌株

標準菌株および臨床分離株は群馬大学薬剤耐性菌実験施設の保存株を使用した。最小殺菌濃度 (MBC) の測定、増殖曲線におよぼす薬剤の影響および自然耐性菌出現頻度の測定には *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) SMITH, *Escherichia coli* (*E. coli*) ML 4707, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) GN 11189 および *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) GN 7577 の4株を使用した。

3. 使用培地

感受性測定には主に Sensitivity Disk Agar (SDA, ニッスイ製薬) および Sensitivity Test Broth (STB,

ニッスイ製薬)を使用した。*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) および *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) の感受性測定には 10% 馬血液加 SDA および Todd Hewitt Broth (Difco) を使用した。*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) では 5% Fildes Enrichment (Difco) を含む SDA を使用した。*Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) では溶血させた馬血液を 10% 含むチョコレート寒天培地を使用した。また嫌気性菌では GAM broth (ニッスイ製薬) および GAM agar (ニッスイ製薬) を使用した。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会の MIC 測定法¹⁾ および同学会の嫌気性菌の MIC 測定法²⁾ に準じておこなった。

5. 殺菌作用

a) MBC の測定

試験菌を STB で 37°C, 1 夜培養後, 2 倍希釈系列の薬剤含有 STB に接種した。37°C, 18 時間培養後, 肉眼で濁りの有無を判定し, 濁りの認められない濃度を MIC とした。次にその MIC 以上の濃度の薬剤を含む broth から SDA に約 5 μ l 接種し, 37°C, 18 時間培養後, 生育菌の有無を判定し, 菌の発育が認められない濃度を MBC とした。

b) 増殖曲線におよぼす薬剤の影響

試験菌を STB で 37°C, 1 夜培養後, 新鮮 STB に約 10⁴ CFU/ml となるように接種し, 37°C で 2 時間振とう培養した後, 薬剤を添加した。経時的に生菌数を測定し薬剤の影響を調べた。

6. 自然耐性菌出現頻度の測定

試験菌を STB で 37°C, 1 夜培養後, 2~4 MIC 濃度の薬剤を含む SDA に塗抹し, 37°C, 48 時間培養後に生じたコロニー数を測定した。

7. *E. coli* の DNA gyrase に対する阻害作用

DNA gyrase は *E. coli* KL-16 株を Medium B にて培養し, 対数増殖後期に集菌し, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 7.5) および 0.5 mM dithiothreitol (DTT, Sigma) に浮遊させ, 20 mg/ml Lysozyme (Sigma) および 10% Brij-58 (Sigma) で溶菌させ遠心した。その上清を硫酸ストレプトマイシン (Sigma) 処理後, 硫酸分画し, 次いで Epoxy-activated Sepharose CL-6B (Pharmacia) に novobiocin (Sigma) をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより gyrase を精製した。この gyrase は ATP および Mg²⁺ 存在下では open circular (relaxed) DNA を covalently closed circular (supercoiled) DNA に変換することが知られている³⁾。このため, この酵素反

応の基質として塩化セシウム法で調整した supercoiled DNA を牛胸腺由来の Topoisomerase I (BRL) により relaxed DNA に変換したものをを用いた。Gyrase に基質, ATP および Mg²⁺ 等を含む反応液と各薬剤を混和し, 37°C, 2 時間反応させた後, 0.8% アガロースゲル電気泳動をおこないデントメーターで DNA を定量し各薬剤の 50% 反応阻害濃度 (ID₅₀) を測定した。

8. マウス感染治療実験

ICR 系雄性マウス (体重 20 \pm 1g) を 1 群 10 匹として使用した。菌液は Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco) にて 18 時間培養後 BHIB で希釈し, 5% Mucin (Difco) に懸濁して調整した。ただし, *E. coli* の場合は生理食塩水に懸濁して菌液とした。薬剤はマウス腹腔内に菌液を接種した直後に 0.2% methyl cellulose (信越化学) に懸濁し, 経口投与した。感染 7 日後の生存率から Probit 法⁴⁾ に基づき ED₅₀ 値および 95% 信頼限界を求めた。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

T-3262 の標準菌株に対する抗菌力を CPFX, OFLX, NFLX および PPA を対照薬剤として比較検討し, Table 1 に示した。グラム陽性球菌の *S. aureus* および *S. pyogenes* に対する T-3262 の MIC は 0.0125~0.2 μ g/ml で対照薬剤よりもはるかに優れた値であった。種々のグラム陰性菌に対する T-3262 の MIC は <0.003~0.39 μ g/ml で CPFX とほぼ同等で OFLX, NFLX および PPA よりも強い抗菌活性を示した。以上より T-3262 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌活性を示し, 使用した全ての菌株に対し, 1.56 μ g/ml で発育を阻止した。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

S. aureus 106 株, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 79 株, *Staphylococcus epidermidis* 107 株, *S. pyogenes* 96 株および *S. pneumoniae* 21 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.025~0.1 μ g/ml で対照薬剤よりも 3~4 管以上低い値であり, はるかに優れた抗菌力を有していた (Fig. 2~6)。*E. faecalis* 82 株および *Enterococcus faecium* 32 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.39~0.78 μ g/ml で CPFX より 1 管, OFLX および NFLX より 2~3 管優れた値であった (Fig. 7, 8)。

E. coli 95 株, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) 50 株および *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) 48 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.01~0.05 μ g/ml で CPFX とほぼ同等, OFLX および NFLX より

Table 1. Antibacterial activity of T-3262 against standard strains

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	T-3262		Ciprofloxacin		Ofloxacin		Norfloxacin		Pipemidic acid			
	10^6 *	10^8 *	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8		
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P JC-1	0.0125	0.0125	0.10	0.10	0.20	0.20	0.20	0.20	12.5	12.5		
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.0125	0.0125	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78	0.78	25	25		
<i>Staphylococcus aureus</i> MS353	0.05	0.10	3.13	3.13	1.56	3.13	6.25	12.5	>100	>100		
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK	0.10	0.20	0.39	0.39	0.39	0.78	0.78	1.56	100	>100		
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.78	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	12.5	25	100	>100		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.0125	0.0125	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.20	3.13	6.25		
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.05	0.05	0.10	0.10	1.56	1.56		
<i>Escherichia coli</i> K-12 C-600	0.025	0.025	0.025	0.05	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56	3.13		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	0.006	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025	0.05	0.05	1.56	3.13		
<i>Salmonella typhimurium</i> IID971	0.0125	0.025	0.025	0.05	0.05	0.10	0.20	0.20	1.56	3.13		
<i>Salmonella typhi</i> 901	<0.003	<0.003	0.006	0.0125	0.0125	0.0125	0.05	0.05	1.56	1.56		
<i>Salmonella paratyphi</i> 1015	<0.003	<0.003	<0.003	0.006	0.006	0.006	0.025	0.05	0.78	0.78		
<i>Salmonella schothmuelleri</i> 8006	0.0125	0.025	0.025	0.05	0.10	0.10	0.10	0.20	1.56	3.13		
<i>Salmonella enteritidis</i> G 14	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	0.006	0.0125	0.025	0.05	0.78	0.78		
<i>Serratia marcescens</i> IAM1184	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.20	0.20	0.20	3.13	3.13		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	0.39	0.39	0.39	0.39	1.56	1.56	1.56	1.56	12.5	25		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78	1.56	0.78	0.78	6.25	12.5		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	0.20	0.20	0.10	0.10	0.78	0.78	0.39	0.78	12.5	12.5		
<i>Morganella morganii</i> IFO 3848	0.10	0.10	0.0125	0.0125	0.025	0.05	0.05	0.10	1.56	1.56		
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.39	0.20	0.39	6.25	6.25		
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.025	0.05	0.0125	0.025	0.0125	0.025	0.05	0.10	1.56	3.13		
<i>Proteus vulgaris</i> HX-19	0.006	0.0125	<0.003	0.006	0.0125	0.0125	0.025	0.05	0.78	1.56		
<i>Providencia rettgeri</i> IFO 3850	0.05	0.05	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39	0.78	6.25	25		
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	0.025	0.05	0.05	0.05	0.20	0.20	0.20	0.39	3.13	3.13		
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	0.025	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	0.10	0.10	1.56	3.13		

