

新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の 実験的感染症に対する治療効果

保田 隆・渡辺 泰雄・四辻 彰・池田 靖
満山 順一・西田 亨子・堀 りつ子・春日千恵子
富山化学工業株式会社総合研究所*

マウスを用いた各種感染モデルを作製し、これらに対する T-3262 の治療効果を norfloxacin (NFLX) および ofloxacin (OFLX) と比較検討した結果、以下の成績が得られた。

1) Cyclophosphamide または azathioprine 投与で、あらかじめ免疫を低下させたマウスを用いた全身感染に対する T-3262 の治療効果は、*Escherichia coli* TK-16 感染に対しては対照薬剤より優れ、*Klebsiella pneumoniae* Y-41 感染に対しては OFLX とほぼ同等で、NFLX よりは優れていた。

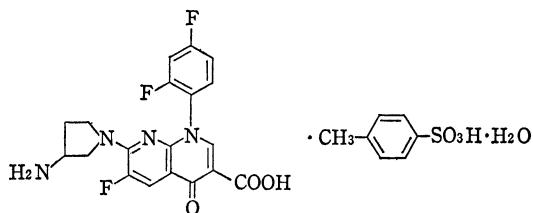
2) マウス尿路感染に対する T-3262 の治療効果は、*E. coli* 感染、*Serratia marcescens* 感染および *Proteus mirabilis* 感染に対して OFLX とほぼ同等で、NFLX よりは優れていた。

3) マウス肺感染に対する T-3262 の治療効果は *K. pneumoniae* Y-41 感染に対しては対照薬剤より優れ、*Pseudomonas aeruginosa* S-406 感染に対しては OFLX とほぼ同等、NFLX より優れていた。

4) *Staphylococcus aureus* F-230 で惹起したマウス皮下膿瘍に対する T-3262 の治療効果は対照薬剤より優れていた。

Key words : T-3262, ピリドンカルボン酸系抗菌剤, *in vivo* 抗菌力

T-3262 は富山化学工業(株)総合研究所で開発された 1,8-ナフチリジン環の 1,7 位にそれぞれ 2,4-ジフルオロフェニル基および 3-アミノピロリジニル基を有する新しいピリドンカルボン酸系抗菌剤である(Fig. 1)。T-3262 はグラム陽性菌をはじめグラム陰性菌、嫌気性菌に対し広範囲な抗菌スペクトラムを有し、特に *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. *Enterococcus* sp. などのグラム陽性菌、ブドウ糖非酸酵グラム陰性桿菌、*Peptostreptococcus* sp. *Bacteroides fragilis* に対して従来のピリドンカルボン酸系抗菌剤より強い抗菌力を示す。



(±)-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.

著者らは先に T-3262 の *in vivo* における有効性の検討としてマウス実験感染に対する治療効果について報告した¹⁾。今回 T-3262 について免疫低下時のマウス全身感染に対する治療効果、マウス尿路感染に対する治療効果、マウス肺炎に対する治療効果およびマウス皮下膿瘍に対する治療効果を norfloxacin²⁾ および ofloxacin³⁾ を対照薬剤として比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

T-3262 は当社総合研究所で合成されたものを使用した。対照薬剤として norfloxacin (NFLX : 杏林製薬) および ofloxacin (OFLX : 第一製薬) を用いた。また免疫抑制剤として cyclophosphamide (CP : 塩野義製薬) および azathioprine (AZ : 住友化学) を用いた。

2. 使用菌株

S. aureus F-230, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *E. coli* TK-16, *Klebsiella pneumoniae* Y-41, *Proteus mirabilis* T-111, *P. mirabilis* T-287, *Serratia marcescens* IID 620, *S. marcescens* W-196 および *Pseudomonas aeruginosa* S-406 を用いた。各菌は Heart infusion agar (HIA : 栄研) 上で 1 夜培養した後、菌

