

新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の細菌学的評価

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
富山化学工業株式会社総合研究所*

新ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤 T-3262 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性を norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX) を対照薬剤として比較した結果、以下の成績を得た。

- 1) T-3262 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して広い抗菌スペクトラムを有していた。グラム陽性菌に対しては、すべての対照薬剤より強い抗菌力を示し、またグラム陰性菌に対しては CPFX とほぼ同程度、NFLX, OFLX より優れた抗菌力を示した。
- 2) T-3262 は *Pseudomonas aeruginosa* を含むブドウ糖非酸酵菌, *Bacteroides fragilis* を含む嫌気性菌に対しても強い抗菌力を示した。
- 3) T-3262 は methicillin 耐性ブドウ球菌および nalidixic acid 耐性グラム陰性菌に対しても強い抗菌力を示した。
- 4) T-3262 の抗菌力に及ぼす諸因子の影響では培地の種類、ヒト血清添加の影響はほとんど受けず、培地 pH がアルカリ性側のとき抗菌力が強まった。
- 5) T-3262 の作用は殺菌的であった。
- 6) グラム陽性菌およびグラム陰性菌を用いたマウス実験の全身感染症で T-3262 は優れた治療効果を示した。特にグラム陽性菌においてすべての対照薬剤より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, 抗菌力

T-3262 は富山化学工業(株)総合研究所で開発された新ピリドンカルボン酸系抗菌剤である。本剤は、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し、化学名は (±)-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 である (Fig. 1)。

今回著者らは、T-3262 に関する *in vitro* および *in vivo* の細菌学的評価を既知ニューキノロン剤と比較検討したので報告する。

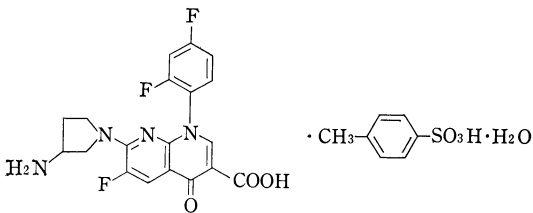


Fig. 1. Chemical structure of T-3262.

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

T-3262 および Ciprofloxacin (CPFX) は当社総合研究所で合成されたものを使用した。ただし T-3262 はマウス実験的感染症に対する治療実験を除いて、全ての実験に T-3262 base を使用した。その他 nalidixic acid (NA, 第一製薬), norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), ofloxacin (OFLX, 第一製薬) を用いた。なお、NA, NFLX および OFLX はいずれも市販品から抽出して用いた。

2. 使用菌株

標準菌株および臨床分離株は当社総合研究所保存株を用いた。

3. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法に準じ寒天平板希釈法で最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した¹⁾。なお感受性測定用培地には Mueller-Hinton agar (MHA: 栄研) を用いた。ただし前培養液に *Pseudomonas aeruginosa* の場合 0.4% KNO₃ 加 Mueller-Hinton broth (MHB: Difco), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* では Brain heart

infusion broth (BHIB : 栄研), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* では 10% 羊血液加 BHIB を用い, MIC 測定平板には *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* では 10% 羊血液加 MHA を用いた。 *Campylobacter jejuni* では BHIB に馬血液を 10% 加え 10% CO₂ インキュベーターで 37°C 48 時間培養し, MIC 測定平板には 10% 馬血液加 Brain heart infusion agar (BHIA : 栄研) を用い菌接種後 10% CO₂ インキュベーターで 37°C 48 時間培養後 MIC を測定した。 *Haemophilus influenzae* では前培養にヘミン (sigma) を 10 µg/ml, β-NAD (sigma) を 2 µg/ml 加えた BHIB を用い, MIC 測定平板には FILDES のペプシン消化血液を 5% 添加した。 *Branhamella catarrhalis* では 5% 馬血液加 Heart infusion agar (HIA : BBL) を用いた。また嫌気性菌の場合は前培養液に GAM ブイヨン (日水), MIC 測定平板には GAM 寒天 (日水) を使用し嫌気条件下で培養した。なお薬剤は 0.1 N NaOH にて溶解し, 滅菌水にて希釈した。

4. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

(1) 培地の影響

Heart infusion agar (HIA : 栄研), BHIA, Nutrient agar (NA : 栄研), Tryptosoy agar (TSA : 栄研) および MHA を用い接種菌量は約 10⁶ cells/ml として MIC を測定した。

(2) 培地 pH の影響

1 N HCl または 1 N NaOH で pH を調整した MHA を用い接種菌量は約 10⁶ cells/ml として MIC を測定した。

(3) 血清添加の影響

プールヒト血清を MHB に 25, 50% となるように

添加し接種菌量は約 10⁴ cells/ml として液体希釈法で MIC を測定した。

5. 殺菌力の測定

(1) 最小殺菌濃度 (MBC)

Nutrient Broth (NB : 栄研) で 37°C 1 夜培養した菌液を適宜希釈し, 最終菌量が約 10⁶ および 10⁴ cells/ml となるように薬剤の倍数希釈濃度を含む NB に接種し, 37°C 18 時間培養後肉眼的に菌の増殖が認められなかった最小濃度を MIC とした。MIC 測定後各培養液の 1 白金耳を薬剤を含まない HIA に移植し, 37°C 20 時間培養後コロニー数が 10 個以下となる最小濃度を MBC とした。

(2) 増殖曲線に及ぼす影響

MHB で 37°C 1 夜培養した菌液を MHB に接種し 37°C で振盪培養した。生菌数が約 10⁶ cells/ml になった時点で薬剤を添加し経時的に生菌数を測定した。