* : Inoculum size (CFU/ml)

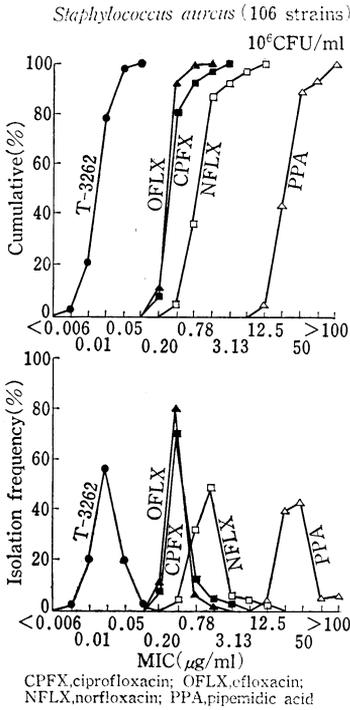


Fig. 2. Antibacterial activity of T-3262.

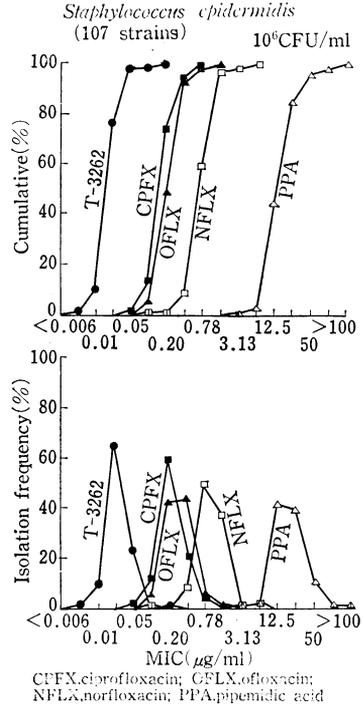


Fig. 4. Antibacterial activity of T-3262.

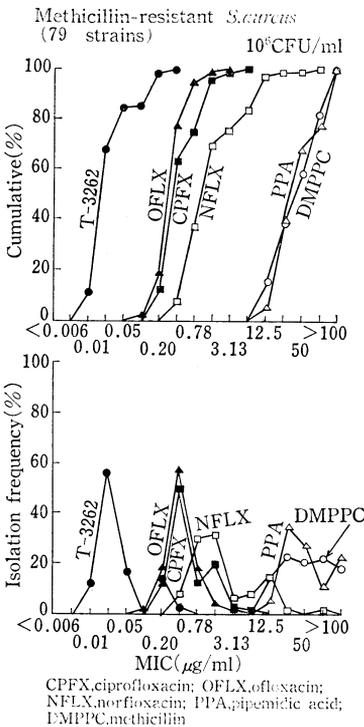


Fig. 3. Antibacterial activity of T-3262.

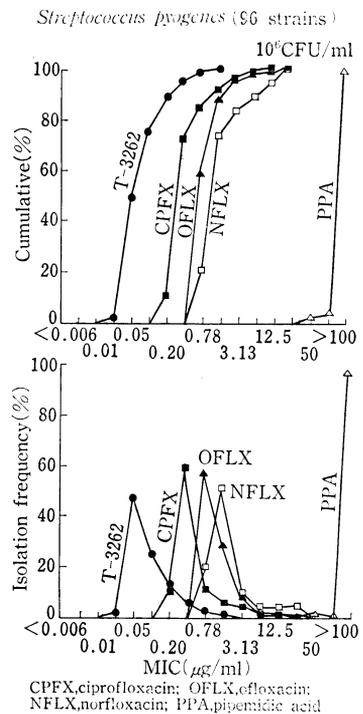


Fig. 5. Antibacterial activity of T-3262.

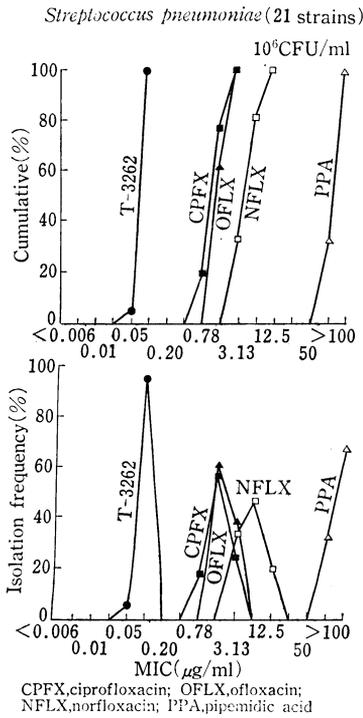


Fig. 6. Antibacterial activity of T-3262.

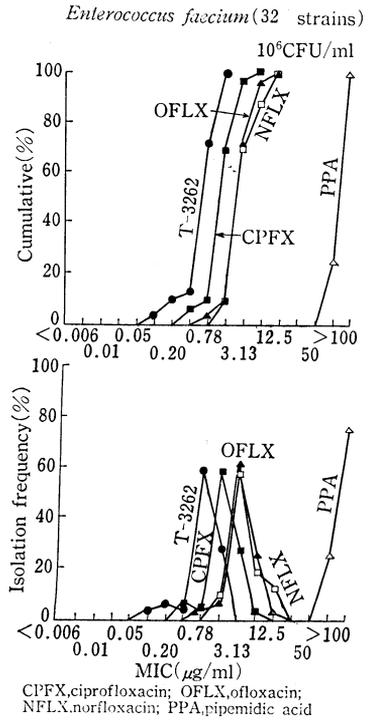


Fig. 8. Antibacterial activity of T-3262.

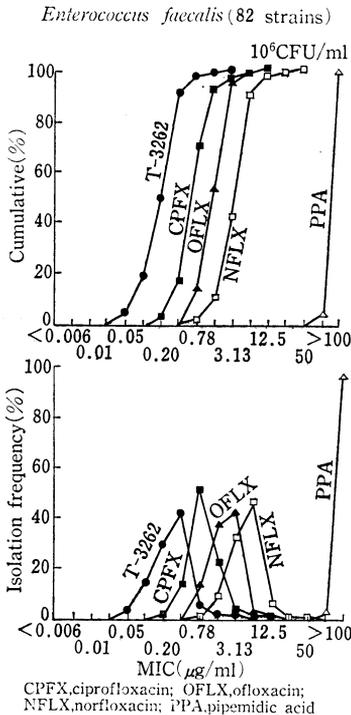


Fig. 7. Antibacterial activity of T-3262.

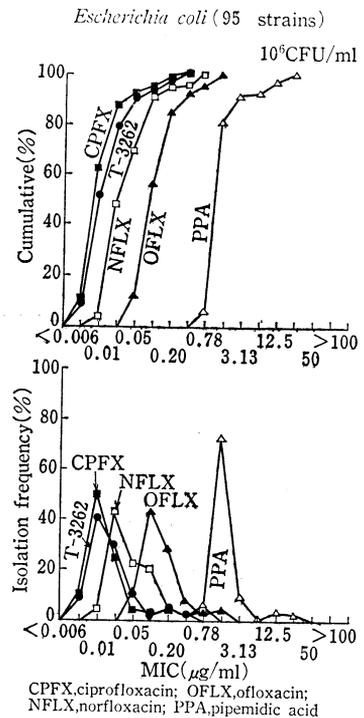


Fig. 9. Antibacterial activity of T-3262.