体をかき取り生理食塩液に懸濁浮遊させて用いた。

3. 使用動物

マウスは SLC/ICR 系，雄または雌，4 週齢または 5 週齢，1 群 5～16 匹を用いた。

4. 抗菌力測定

日本化学療法学会最小発育阻止濃度（MIC）測定法⁴⁾に従って抗菌力を測定した。なお感受性測定用培地には Müller-Hinton agar（MHA：栄研）を用いた。

5. マウス全身感染

感染菌は 5% gastric mucin(半井化学薬品)に懸濁し腹腔内接種した。なお *E. coli* TK-16 は生理食塩液に懸濁して用いた。免疫低下マウスの作製には CP または AZ を用いた。CP を用いる場合は 1 mg/mouse を 1 回腹腔内に投与し，4 日後に菌の接種を行ない，また AZ を用いる場合は 2 mg/mouse を 4 日間経口投与し最終投与翌日に菌の接種を行なった。薬剤は感染 1 時間後におおの 1 回経口投与した。治療効果は感染 7 日後の生存匹数から LITCHFIELD WILCOXON 法⁵⁾により算出した ED 50 (mg/mouse) 値で示した。

6. マウス尿路感染⁶⁾

マウス尿道口から膀胱へ直接菌液を 0.1 ml 注入し，クレンメにて 4 時間尿道口を閉鎖し感染させた。薬剤は感染翌日から 1 日 5 mg/kg 2 回 3 日間経口投与した。治療効果は最終投与翌日の腎内生菌数を測定して判定した。なお腎内生菌数はマウスの腎臓を摘出し生理食塩液を加えてホモジナイズ後，平板塗抹法にて測定した。

7. マウス肺炎⁷⁾

マウス肺炎はネブライザーを用いる噴霧感染で作製した。感染菌として *P. aeruginosa* を用いた場合のマウ

スには CP 250 mg/kg を 1 回腹腔内に投与し，5 日後に感染させた。薬剤は感染 4 時間後に初回投与を行なった後，1 日 0.1 または 1 mg/mouse 2 回 3 日間合計 6 回経口投与した。治療効果は治療開始後 8 日目の生存率および肺内生菌数の消失率で判定した。なお肺内生菌数はマウスの肺を摘出し生理食塩液を加えてホモジナイズ後，平板塗抹法にて測定した。

8. マウス皮下膿瘍⁸⁾

マウス皮下膿瘍は *S. aureus* F-230 の菌液を 0.1 ml 背部皮下に接種することで惹起し，薬剤は感染 1 時間後に 1 回経口投与した。治療効果は感染翌日にマウス背部皮膚をはがし，膿瘍の長径とこれに直交する径をノギスで計測して，両者の積を膿瘍面積とし，無治療群の膿瘍面積を 100% とした時の薬剤投与群の膿瘍面積を百分率で表わした。

II. 実験結果

1. 免疫低下時のマウス全身感染に対する治療効果

CP 投与または AZ 投与であらかじめ免疫を低下させたマウスを用いた全身感染に対する T-3262 の治療効果を NFLX および OFLX と比較し，その結果を Table 1, Table 2 に示した。

E. coli TK-16 感染に対し T-3262 の ED 50 値は非投与群で 0.0027 mg/mouse，CP 投与群および AZ 投与群で 0.0051 mg/mouse というずれの群においても NFLX および OFLX より優れた治療効果を示した。

K. pneumoniae Y-41 感染に対し T-3262 の ED 50 値は非投与群で 0.20 mg/mouse，CP 投与群で 0.22 mg/mouse，AZ 投与群で 0.42 mg/mouse で OFLX とほぼ同等で NFLX より優れた治療効果を示した。

Table 1. *In vivo* antibacterial activity of T-3262, NFLX and OFLX against systemic infection in mice caused by *Escherichia coli* TK-16