6. マウス実験の全身感染症に対する治療効果

マウス SLC/ICR 系雄, 4 週齢, 体重 20±1g, 1 群 15 匹を用いた。感染菌は HIA 上で 37°C 1 夜培養した後菌体をかきとり, 生理食塩水に懸濁し必要な菌量に調整した後 *Escherichia coli* TK-16 以外は 5 又は 10% gastric mucin (半井化学) に懸濁し腹腔内に 0.5 ml 接種した。なお *S. pneumoniae* は 10% 羊血液を加えた BHIA にて 37°C 18 時間培養後菌体を HIB に懸濁して用いた。薬剤は感染 1 時間後に 0.5% methyl cellulose にて懸濁し 1 回経口投与した。治療効果は 7 日後のマウス生存匹数から LITCHFIELD WILCOXON 法²⁾ により算出した ED₅₀ (mg/mouse) で示した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

Table 1. Antibacterial spectrum of T-3262 against aerobic Gram-positive bacteria

Organism	MIC (µg/ml)			
	T-3262	NFLX	OFLX	CPFX
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	0.05	0.78	0.39	0.2
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.05	1.56	0.39	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.012	0.78	0.2	0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IID 866	0.05	0.39	0.2	0.1
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-8*	0.1	1.56	0.78	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK*	0.1	1.56	0.78	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> IID 552*	0.1	1.56	0.78	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> IID 553*	0.1	1.56	0.78	0.39
<i>Enterococcus faecalis</i> IID 682	0.2	0.78	0.78	0.39
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.05	0.39	0.2	0.1

Inoculum size : 10⁶ cells/ml, one loopful

Medium : Mueller-Hinton agar (Eiken), * Media were supplemented with sheep blood (10%).

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin CPFX : ciprofloxacin

Table 2. Antibacterial spectrum of T-3262 against aerobic Gram-negative bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	T-3262	NFLX	OFLX	CPFX
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.006	0.025	0.012	0.006
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.012	0.025	0.05	0.012
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IID 875	0.1	0.2	0.2	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.006	0.05	0.025	0.006
<i>Salmonella paratyphi</i> IID 605	0.006	0.025	0.05	0.012
<i>Salmonella schottmulleri</i> IID 607	0.006	0.025	0.05	0.006
<i>Shigella sonnei</i> EW 33	0.012	0.05	0.05	0.012
<i>Shigella boydii</i> EW 28	0.006	0.05	0.025	0.012
<i>Shigella flexneri</i> IID 642	0.012	0.05	0.025	0.012
<i>Serratia marcescens</i> IID 620	0.2	0.1	0.1	0.025
<i>Serratia marcescens</i> IID 3736	0.39	0.39	0.78	0.1
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	0.39	0.2	0.39	0.1
<i>Proteus vulgaris</i> IID 874	0.1	0.05	0.1	0.025
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3851	0.2	0.05	0.05	0.012
<i>Providencia rettgeri</i> IFO 13501	0.012	0.025	0.025	0.003
<i>Morganella morgani</i> IID 602	0.05	0.025	0.1	0.012
<i>Citrobacter freundii</i> IFO 12681	0.003	0.025	0.006	0.003
<i>Enterobacter aerogenes</i> IID 972	0.006	0.025	0.012	0.006
<i>Enterobacter cloacae</i> IID 977	0.025	0.025	0.025	0.006
<i>Enterobacter cloacae</i> IID 3320	0.025	0.025	0.025	0.006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	0.05	0.1	0.1	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	0.2	1.56	1.56	0.2

Inoculum size : 10^6 cells/ml, one loopful

Medium : Mueller-Hinton agar (Eiken)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin CPFX : ciprofloxacin

Table 3. Antibacterial spectrum of T-3262 against anaerobic bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	T-3262	NFLX	OFLX	CPFX
<i>Peptostreptococcus variabilis</i> ATCC 14955	0.39	25	3.13	0.78
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> WAL 3218	0.39	6.25	6.25	3.13
<i>Peptostreptococcus magnus</i> WAL 2508	0.1	1.56	0.39	0.39
<i>Peptostreptococcus prevotii</i> GAL 0444	0.78	12.5	25	6.25
<i>Clostridium perfringens</i> WAL 3503	0.2	1.56	0.78	0.39
<i>Clostridium difficile</i> GAI 0286	3.13	25	12.5	6.25
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0.39	12.5	1.56	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI 0004	0.39	25	1.56	3.13
<i>Bacteroides fragilis</i> GN 11479	0.39	100	1.56	12.5
<i>Bacteroides vulgatus</i> WAL 1887	0.39	50	1.56	12.5
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> WA 3304	0.39	50	1.56	12.5
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> WAL 2926	0.39	50	3.13	6.25

Inoculum size : 10^6 cells/ml, one loopful

Medium : GAM agar (Nissui)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin CPFX : ciprofloxacin

T-3262 の抗菌スペクトラムを NFLX, OFLX および CPFX を対照薬剤として比較検討し、その結果を Table 1~3 に示した。

グラム陽性菌に対する T-3262 の抗菌力は同系対照薬剤と比べて数管優れていた。特に *S. aureus* に対しては $0.05 \mu\text{g/ml}$ の低い MIC 値を示した。グラム陰性菌に対しては T-3262 は広範囲な抗菌スペクトラムと強い抗菌力を示した。その抗菌力は NFLX, OFLX より優れ CPFX とほぼ同程度であった。また嫌気性菌に対して T-3262 は *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* のいずれの菌種に対しても対照薬剤より低い MIC 値を示した。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離された各種菌株に対する T-3262 の抗菌力を接種菌量 10^6 cells/ml で検討した。対照薬剤として NFLX, OFLX および CPFX を用いた。その結果を Fig. 2~26 に示した。