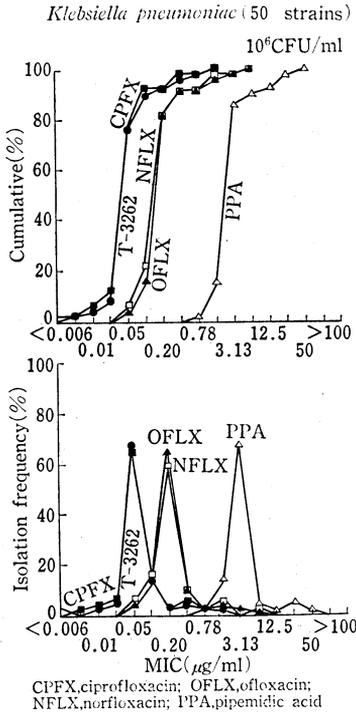


Fig. 10. Antibacterial activity of T-3262.

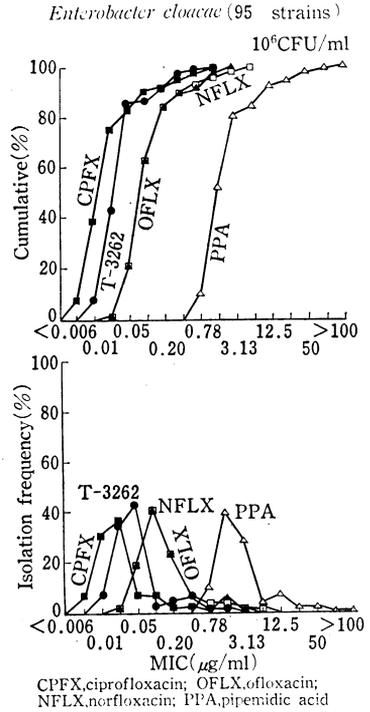


Fig. 12. Antibacterial activity of T-3262.

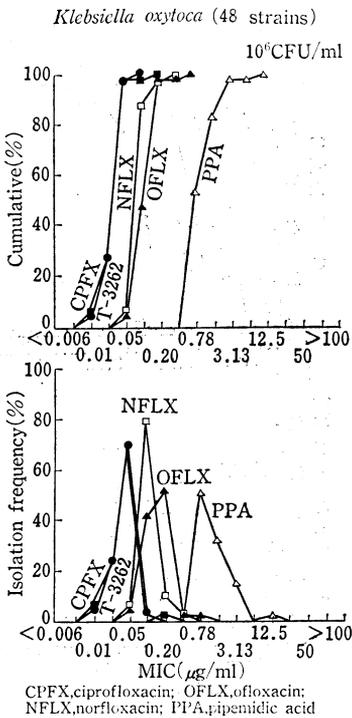


Fig. 11. Antibacterial activity of T-3262.

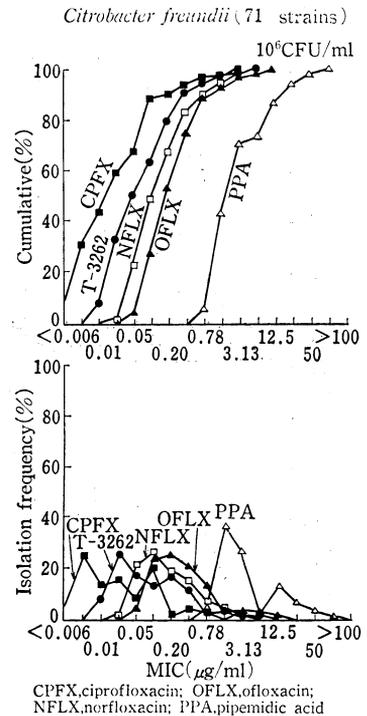


Fig. 13. Antibacterial activity of T-3262.

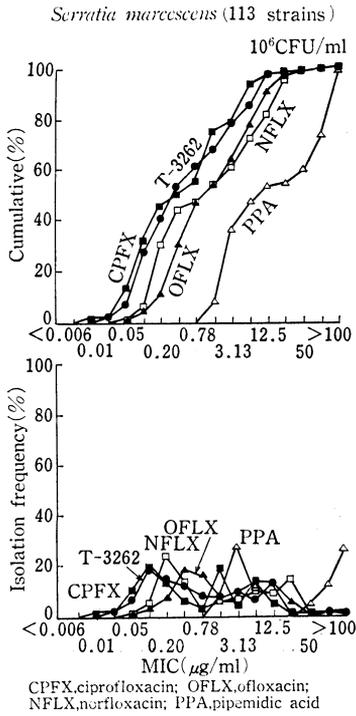


Fig. 14. Antibacterial activity of T-3262.

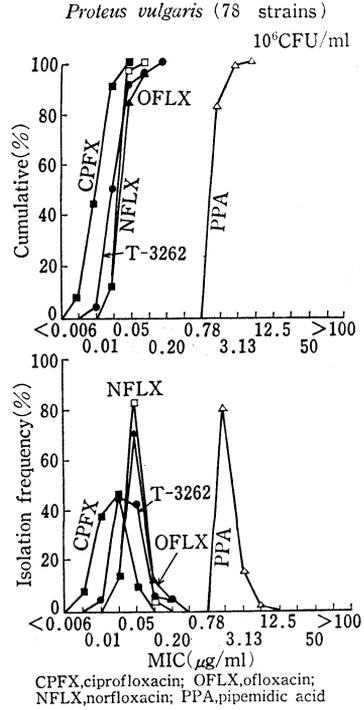


Fig. 16. Antibacterial activity of T-3262.

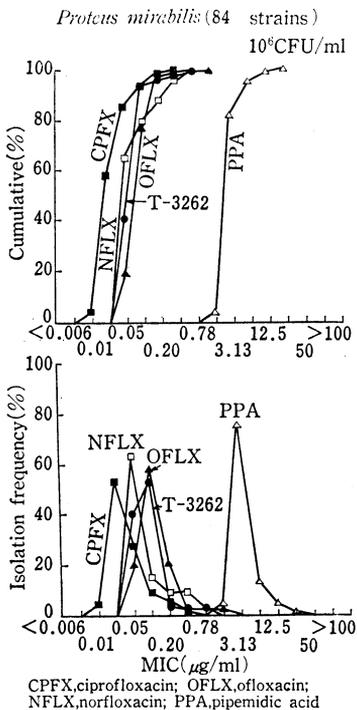


Fig. 15. Antibacterial activity of T-3262.

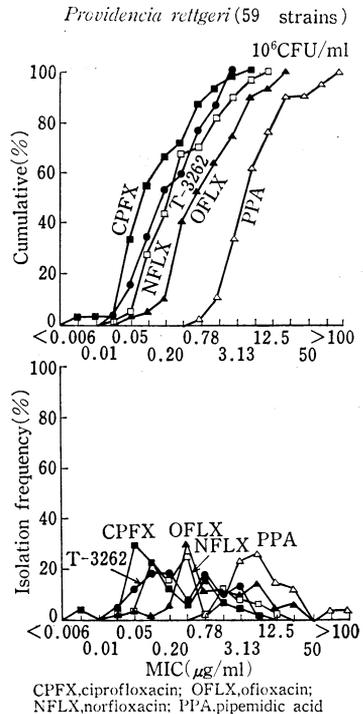


Fig. 17. Antibacterial activity of T-3262.