Drug	MIC (μg/ml)		ED ₅₀ (mg/mouse) (95% confidence limit)		
	10 ⁶ (cells/ml)	10 ⁸ (cells/ml)	CP ^{a)}	AZ ^{b)}	Normal
T-3262	0.00625	0.025	0.0051 (0.0036—0.0071)	0.0051 (0.0036—0.0073)	0.0027 (0.0021—0.0035)
NFLX	0.025	0.05	0.064 (0.041—0.099)	0.056 (0.040—0.079)	0.035 (0.028—0.043)
OFLX	0.025	0.05	0.011 (0.0080—0.015)	0.013 (0.0094—0.018)	0.0092 (0.0072—0.012)

Strain : *Escherichia coli* TK-16
Challenge dose : a) 1.1×10⁷ cells/mouse i.p. infection at 4th day after i.p. administration of 5mg/mouse×1 day cyclophosphamide (CP)
b) 1.1×10⁷ cells/mouse i.p. infection at 1st day after p.o. administration of 2mg/mouse×4 days azathioprine (AZ)
Therapy : Oral administration at 1h after i.p. infection
Animal : SLC/ICR strain mice, 20±1g, ♂, 10 mice/group
Calculation of ED₅₀ : LITCHFIELD WILCOXON method

Table 2. *In vivo* antibacterial activity of T-3262, NFLX and OFLX against systemic infection in mice caused by *Klebsiella pneumoniae* Y-41

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ (mg/mouse) (95% confidence limit)		
	10 ⁶ (cells/ml)	10 ⁸ (cells/ml)	CP ^{a)}	AZ ^{b)}	Normal
T-3262	0.1	0.2	0.22 (0.17—0.28)	0.42 (0.33—0.53)	0.20 (0.14—0.29)
NFLX	0.1	0.2	2.05 (1.45—2.89)	5.00 (3.47—7.20)	1.96 (1.37—2.80)
OFLX	0.2	0.39	0.27 (0.20—0.37)	0.45 (0.33—0.61)	0.23 (0.17—0.30)

Strain : *Klebsiella pneumoniae* Y-41Challenge dose : a) 1.9×10^3 cells/mouse i.p. infection at 4th day after i.p. administration of 5mg/mouse \times 1 day cyclophosphamide (CP)b) 1.9×10^3 cells/mouse i.p. infection at 1st day after p.o. administration of 2mg/mouse \times 4 days azathioprine (AZ)

Therapy : Oral administration at 1h after i.p. infection

Animal : SLC/ICR strain mice, 20 ± 1 g, ♂, 10 mice/groupCalculation of ED₅₀ : LITCHFIELD WILCOXON method

2. マウス尿路感染に対する治療効果

マウス尿路感染に対する T-3262 の治療効果を NFLX および OFLX と比較し、その結果を Fig. 2 に示した。

E. coli NIHJ JC-2 および *E. coli* TK-16 感染の場合の腎内生菌数は無治療群では 3.2×10^8 および 3.6×10^5 cells/kidney であった。T-3262 治療群では 5.5×10^3 および 1.1×10^2 cells/kidney に減少し、OFLX とほぼ同等で NFLX より優れていた。

S. marcescens IID 620 および *S. marcescens* W-196 感染の場合の腎内生菌数は無治療群では 1.9×10^8 および 1.0×10^7 cells/kidney であった。T-3262 治療群では 2.1×10^3 および 2.0×10^4 cells/kidney に減少し、OFLX とほぼ同等で NFLX より優れていた。

P. mirabilis T-111 および *P. mirabilis* T-287 感染の場合の腎内生菌数は、無治療群では 5.6×10^6 および 9.1×10^6 cells/kidney であった。T-3262 治療群では 1.1×10^4 および 1.9×10^4 に減少し対照薬剤とほぼ同等の治療効果を示した。