(1) *Staphylococcus*

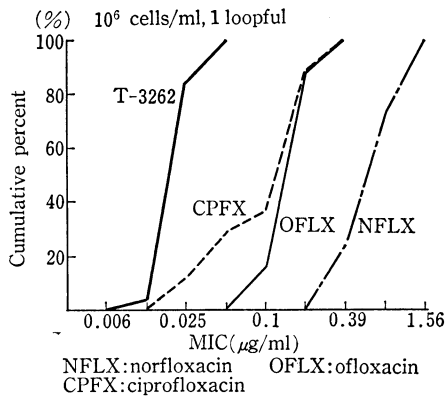


Fig. 2. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* (25 strains).

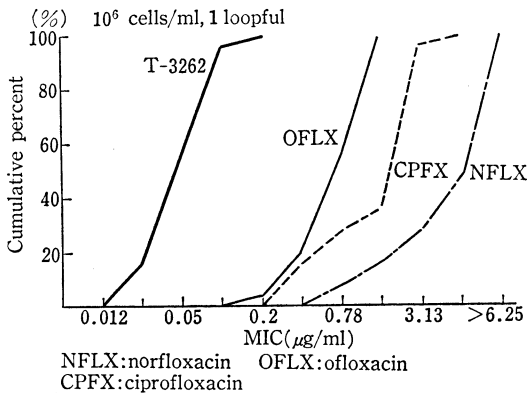


Fig. 3. Susceptibility distribution of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (25 strains).

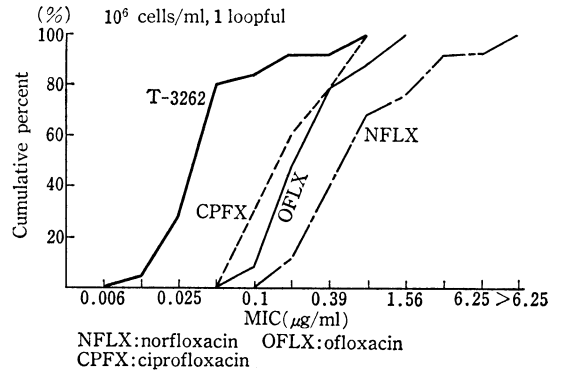


Fig. 4. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* (25 strains).

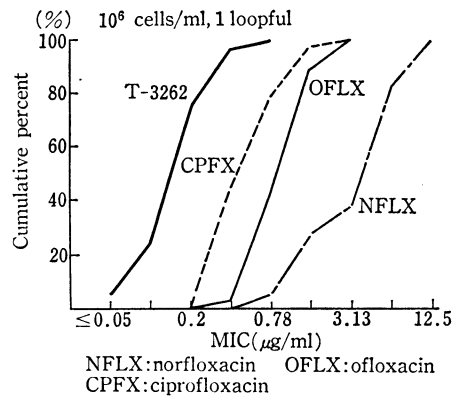


Fig. 5. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Streptococcus* sp. (36 strains).

S. aureus (25株), methicillin 耐性 *S. aureus* (25株), *S. epidermidis* (25株) に対する抗菌力を Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 に示した。T-3262 はいずれの対照薬剤よりも優れた抗菌力を示し、*S. aureus* では $0.05 \mu\text{g/ml}$ で全株を阻止した。また methicillin 耐性菌に対しても感受性菌とほとんど同等の抗菌力を示した。*S. epidermidis* に対しては $0.05 \mu\text{g/ml}$ の低濃度で80%の株を阻止した。

(2) *Streptococcus* sp.

Streptococcus sp. (36株) に対する抗菌力を Fig. 5 に示した。T-3262 は対照薬剤と比較して優れた抗菌力を示し、 $0.78 \mu\text{g/ml}$ の低濃度で全株を阻止した。

(3) *E. faecalis*

E. faecalis (25株) に対する抗菌力を Fig. 6 に示した。T-3262 は $0.78 \mu\text{g/ml}$ で全株を阻止し、CPFX より1管優れ、NFLX, OFLX よりも2~3管優れた抗菌力を示した。

(4) *E. coli*

E. coli (25株) に対する抗菌力を Fig. 7 に示した。

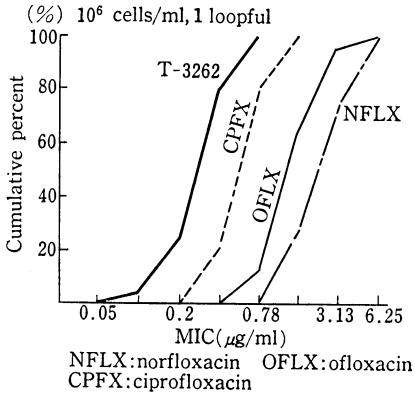


Fig. 6. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* (25 strains).