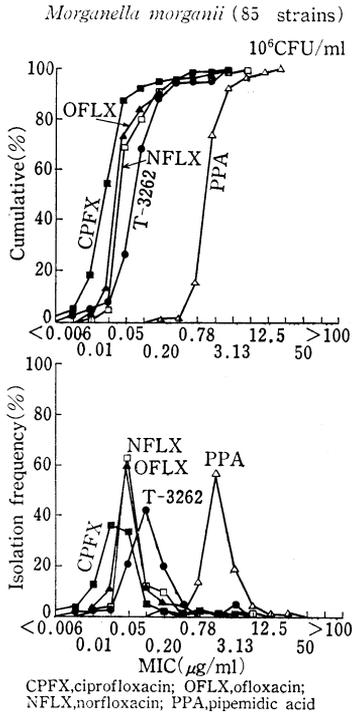


Fig. 18. Antibacterial activity of T-3262.

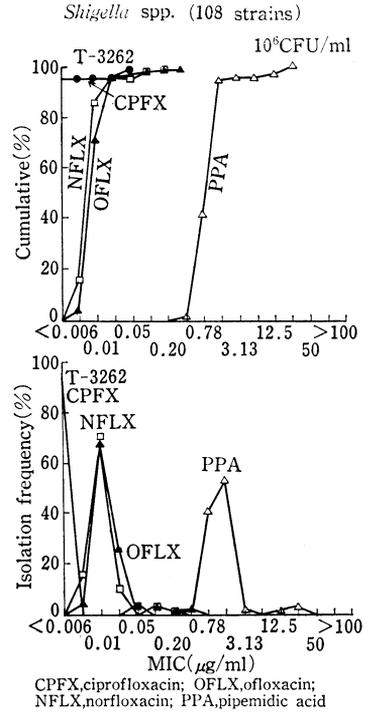


Fig. 20. Antibacterial activity of T-3262.

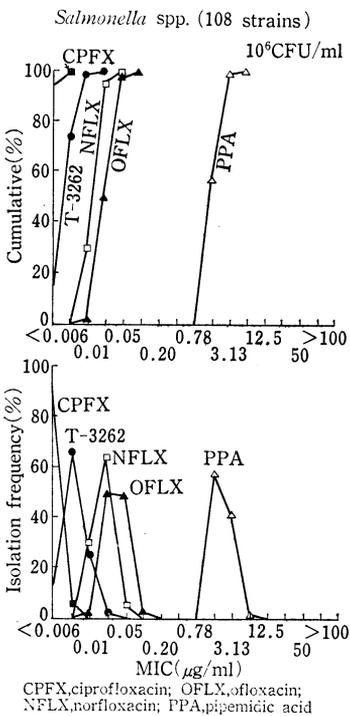


Fig. 19. Antibacterial activity of T-3262.

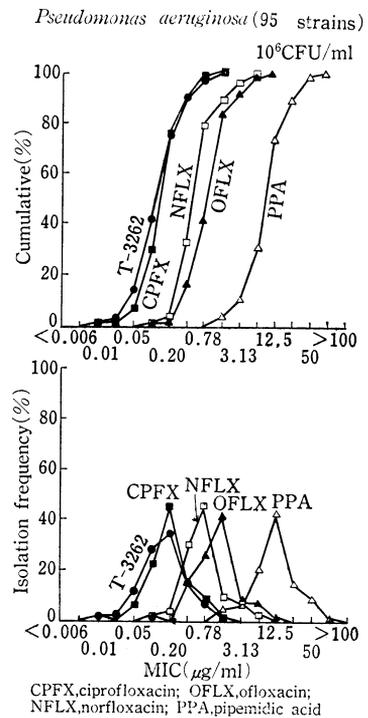


Fig. 21. Antibacterial activity of T-3262.

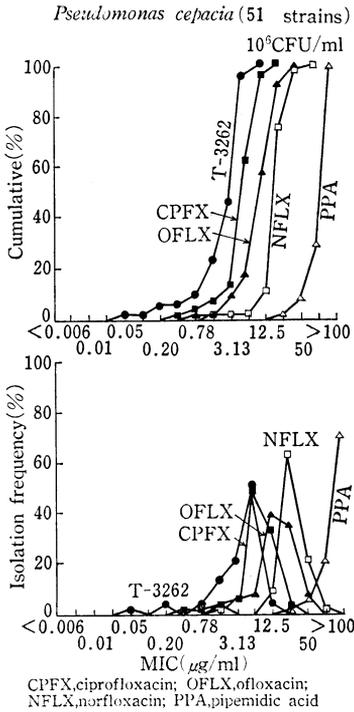


Fig. 22. Antibacterial activity of T-3262.

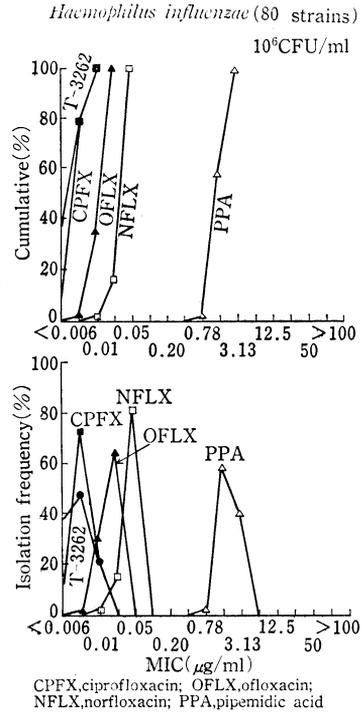


Fig. 24. Antibacterial activity of T-3262.

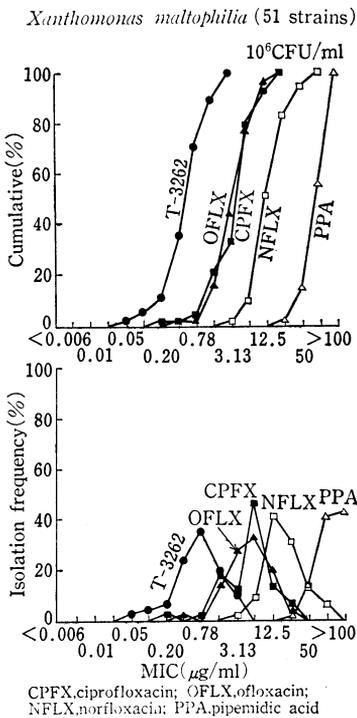


Fig. 23. Antibacterial activity of T-3262.

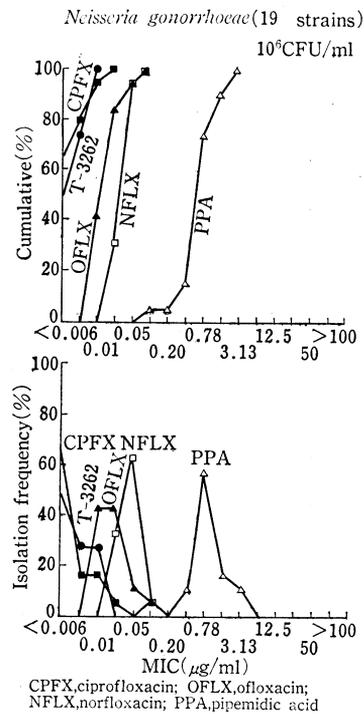


Fig. 25. Antibacterial activity of T-3262.

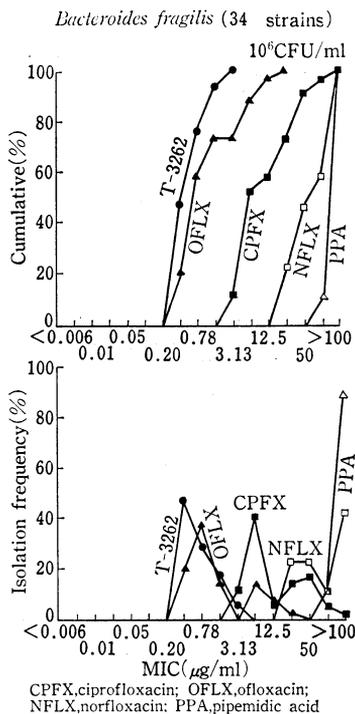


Fig. 26. Antibacterial activity of T-3262.