3. マウス肺炎に対する治療効果

マウス肺炎に対する T-3262 の治療効果を NFLX および OFLX と比較し、その結果を Table 3, Table 4 に示した。

K. pneumoniae Y-41 感染に対し 1 mg/mouse 連投群の T-3262 の生存率は 100%, 肺内生菌数の消失率は 80% と対照薬剤より優れていた。また 0.1 mg/mouse 連投群でも T-3262 の生存率は 90%, 肺内生菌数の消

Table 3. Therapeutic effect of T-3262, NFLX and OFLX on experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* Y-41

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Dose (mg/mouse) \times No. of doses	Survival (%)	Eradication (%) bacterial negative/total
Control	—	—	0	0
T-3262	0.1	0.1×6	90	50
		1.0×6	100	80
NFLX	0.1	0.1×6	10	0
		1.0×6	60	0
OFLX	0.2	0.1×6	70	0
		1.0×6	80	20

Challenge dose ; 1.0×10^5 cells/lung

Animal ; 4 week old SLC/ICR ♂ strain mice were used.

Therapy ; Therapy was started 4h after infection, and drugs were administered po 2 times/day.

MIC ; Inoculum size, 1 loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)

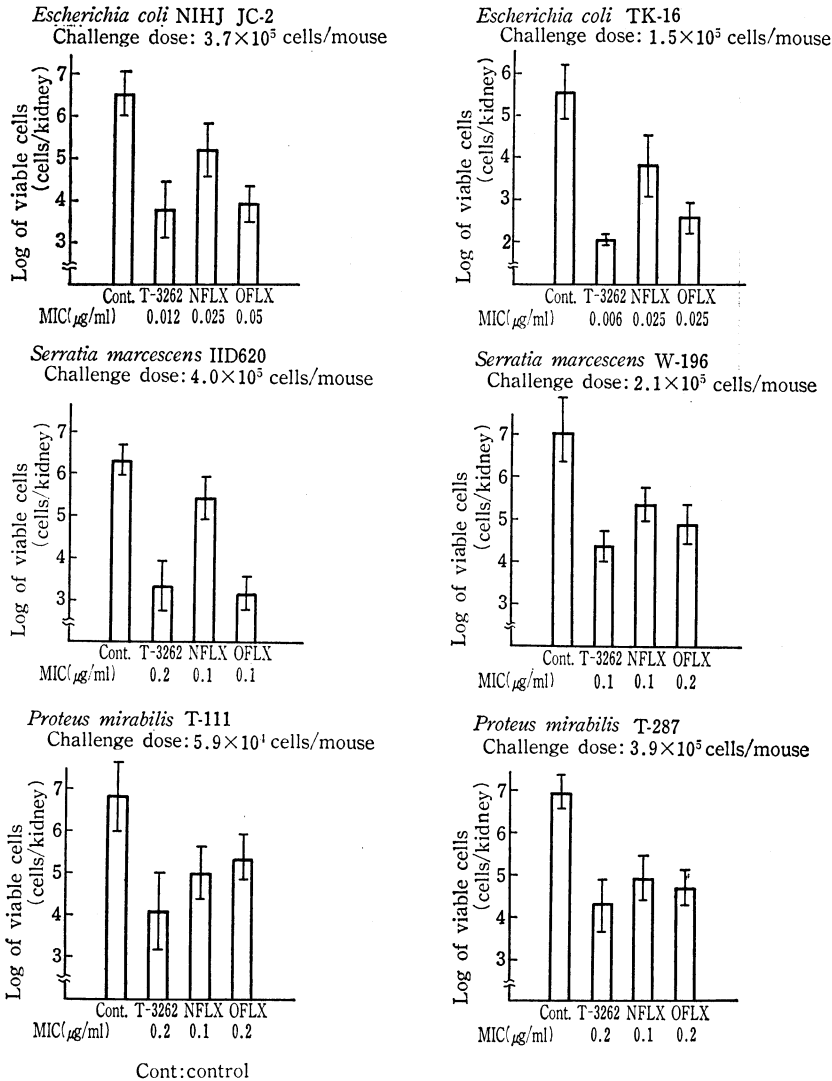


Fig. 2. Therapeutic effect of T-3262, NFLX and OFLX on experimental urinary tract infection in mice.