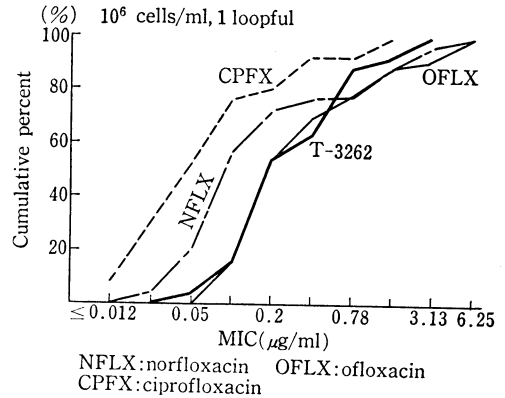


Fig. 9. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Serratia marcescens* (25 strains).

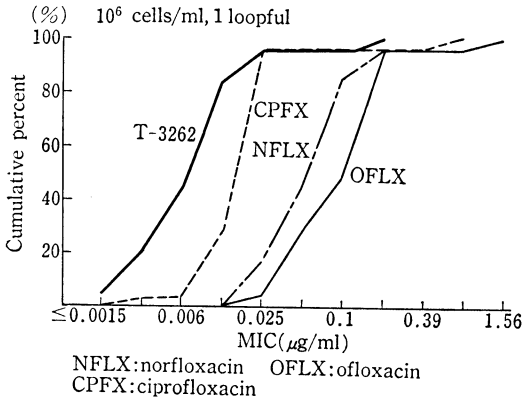


Fig. 7. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Escherichia coli* (25 strains).

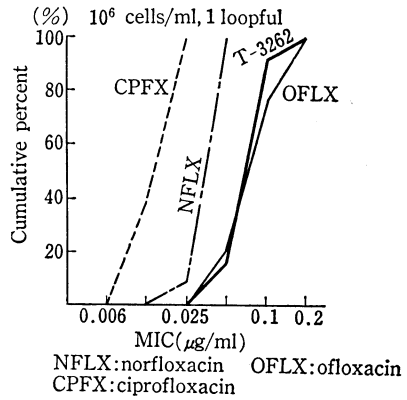


Fig. 10. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Proteus mirabilis* (25 strains).

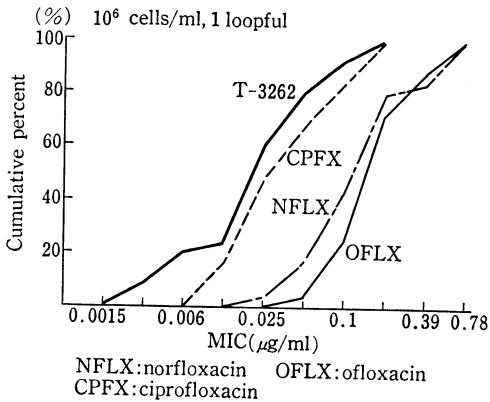


Fig. 8. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (25 strains).

T-3262 は対照薬剤と比較して優れた抗菌力を示し、0.025 μg/ml の低濃度で 90% 以上の株を阻止した。

(5) *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae (25 株) に対する抗菌力を Fig. 8 に示した。T-3262 の 50% 発育阻止濃度は 0.025 μg/ml

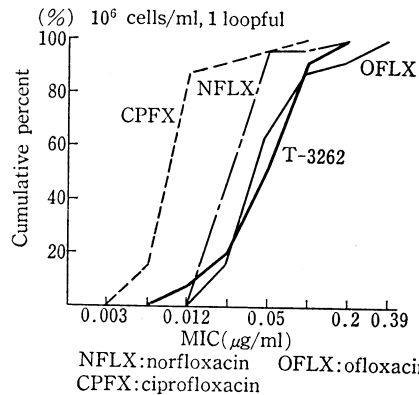


Fig. 11. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Proteus vulgaris* (25 strains).

で、0.2 μg/ml で全株を阻止し、CPFX と類似のパターンを示した。

(6) *Serratia marcescens*

S. marcescens (25 株) に対する抗菌力を Fig. 9 に示した。T-3262 は CPFX, NFLX より劣り OFLX と

ほぼ同程度の抗菌力を示し、50% 発育阻止濃度は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であった。

(7) *Proteus* 属

P. mirabilis (25 株), *P. vulgaris* (25 株), *Morganella morganii* (25 株), *Providencia rettgeri* (25 株) に対する抗菌力を Fig. 10~13 に示した。*Proteus* 属に

対する T-3262 の抗菌力は CPFX, NFLX より劣り OFLX とほぼ同程度であった。

(8) *Citrobacter freundii*

C. freundii に対する抗菌力を Fig. 14 に示した。T-3262 の抗菌力は CPFX より若干劣るが, NFLX, OFLX より 1 管優れていた。

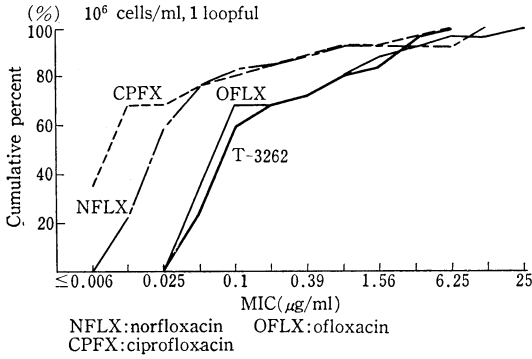


Fig. 12. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Morganella morganii* (25 strains).