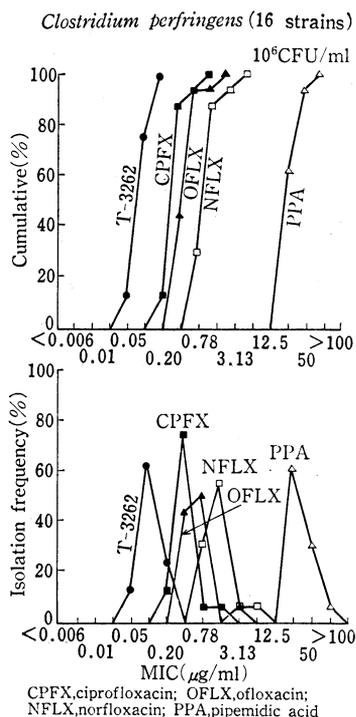


Fig. 28. Antibacterial activity of T-3262.

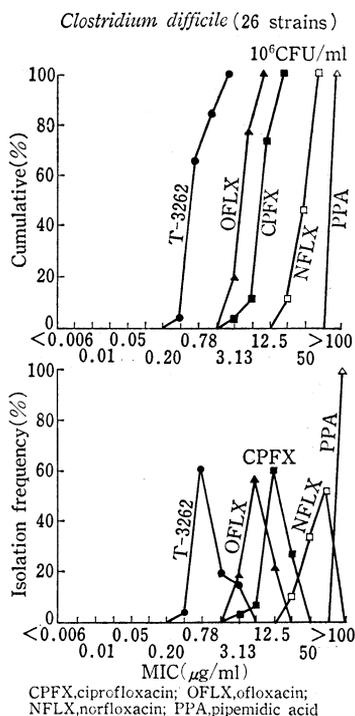


Fig. 27. Antibacterial activity of T-3262.

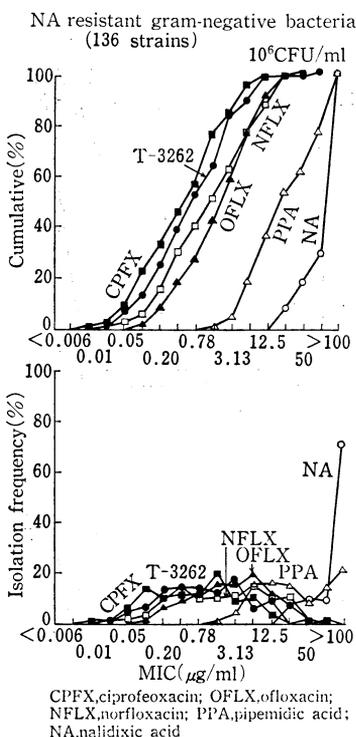


Fig. 29. Antibacterial activity of T-3262.

1~3 管, PPA より 4~7 管優れた値であった (Fig. 9~11)。 *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) 95 株, *Citrobacter freundii* (*C. freundii*) 71 株および *S. marcescens* 113 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.025~0.1 $\mu\text{g/ml}$ で比較的広い感受性分布を示し CPFX とほぼ同等あるいは若干劣るものの OFLX および NFLX より 1~2 管, PPA より 4~6 管優れた値であった (Fig. 12~14)。 *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) 84 株, *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*) 78 株, *Providencia rettgeri* (*P. rettgeri*) 59 株および *Morganella morganii* (*M. morganii*) 85 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.025~0.2 $\mu\text{g/ml}$ で CPFX より若干劣るものの OFLX および NFLX とほぼ同等で PPA より 4~6 管優れた値であった (Fig. 15~18)。

Salmonella spp. 108 株および *Shigella* spp. 108 株に対して T-3262 は 0.05 $\mu\text{g/ml}$ で全ての菌株の発育を阻止し CPFX とほぼ同等, OFLX および NFLX より 2 管程度, PPA より 9 管程度優れていた (Fig. 19, 20)。

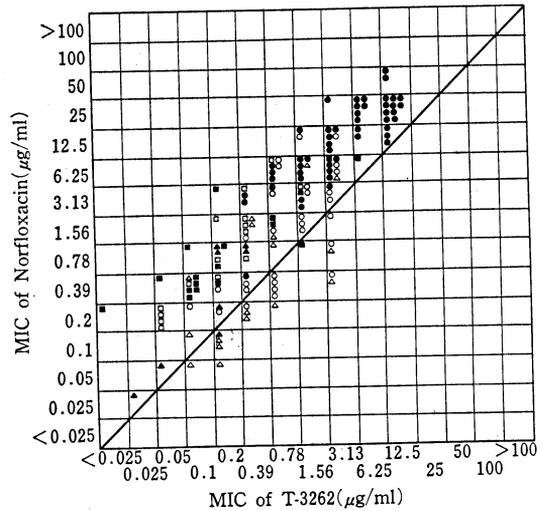
P. aeruginosa 95 株, *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*) 51 株および *Xanthomonas maltophilia* (*X. maltophilia*) 51 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.2~6.25 $\mu\text{g/ml}$ で CPFX, OFLX および NFLX より 1~4 管, PPA より 6~8 管優れた値であった (Fig. 21~23)。

H. influenzae 80 株に対して T-3262 は 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で全ての菌株の発育を阻止し, CPFX とほぼ同等, OFLX および NFLX より 2~3 管, PPA より 8 管程度優れていた (Fig. 24)。

N. gonorrhoeae 19 株に対しても T-3262 は 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で全ての菌株の発育を阻止し, CPFX とほぼ同等, OFLX および NFLX より 2~4 管, PPA より 8 管程度優れていた (Fig. 25)。

Bacteroides fragilis 34 株, *Clostridium difficile* 26 株および *Clostridium perfringens* 16 株に対する T-3262 の感受性ピークは 0.1~0.78 $\mu\text{g/ml}$ で CPFX, OFLX および NFLX より 1~7 管優れた値であった。 PPA のこれらの菌種に対する抗菌活性は弱かった (Fig. 26~28)。

NA の MIC 値が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示すグラム陰性菌 136 株 (*E. coli* 9 株, *K. pneumoniae* 4 株, *E. cloacae* 15 株, *C. freundii* 18 株, *S. marcescens* 49 株, *P. mirabilis* 5 株, *P. vulgaris* 1 株, *P. rettgeri* 29 株および *M. morganii* 6 株) に対し T-3262 は交叉耐性をほとんど示さず CPFX とほぼ同等, OFLX および NFLX より若干優れ, PPA より 5 管優れた抗菌活性を示した (Fig. 29)。



▲: *E. coli*, □: *E. cloacae*, ■: *C. freundii*, ●: *S. marcescens*, ○: *P. rettgeri*, △: other strains

Fig. 30. Correlation of MICs between T-3262 and norfloxacin against NA-resistant Gram-negative bacteria (136 strains).