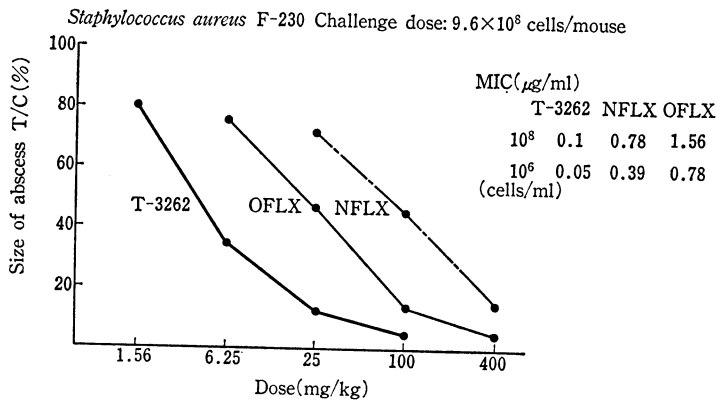


Fig. 3. Therapeutic effect on experimental subcutaneous abscess infection in mice.

Table 4. Therapeutic effect of T-3262, NFLX and OFLX on experimental pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* S-406

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Dose (mg/mouse) ×No. of doses	Survival (%)	Eradication (%) bacterial negative/total
Control	—	—	0	0
T-3262	0.1	0.1×6	40	40
		1.0×6	100	100
NFLX	0.78	0.1×6	0	0
		1.0×6	20	20
OFLX	0.78	0.1×6	30	30
		1.0×6	100	100

Challenge dose ; 3.2×10^5 cells/lung

Animal ; 5 week old SLC/ICR strain mice, pre-treated with 250 mg/kg of cyclophosphamide 5 days before infection were used.

Therapy ; Therapy was started 4h after infection, and drugs were administered po 2 times/day.

MIC ; Inoculum size, 1 loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)

失率は 50% と対照薬剤より優れていた。

P. aeruginosa S-406 感染に対し T-3262 の 1 mg/mouse および 0.1 mg/mouse 連投群の生存率は 100% および 40%, 肺内生菌数の消失率は 100% および 40% と OFLX とほぼ同等で NFLX より優れていた。

4. マウス皮下膿瘍に対する治療効果

マウス皮下膿瘍に対する T-3262 の治療効果を NFLX および OFLX と比較し、その結果を Fig. 3 に示した。

S. aureus F-230 9.6×10^8 cells/mouse 接種後、各薬剤で治療すると、いずれの薬剤においても用量感応的な膿瘍面積の減少が見られ、その中で T-3262 の治療効果はいずれの用量においても最も優れていた。

III. 考 察

近年ピリドンカルボン酸系抗菌剤の開発はめざましく、最近では NFLX²⁾, OFLX³⁾, enoxacin (ENX)⁴⁾ が臨床応用されている。これらの薬剤は従来の同系薬剤である nalidixic acid (NA), piromidic acid (PA), pipemidic acid (PPA) と比較してグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を示すことに加え、グラム陽性菌にも強い抗菌力を示す。T-3262 はグラム陽性菌をはじめグラム陰性菌、嫌気性菌に対し広範囲な抗菌スペクトラムを有し、強い抗菌力を示す新しいピリドンカルボン酸系抗菌剤である。この T-3262 の *in vitro* における優れた抗菌作用が臨床にいかん反映されるかを予測するため種々の実験感染系を用いて検討した。

すなわち CP 投与や AZ 投与で免疫を低下させたマウス全身感染に対し、T-3262 は OFLX とほぼ同等の治療効果を示した。このことは、近年注目を集めている Compromised host への適応を考える上で興味深い。