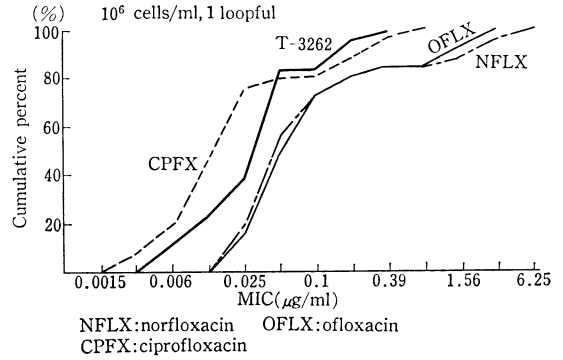


Fig. 15. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Enterobacter cloacae* (25 strains).

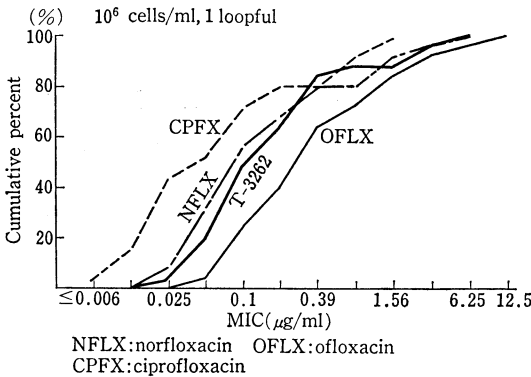


Fig. 13. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Providencia rettgeri* (25 strains).

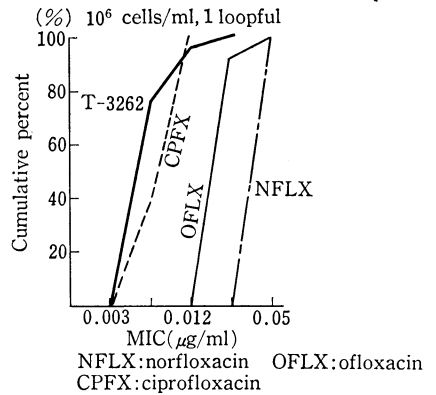


Fig. 16. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* (25 strains).

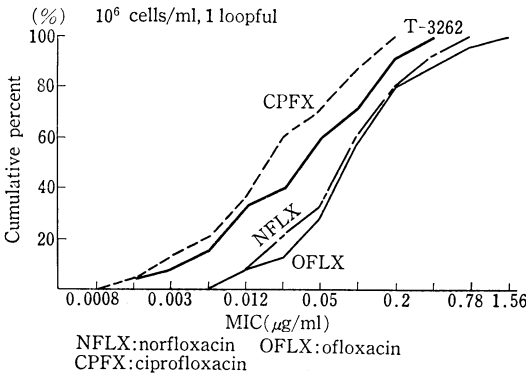


Fig. 14. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Citrobacter freundii* (25 strains).

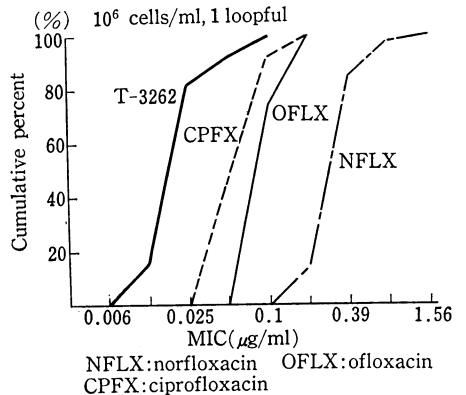


Fig. 17. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* (50 strains).

(9) *Enterobacter cloacae*

E. cloacae (25株) に対する抗菌力を Fig. 15 に示した。T-3262 の抗菌力は CPFX より1管劣り NFLX, OFLX より1管優れていた。

(10) *H. influenzae*

H. influenzae (25株) に対する抗菌力を Fig. 16 に示した。T-3262 の抗菌力は CPFX とほぼ同程度であり, NFLX, OFLX より2管優れていた。

(11) *B. catarrhalis*

B. catarrhalis (50株) に対する抗菌力を Fig. 17 に示した。T-3262 は対照薬剤と比較して非常に優れた抗菌力を示し, 0.1 µg/ml の低濃度で全株を阻した。

(12) *Salmonella* sp.

Salmonella sp. (25株) に対する抗菌力を Fig. 18 に示した。T-3262 の抗菌力は CPFX とほぼ同程度であり NFLX, OFLX より1管優れており 0.025 µg/ml の低濃度で全株を阻した。

(13) *C. jejuni*

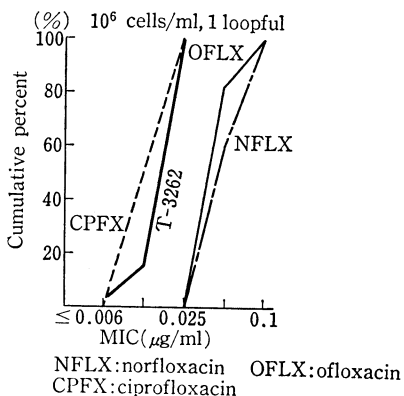


Fig. 18. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Salmonella* sp. (25 strains).

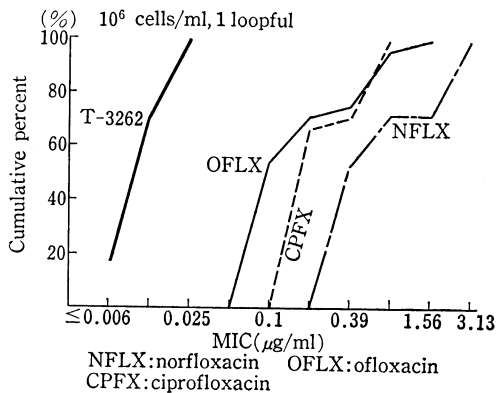


Fig. 19. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* (24 strains).