また T-3262 と norfloxacin との MIC の相関を Fig. 30 に示したが, T-3262 はどの菌種においても norfloxacin とほぼ同等かあるいは優れた抗菌力を示した (Fig. 30)。

GM の MIC 値が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示すグラム陰性菌 87 株 (*K. oxytoca* 1 株, *E. cloacae* 15 株, *C. freundii* 1 株, *S. marcescens* 31 株, *P. mirabilis* 2 株, *P. vulgaris* 3 株, *P. rettgeri* 6 株, *M. morganii* 4 株および *P. aeruginosa* 24 株) に対し, T-3262 は CPFX とほぼ同等, OFLX および NFLX より 1~2 管, PPA より 6 管程度優れた抗菌活性を示した (Fig. 31)。

また T-3262 と norfloxacin との MIC の相関を Fig. 32 に示したが, T-3262 はどの菌種においても norfloxacin より優れた抗菌力を示した (Fig. 32)。

3. 殺菌作用

a) MIC と MBC

T-3262 の *S. aureus* SMITH, *E. coli* ML 4707, *P. aeruginosa* GN 11189 および *S. marcescens* GN 7577 に対する MIC と MBC を対照薬剤と比較検討し Table 2 に示した。 T-3262 はどの菌種においても MIC 値と MBC 値との間にほとんど差が認められなかった。接種菌量の影響については *S. marcescens* GN 7577 で若干認められたが, 他の菌種ではほとんど認められなかった。

b) 増殖曲線におよぼす影響

T-3262 の 4 菌種の増殖曲線におよぼす影響を対照薬

Table 2. Effect of inoculum size on the bactericidal activity of T-3262

Organism	Inoculum size (CFU/ml)	T-3262		Ciprofloxacin		Ofloxacin		Norfloxacin	
		MIC*	MBC*	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	1.3×10 ⁷	0.05	0.05	0.20	0.39	0.39	0.78	1.56	1.56
	1.3×10 ⁶	0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	1.56
	1.3×10 ⁵	0.0125	0.05	0.10	0.20	0.20	0.39	0.78	0.78
	1.3×10 ⁴	0.0125	0.025	0.10	0.10	0.10	0.20	0.39	0.78
<i>Escherichia coli</i> ML4707	1.1×10 ⁷	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.10	0.20	0.10	0.20
	1.1×10 ⁶	0.006	0.0125	0.0125	0.0125	0.05	0.05	0.05	0.05
	1.1×10 ⁵	0.006	0.0125	0.0125	0.0125	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN11189	1.4×10 ⁷	1.56	3.13	0.78	1.56	6.25	12.5	3.13	6.25
	1.4×10 ⁶	0.78	1.56	0.78	1.56	6.25	6.25	3.13	6.25
	1.4×10 ⁵	0.39	0.78	0.20	0.39	3.13	3.13	1.56	3.13
<i>Serratia marcescens</i> GN7577	2.3×10 ⁷	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5
	2.3×10 ⁶	1.56	1.56	1.56	1.56	6.25	6.25	6.25	12.5
	2.3×10 ⁵	0.78	1.56	0.78	0.78	3.13	3.13	3.13	6.25
	2.3×10 ⁴	0.39	0.78	0.39	0.39	1.56	1.56	1.56	3.13

* μg/ml

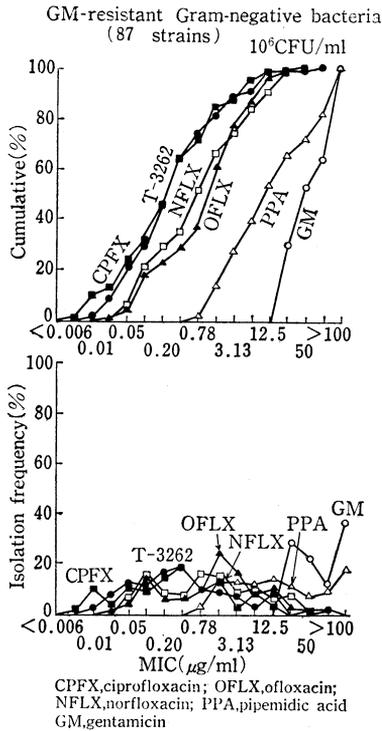


Fig. 31. Antibacterial activity of T-3262.

剤と比較検討した。*S. aureus* SMITH に対しては 4 薬剤とも MIC 濃度以上で殺菌的に作用したが、それ以下の濃度では静菌的な作用であった (Fig. 33)。*E. coli* ML 4707 に対しては 4 薬剤とも MIC 濃度で菌の発育を完全に阻止し、T-3262 および CPFX は 1/2 MIC 濃度で

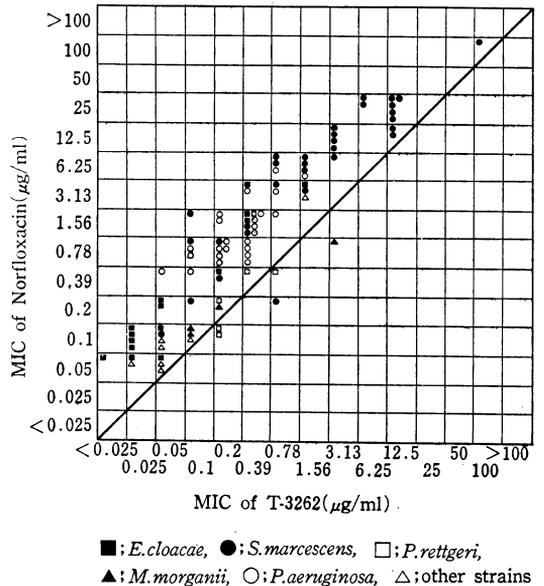


Fig. 32. Correlation of MICs between T-3262 and norfloxacin against GM-resistant Gram-negative bacteria (87 strains).

も殺菌的に作用した (Fig. 34)。*P. aeruginosa* GN 11189 に対して、T-3262 および OFLX は MIC 濃度で菌の発育を完全に阻止したが、CPFX および NFLX では 24 時間で菌の再増殖が認められた (Fig. 35)。*S. marcescens* GN 7577 に対しては 4 薬剤とも 1/2 MIC 濃度以上で殺菌的に作用したが 24 時間では 2 MIC 濃度でいずれの薬剤とも菌の再増殖が認められた (Fig. 36)。

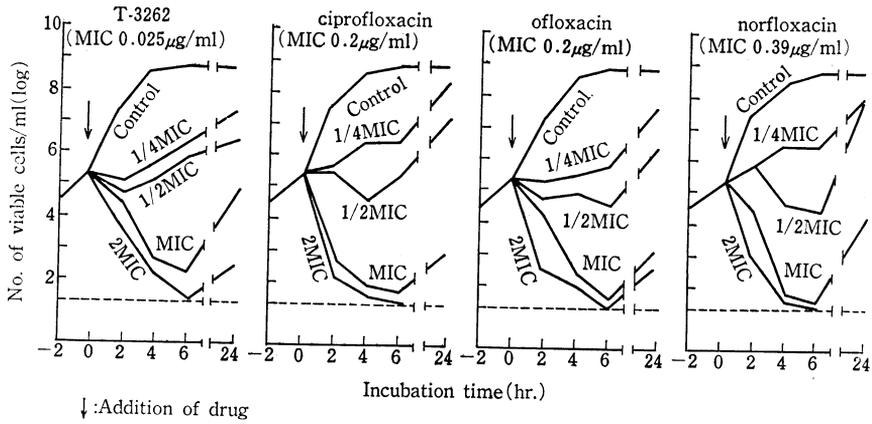


Fig. 33. Bactericidal activity of T-3262 against *Staphylococcus aureus* SMITH.

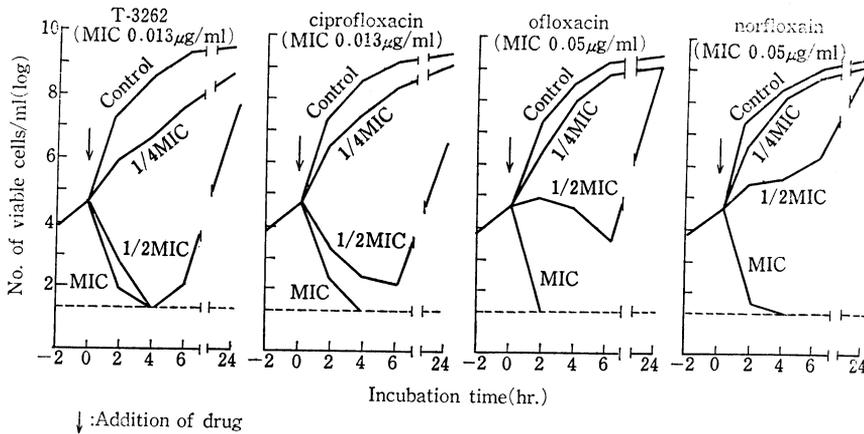


Fig. 34. Bactericidal activity of T-3262 against *Escherichia coli* ML 4707.