次に T-3262 は局所感染系であるマウス尿路感染症に対しても優れた治療効果を示した。また *P. aeruginosa* 性マウス肺炎に対しても T-3262 は OFLX と同等 NFLX より優れた治療効果を示し、さらに *S. aureus* 性マウス皮下膿瘍に対しては OFLX, NFLX より優れた治療効果を示した。*P. aeruginosa* や *S. aureus* は OFLX や NFLX でも臨床上有効率がやや劣る菌種であり^{10,11)}, これらに T-3262 が優れた効果を示したことは T-3262 の臨床応用を予測する上で注目される。

T-3262 の種々の実験感染系での優れた治療効果は、その幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力と同時に、その各組織への広くかつ良好な移行によるためと考えられる¹²⁾。今後さらに各種感染モデルについて T-3262 の治療効果を検討し、臨床応用領域の拡大の可能性について追求する予定である。

謝 辞

稿を終るにあたり本研究に御指導を賜った研究開発本部長才川 勇博士に深謝致します。

文 献

- 1) 保田 隆, 渡辺泰雄, 四辻 彰, 林 敏雄, 南新三郎, 岡本世紀, 山城芳子, 荒木春美, 伊東優子, 本村桂子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の細菌学的評価。Chemotherapy 36 (S-9): 95~109, 1988
- 2) 伊藤 明, 平井敬二, 井上松久, 三橋 進: AM-715 に関する細菌学的検討。Chemotherapy 29 (S-4): 1~11, 1981
- 3) 佐藤謙一, 井上松久, 三橋 進: DL-8280 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性評価。Chemotherapy 32(S-1): 1~12, 1984
- 4) 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(1): 76~79, 1981
- 5) LITCHFIELD J T, WILCOXON F: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Therap 96: 99~113, 1949
 - 6) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島達智子: 各種グラム陰性桿菌による実験的尿路感染症に関する基礎的研究。Chemotherapy 30: 1237~1249, 1982
 - 7) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武 毅, 穴戸春美, 鈴木 實, 野口行雄, 玉置公俊, 羅 士易, 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。日胸疾会誌 16: 581~587, 1978
 - 8) 相川 清, 和田みづる: マウスのブドウ球菌皮下膿瘍の erythromycin による治療効果に影響を及ぼす因子について。Chemotherapy 21: 1203~1207, 1973
 - 9) 河野 薫, 井上松久, 三橋 進: ビリドンカルボン酸系合成抗菌剤 AT-2266 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 32(S-3): 1~17, 1984
 - 10) 第 28 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, AM-715, 1980
 - 11) 第 30 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム, DL-8280, 1982
 - 12) 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

THERAPEUTIC EFFECT OF T-3262, A NEW PYRIDONE CARBOXYLIC ACID ON VARIOUS EXPERIMENTAL INFECTIONS

TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE, AKIRA YOTSUJI, YASUSHI IKEDA
JUNICHI MITSUYAMA, NAGAKO NISHIDA, RITSUKO HORI
and CHIEKO KASUGA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.
4-1, 2-Chome, Shimookui, Toyama 930, Japan

The therapeutic effects of T-3262 on various experimental infections in mice were studied in comparison with norfloxacin (NFLX) and ofloxacin (OFLX).

- 1) The therapeutic effect of T-3262 was equal or superior to those of OFLX and NFLX against systemic infection in mice treated with immunosuppressive cyclophosphamide or azathioprine.
- 2) On urinary tract infection with Gram-negative bacteria in mice, the therapeutic effect of T-3262 was equal to those of OFLX, and was superior to those of NFLX.
- 3) On pneumonia with *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in mice, the therapeutic effect of T-3262 was equal or superior to those of OFLX and NFLX.
- 4) On subcutaneous abscess with *Staphylococcus aureus* in mice, the therapeutic effect of T-3262 was superior to those of OFLX and NFLX.