C. jejuni (24株) に対する抗菌力を Fig. 19 に示した。T-3262 は対照薬剤と比較して 3~4 管優れた抗菌力を示し, 0.025 µg/ml の低濃度で全株を阻した。

(14) *P. aeruginosa*

P. aeruginosa (25株) に対する抗菌力を Fig. 20 に

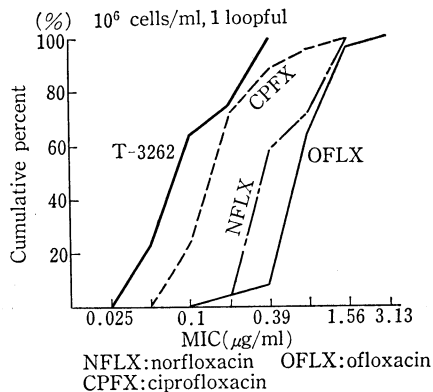


Fig. 20. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (25 strains).

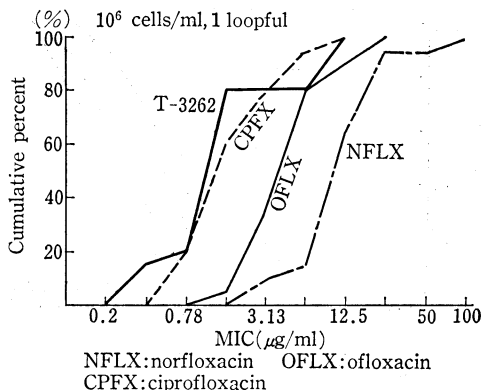


Fig. 21. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Pseudomonas cepacia* (25 strains).

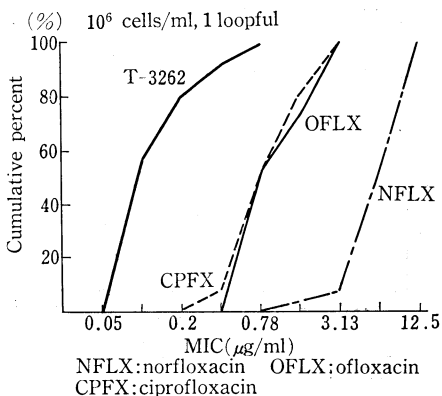


Fig. 22. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Xanthomonas maltophilia* (25 strains).

示した。T-3262はCFPXより1管優れ、NFLX、OFLXより2~3管優れた抗菌力を示した。

(15) ブドウ糖非酸酵菌

Pseudomonas cepacia (25株), *Xanthomonas maltophilia* (25株) *Acinetobacter calcoaceticus* (25株)

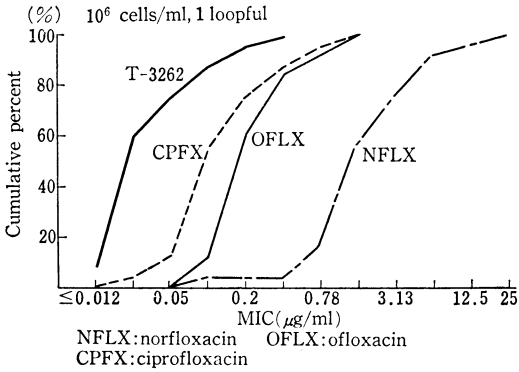


Fig. 23. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* (25 strains).

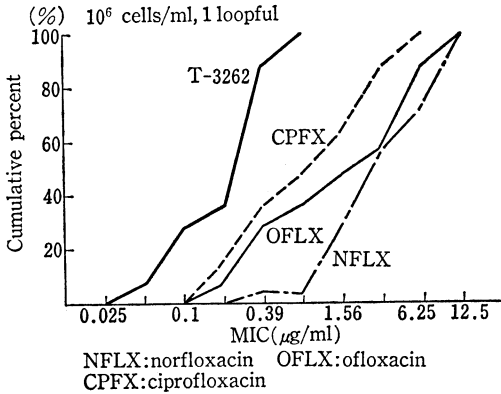


Fig. 24. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Peptostreptococcus* sp. (25 strains).

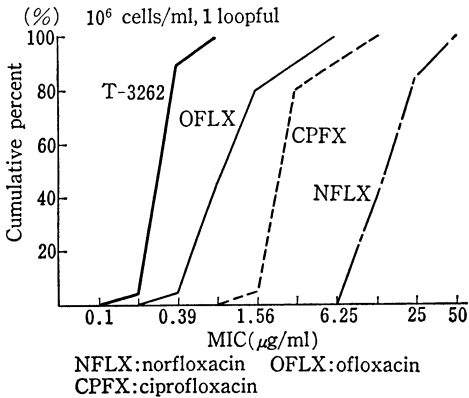


Fig. 25. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* (25 strains).

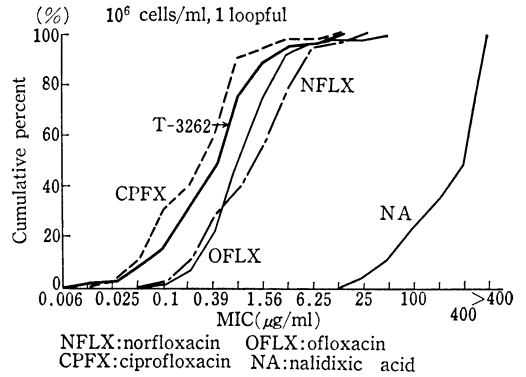


Fig. 26. Susceptibility distribution of clinical isolates of nalidixic acid-resistant Gram-negative rods (69 strains).