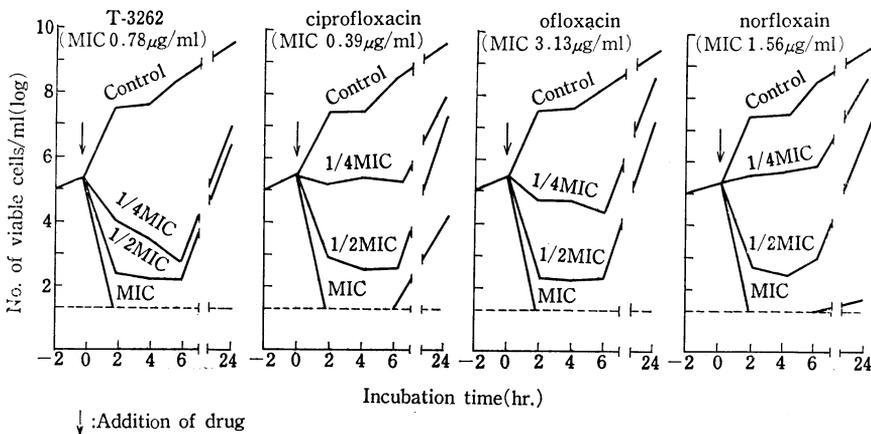


Fig. 35. Bactericidal activity of T-3262 against *Pseudomonas aeruginosa* GN 11189.

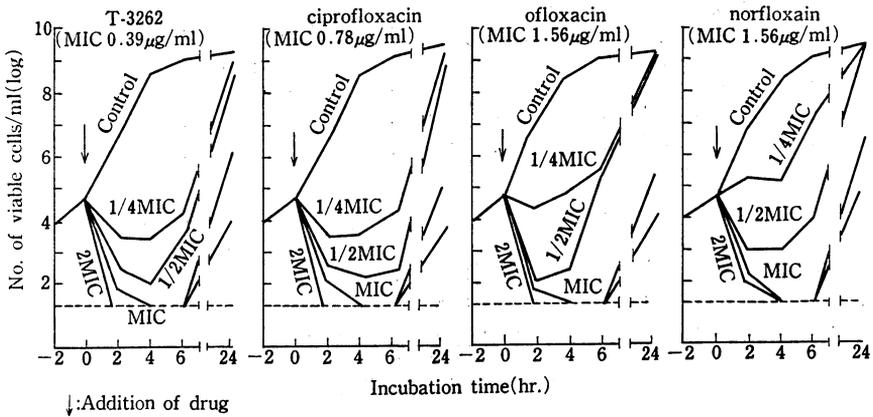


Fig. 36. Bactericidal activity of T-3262 against *Serratia marcescens* GN 7577.

Table 3. Frequency of spontaneous mutants resistant to T-3262

Organism	Compound	Selected concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Frequency
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	T-3262	2 MIC (0.025)	1.3×10^{-6}
		4 MIC (0.05)	$< 7.7 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	2 MIC (0.39)	6.2×10^{-7}
		4 MIC (0.78)	$< 7.7 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	2 MIC (0.39)	8.3×10^{-7}
		4 MIC (0.78)	$< 7.7 \times 10^{-9}$
	norfloxacin	2 MIC (0.78)	1.0×10^{-6}
		4 MIC (1.56)	3.4×10^{-7}
<i>Escherichia coli</i> ML 4707	T-3262	2 MIC (0.025)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	2 MIC (0.025)	4.6×10^{-8}
		4 MIC (0.05)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	2 MIC (0.10)	$< 1.1 \times 10^{-9}$
norfloxacin	2 MIC (0.10)	$< 1.1 \times 10^{-9}$	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN 11189	T-3262	2 MIC (1.56)	3.8×10^{-9}
		4 MIC (3.13)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
	ciprofloxacin	2 MIC (0.78)	2.7×10^{-8}
		4 MIC (1.56)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
	ofloxacin	2 MIC (6.25)	1.9×10^{-8}
		4 MIC (12.5)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
	norfloxacin	2 MIC (3.13)	3.6×10^{-8}
		4 MIC (6.25)	$< 1.3 \times 10^{-9}$
<i>Serratia marcescens</i> GN 7577	T-3262	4 MIC (3.13)	9.7×10^{-8}
	ciprofloxacin	4 MIC (3.13)	3.1×10^{-8}
	ofloxacin	4 MIC (6.25)	4.1×10^{-7}
	norfloxacin	4 MIC (6.25)	5.4×10^{-7}

4. 自然耐性菌出現頻度

T-3262 に対する自然耐性菌出現頻度を対照薬剤と比較検討し Table 3 に示した。*S. aureus* SMITH および

P. aeruginosa GN 11189 に対しては、4 薬剤とも 2 MIC 濃度で低頻度ながら耐性菌の出現が認められたが、4 MIC 濃度では、T-3262, CPFX および OFLX におい

Challenge dose (CFU/mouse)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ with 95% confidence limit (mg/kg)		
			1.0	10.0	100
1.1 \times 10 ⁷ (5% mucin)	T-3262	0.0125	1.65 (1.27-2.15)		
	CPFX	0.20	12.8 (9.45-17.3)		
	OFLX	0.20	10.4 (7.21-15.1)		
	NFLX	0.39	32.5 (16.5-103.9)		

Therapy: p.o. immediately after i.p. infection
ED₅₀: Probit method(n=10)

Fig. 37. Protective effect of T-3262 against *Staphylococcus aureus* SMITH-induced systemic infection in mice.

Challenge dose (CFU/mouse)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ with 95% confidence limit (mg/kg)		
			1.0	10.0	10.0
2.4 \times 10 ⁷	T-3262	0.0125	0.22 (0.16-0.30)		
	CPFX	0.0125	0.33 (0.23-0.48)		
	OFLX	0.05	0.61 (0.43-0.87)		
	NFLX	0.05	2.77 (2.06-3.77)		

Therapy: p.o. immediately after i.p. infection
ED₅₀: Probit method(n=10)

Fig. 38. Protective effect of T-3262 against *Escherichia coli* ML 4707-induced systemic infection in mice.

Table 4. Inhibitory effect of pyridone-carboxylic acids on DNA gyrase supercoiling activity

Compound	<i>Escherichia coli</i> KL-16	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
T-3262	0.025	0.20
Ciprofloxacin	0.025	0.29
Ofloxacin	0.10	0.36
Norfloxacin	0.10	0.43

ては耐性菌の出現は認められなかった。*E. coli* ML 4707 に対しては CPFX だけに 2 MIC 濃度で耐性菌の出現が認められたが、他の薬剤では耐性菌の出現は認められなかった。*S. marcescens* GN 7577 に対しては、4 薬剤とも 4 MIC 濃度でも低頻度ながら耐性菌の出現が認められた。

5. *E. coli* DNA gyrase に対する阻害作用

T-3262 の gyrase に対する阻害作用を対照薬剤と比較検討し Table 4 に示した。T-3262, CPFX, OFLX および NFLX の supercoil 反応に対する ID₅₀ 値は各々 0.20, 0.29, 0.36 および 0.43 $\mu\text{g/ml}$ で T-3262 は gyrase 活性を最も強く阻害した。