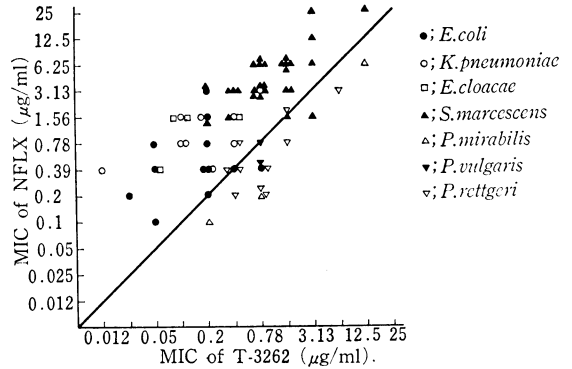


Fig. 27 Correlation of MICs between T-3262 and norfloxacin against nalidixic acid-resistant Gram-negative rods.

に対する抗菌力を Fig. 21~23 に示した。T-3262 は *P. capacia* において CPFX とほぼ同程度の抗菌力を示した。他の菌種に対しては対照薬剤と比較して優れた抗菌力を示した。

(16) 嫌気性菌

Peptostreptococcus sp. (25株), *B. fragilis* (25株) に対する抗菌力を Fig. 24, 25 に示した。T-3262 は嫌気性菌に対して対照薬剤より優れた抗菌力を示し、グラム陽性の *Peptostreptococcus* においては CPFX, OFLX NFLX より数管優れた抗菌力を示し、グラム陰性の *B. fragilis* においては OFLX より1管優れ、CPFX, NFLX より3~6管優れた抗菌力を示した。

(17) NA 耐性菌

NA 耐性菌 (69株) に対する抗菌力を Fig. 26 に示した。また、この時の T-3262 と NFLX の感受性相関を Fig. 27 に示した。その内訳は *E. coli* 12株, *K. pneumoniae* 9株, *E. cloacae* 4株, *S. marcescens* 29株, *P. mirabilis* 3株, *P. vulgaris* 2株および *P. rettgeri*

Table 4. Effect of various media on antibacterial activity of T-3262

Drug	Medium	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
		<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>E. faecalis</i> IID 682	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	<i>K. pneumoniae</i> Y-41	<i>S. marcescens</i> IID 620	<i>P. mirabilis</i> T-111	<i>P. vulgaris</i> GN 3027	<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445		
T-3262	HIA	0.05	0.2	0.006	0.012	0.1	0.2	0.2	0.012	0.2	0.012	0.2
	BHIA	0.025	0.2	0.006	0.012	0.1	0.39	0.2	0.012	0.2	0.025	0.2
	NA	0.025	0.2	0.006	0.012	0.1	0.2	0.2	0.012	0.2	0.025	0.2
	TSA	0.05	0.2	0.006	0.012	0.1	0.2	0.2	0.012	0.2	0.012	0.2
	MHA	0.025	0.2	0.012	0.012	0.1	0.2	0.2	0.012	0.2	0.012	0.2
NFLX	HIA	0.78	1.56	0.025	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.05	0.78
	BHIA	0.78	1.56	0.025	0.1	0.2	0.2	0.2	0.05	0.2	0.05	0.78
	NA	0.78	1.56	0.025	0.05	0.2	0.1	0.1	0.025	0.1	0.025	0.78
	TSA	0.78	1.56	0.025	0.1	0.1	0.1	0.1	0.025	0.1	0.025	0.78
	MHA	0.78	1.56	0.025	0.05	0.1	0.05	0.1	0.025	0.1	0.025	0.78
OFLX	HIA	0.39	0.78	0.012	0.05	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.025	1.56
	BHIA	0.39	0.78	0.012	0.025	0.2	0.2	0.2	0.025	0.39	0.012	1.56
	NA	0.39	1.56	0.012	0.05	0.1	0.2	0.2	0.025	0.2	0.025	1.56
	TSA	0.39	1.56	0.012	0.05	0.2	0.2	0.2	0.025	0.2	0.012	1.56
	MHA	0.39	0.78	0.012	0.025	0.2	0.1	0.2	0.025	0.2	0.025	1.56
CPFX	HIA	0.2	0.39	0.003	0.012	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.012	0.39
	BHIA	0.2	0.78	0.003	0.025	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.012	0.39
	NA	0.2	0.78	0.006	0.025	0.05	0.05	0.1	0.05	0.1	0.012	0.39
	TSA	0.2	0.39	0.006	0.012	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.012	0.39
	MHA	0.2	0.39	0.006	0.012	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.012	0.39

Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension (10^8 cells/ml)

Medium : HIA : heart infusion agar (Eiken)
 BHIA : brain heart infusion agar (Eiken)
 NA : nutrient agar (Eiken)
 TSA : trypto-soy agar (Eiken)
 MHA : Mueller-Hinton agar (Eiken)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin CPFX : ciprofloxacin