6. マウス実験的感染症に対する T-3262 の治療効果
マウス実験的感染症に対する T-3262 の治療効果を対照薬剤と比較検討し Fig. 37~40 に示した。*S. aureus* SMITH に対する T-3262 の ED₅₀ 値は 1.65 mg/kg で OFLX より 6 倍、NFLX より約 20 倍優れた値を示した。*E. coli* ML 4707 および *P. aeruginosa* GN 11189 に対する T-3262 の ED₅₀ 値は 0.22 および 10.1 mg/kg で CPFX とほぼ同等、OFLX および NFLX より 2~12 倍優れた値を示した。*S. marcescens* GN 7577 に対する T-3262 の ED₅₀ 値は 25.1 mg/kg で CPFX および OFLX とほぼ同等か若干劣る値であった。

Challenge dose (CFU/mouse)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ with 95% confidence limit (mg/kg)		
			1.0	10.0	100
2.9 × 10 ⁵ (5 %mucin)	T-3262	0.78		10.1 (7.66-13.4)	
	CPFEX	0.39		9.48 (7.27-12.3)	
	OFLX	3.13			24.0 (16.2-36.8)
	NFLX	1.56			70.7 (53.2-94.9)

Therapy : p.o. immediately after i.p. infection
ED₅₀ : Probit method(n=10)

Fig. 39. Protective effect of T-3262 against *Pseudomonas aeruginosa* GN 11189-induced systemic infection in mice.

Challenge dose (CFU/mouse)	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ with 95% confidence limit (mg/kg)		
			1.0	10.0	100
9.0 × 10 ⁴ (5 %mucin)	T-3262	0.78		25.1 (18.6-35.7)	
	CPFEX	0.78		13.0 (9.10-19.2)	
	OFLX	1.56		19.5 (13.4-31.0)	
	NFLX	1.56			57.6 (44.6-75.2)

Therapy : p.o. immediately after i.p. infection
ED₅₀ : Probit method(n=10)

Fig. 40. Protective effect of T-3262 against *Serratia marcescens* GN 7577-induced systemic infection in mice.

III. 考 察

ピリドンカルボン酸系抗菌剤として比較的新しく合成された CPFEX, OFLX および NFLX 等は, グラム陽性菌およびグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌活性を持つことが知られている⁵⁻⁷⁾. この度, 新規に合成された T-3262 の抗菌活性を CPFEX, OFLX, NFLX および PPA を対照薬剤として比較検討した.

T-3262 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌活性を有していた. 特にグラム陽性球菌の Staphylococci, Streptococci に対し OFLX に比べて格段に優れた抗菌力を持つことが大きな特徴である. また T-3262 は *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* および *N. gonorrhoeae* に対して CPFEX とほぼ同等の抗菌活性を有し, OFLX および NFLX よりも優れた活性を示した. さらに *X. maltophilia* および *P. cepacia* 等ブドウ糖非発酵菌群

および嫌気性菌に対しても T-3262 は最も優れた抗菌活性を有していた. また NA 耐性菌および GM 耐性菌に対しても T-3262 は優れた抗菌活性を示した.

T-3262 の MIC 値と MBC 値にはほとんど差は認められず, 増殖曲線におよぼす影響からも殺菌的であることが示された. また自然耐性菌出現頻度も非常に少なかった. これらの特徴は NFLX 以降のピリドンカルボン酸系抗菌剤に共通のものであった.

NA および oxolinic acid 以後, 新規に合成されたピリドンカルボン酸系抗菌剤の強力な殺菌作用は DNA gyrase 活性の阻害⁸⁾ およびその良好な菌体透過性にあるといわれている⁹⁾. T-3262 は対照薬剤と比較して最も強く DNA gyrase の supercoil 反応を阻害し, 強い抗菌活性を有することから, 従来のピリドンカルボン酸系抗菌剤と同様の作用機作を持つものと考えられる.

マウス実験的感染症における T-3262 の治療効果はグ

ラム陽性菌の *S. aureus* SMITH においては対照薬剤よりはるかに優れていた。これは T-3262 が OFLX に比べて経口吸収性は劣るものの¹⁰強力な殺菌力を反映したものであろうと思われる。T-3262 がグラム陽性菌に対して *in vitro* および *in vivo* において対照薬剤よりも非常に優れた抗菌力および治療効果を有するという点は注目に値すると思われる。また、グラム陰性菌の *E. coli* ML 4707, *P. aeruginosa* GN 11189 および *S. marcescens* GN 7577 に対して、T-3262 は CPFX とほぼ同等の優れた値を示した。

従来のピリドンカルボン酸系抗菌剤の適応が尿路感染症および腸管感染症に限られていたのに対し、OFLX および NFLX などの新しい同系薬剤は表在性軟部組織感染症、上気道感染症および呼吸器感染症までその適応範囲を拡大し得た。T-3262 も *in vitro* で示した幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌活性に加えて *in vivo* においてもグラム陽性菌およびグラム陰性菌の感染に対して優れた治療効果が認められた。このことから T-3262 は上記感染症に対しても十分な効果が期待できるものと思われる。

このように T-3262 は優れた抗菌力を有する合成抗菌剤であり、今後臨床への応用が期待される薬剤である。

文 献

- 1) 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 : 76~79, 1981
- 2) 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 : 559~560, 1979
- 3) GELLERT M, MIZUUCHI K O', DEA M H, NASH H A : DNA gyrase : An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc Natl Acad Sci USA 73 : 3872~3876, 1976

- 4) MILLER L C, TAINTER M L : Estimation of the ED₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. Proc Exp Biol Med 57 : 261~264, 1944
- 5) WISE R, ANDREWS J M, EDWARDS L J : *In vitro* activity of Bay o 9867, a new quinolone derivative, compared with those of other antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 23 : 559~564, 1983
- 6) SATO K, MASTUURA Y, INOUE M, UNE T, OSADA Y, OGAWA H, MITSUHASHI S : *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. Antimicrob Agents Chemother 22 : 548~553, 1982
- 7) ITO A, HIRAI K, INOUE M, KOGA H, SUZUE S, IRIKURA T, MITSUHASHI S : *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. Antimicrob Agents Chemother 77 : 103~108, 1980
- 8) SATO K, INOUE Y, YAMASHITA S, INOUE M, MITSUHASHI S : Inhibitory effects of ofloxacin and other new pyridone carboxylic acids on the activities of DNA gyrase isolated from *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacteroides fragilis*. p. 21~25. Ofloxacin : A new quinolone antibacterial agent. In MITSUHASHI S, DAIKOS G K (ed) Proceeding of the 14 th International Congress of Chemotherapy. University of Tokyo Press, 1986
- 9) HIRAI K, AOYAMA H, IRIKURA T, IYOBE S, MITSUHASHI S : Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 29 : 535~538, 1986
- 10) 第 34 回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム。T-3262, 1987

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF T-3262

KAZUO FUJIMAKI, TOSHIHIKO NOUMI, YOUKO HAMANA
and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute
2220 Kogure, Fujimimura, Seta-gun, Gunma 371-01, Japan

MATSUHISA INOUE

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of Medicine,
Gunma University

We compared the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-3262, a new fluoroquinolone, with those of ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin and pipemidic acid.

1. T-3262 showed a broad spectrum of antibacterial activity against Gram-positive and negative bacteria.
2. T-3262 had stronger antibacterial activity against Gram-positive cocci, non-fermentive Gram negative rods and obligate anaerobes than ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin and pipemidic acid.
3. Nalidixic acid-resistant and gentamicin-resistant *Enterobacteriaceae* were susceptible to T-3262.
4. T-3262 displayed bactericidal action at its minimal inhibitory concentration against various species of bacteria.
5. The frequency of spontaneous resistant mutants was very low.
6. T-3262 showed the strongest inhibitory activity against supercoiling of DNA gyrase.
7. The protective effect of T-3262 against systemic infection in mice with *Staphylococcus aureus* was about one sixth that of ofloxacin and about one twentieth that of norfloxacin.