Table 5. Effect of medium pH on antibacterial activity of T-3262

Drug	pH	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)										
		<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>E. faecalis</i> IID 682	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	<i>K. pneumoniae</i> Y-41	<i>E. cloacae</i> IID 977	<i>S. marcescens</i> IID 620	<i>P. mirabilis</i> T-111	<i>P. vulgaris</i> GN 3027	<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	
T-3262	5.5	0.05	0.39	0.025	0.05	0.2	0.39	1.56	0.05	0.05	3.13	
	6.5	0.05	0.39	0.012	0.05	0.1	0.2	0.39	0.012	0.012	0.39	
	7.5	0.05	0.39	≤ 0.006	0.012	0.1	0.2	0.2	0.012	0.012	0.39	
	8.5	0.05	0.39	≤ 0.006	≤ 0.006	0.05	0.2	0.2	0.012	0.012	0.39	
NFLX	5.5	0.78	6.25	0.05	0.78	0.39	1.56	3.13	0.1	0.1	25	
	6.5	0.78	1.56	0.05	0.1	0.2	0.1	0.39	0.05	0.05	6.25	
	7.5	0.78	1.56	0.025	0.025	0.1	0.05	0.1	0.05	0.05	1.56	
	8.5	0.78	1.56	0.025	0.025	0.1	0.025	0.1	0.05	0.05	0.39	
OFLX	5.5	0.39	1.56	0.1	0.39	0.78	0.78	3.13	0.05	0.05	12.5	
	6.5	0.39	1.56	0.025	0.1	0.2	0.05	1.56	0.025	0.025	3.13	
	7.5	0.39	1.56	0.025	0.025	0.2	0.05	0.2	0.025	0.025	3.13	
	8.5	0.78	3.13	0.025	0.025	0.2	0.05	0.2	0.025	0.025	3.13	
CPFEX	5.5	0.39	1.56	0.025	0.2	0.2	0.2	0.2	0.05	0.05	6.25	
	6.5	0.2	0.78	0.025	0.05	0.1	0.025	0.1	0.025	0.025	1.56	
	7.5	0.2	0.78	0.012	0.012	0.05	0.012	0.05	0.025	0.025	0.39	
	8.5	0.2	0.78	0.012	0.012	0.05	0.012	0.05	0.025	0.025	0.2	

Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension (10^6 cells/ml)

Medium : Mueller-Hinton agar (Eiken)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin CPFEX : ciprofloxacin

Table 6. Effect of human serum on antibacterial activity of T-3262

Drug	Serum(%)	0		25		50	
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
T-3262		0.003	0.006	0.006	0.012	0.006	0.012
NFLX		0.012	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
OFLX		0.012	0.012	0.012	0.012	0.025	0.025
CPFV		0.003	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006

Inoculum size : 2.9×10^4 cells/ml

Medium : Mueller-Hinton broth (Difco)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin CPFV : ciprofloxacin

Table 7. Correlation between MICs and MBCs

Organism	Inoculum size (cells/ml)	MBC/MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		T-3262	NFLX	OFLX
<i>S. aureus</i> FDA 209 P	1.2×10^4	0.05/0.05	0.78/0.78	0.78/0.39
	1.2×10^6	0.1/0.05	1.56/0.78	0.78/0.39
<i>E. faecalis</i> IID 682	1.7×10^4	0.39/0.2	1.56/0.78	1.56/1.56
	1.7×10^6	0.78/0.39	6.25/3.13	3.13/1.56
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.0×10^4	0.012/0.012	0.1/0.1	0.1/0.05
	1.0×10^6	0.012/0.012	0.1/0.1	0.1/0.1
<i>E. coli</i> NIHJ	1.5×10^4	0.006/0.006	0.025/0.025	0.012/0.012
	1.5×10^6	0.006/0.006	0.025/0.025	0.025/0.025
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	1.9×10^4	0.05/0.05	0.2/0.1	0.2/0.2
	1.9×10^6	0.1/0.1	0.2/0.2	0.39/0.39
<i>P. mirabilis</i> T-111	1.8×10^4	0.2/0.1	0.1/0.05	0.1/0.05
	1.8×10^6	0.39/0.2	0.39/0.2	0.2/0.1
<i>P. vulgaris</i> GN 3027	1.3×10^4	0.012/0.012	0.025/0.025	0.012/0.012
	1.3×10^6	0.025/0.025	0.1/0.05	0.05/0.025
<i>E. cloacae</i> IID 977	1.8×10^4	0.012/0.012	0.025/0.025	0.025/0.025
	1.8×10^6	0.025/0.025	0.1/0.05	0.05/0.05
<i>S. marcescens</i> IID 620	1.1×10^4	0.05/0.025	0.1/0.1	0.1/0.1
	1.1×10^6	0.1/0.1	0.2/0.2	0.39/0.39
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	1.0×10^4	0.1/0.1	1.56/0.78	3.13/1.56
	1.0×10^6	0.39/0.2	6.25/3.13	6.25/3.13

Medium : MIC, nutrient broth (Eiken) ; MBC, heart infusion agar (Eiken)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin

10 株である。T-3262 は対照薬剤と同様、いずれの NA 耐性菌に対しても良好な抗菌力を示した。

3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

各種菌株を用いて抗菌力に及ぼす培地の種類、培地 pH およびヒト血清添加の影響を検討した。その結果を Table 4, Table 5, Table 6 に示した。T-3262 の抗菌力は培地の種類、ヒト血清添加によりほとんど影響を受けなかったが培地 pH において対照薬剤同様、グラム陰

性菌で酸性側よりアルカリ性側の方が強い抗菌力を示した。

4. 殺菌力

T-3262 の殺菌作用について MIC と MBC の関係および増殖曲線に及ぼす影響について NFLX, OFLX および CPFV と比較検討した。

(1) MIC と MBC との関係

S. aureus FDA 209 P, *E. faecalis* IID 682, *E. coli*

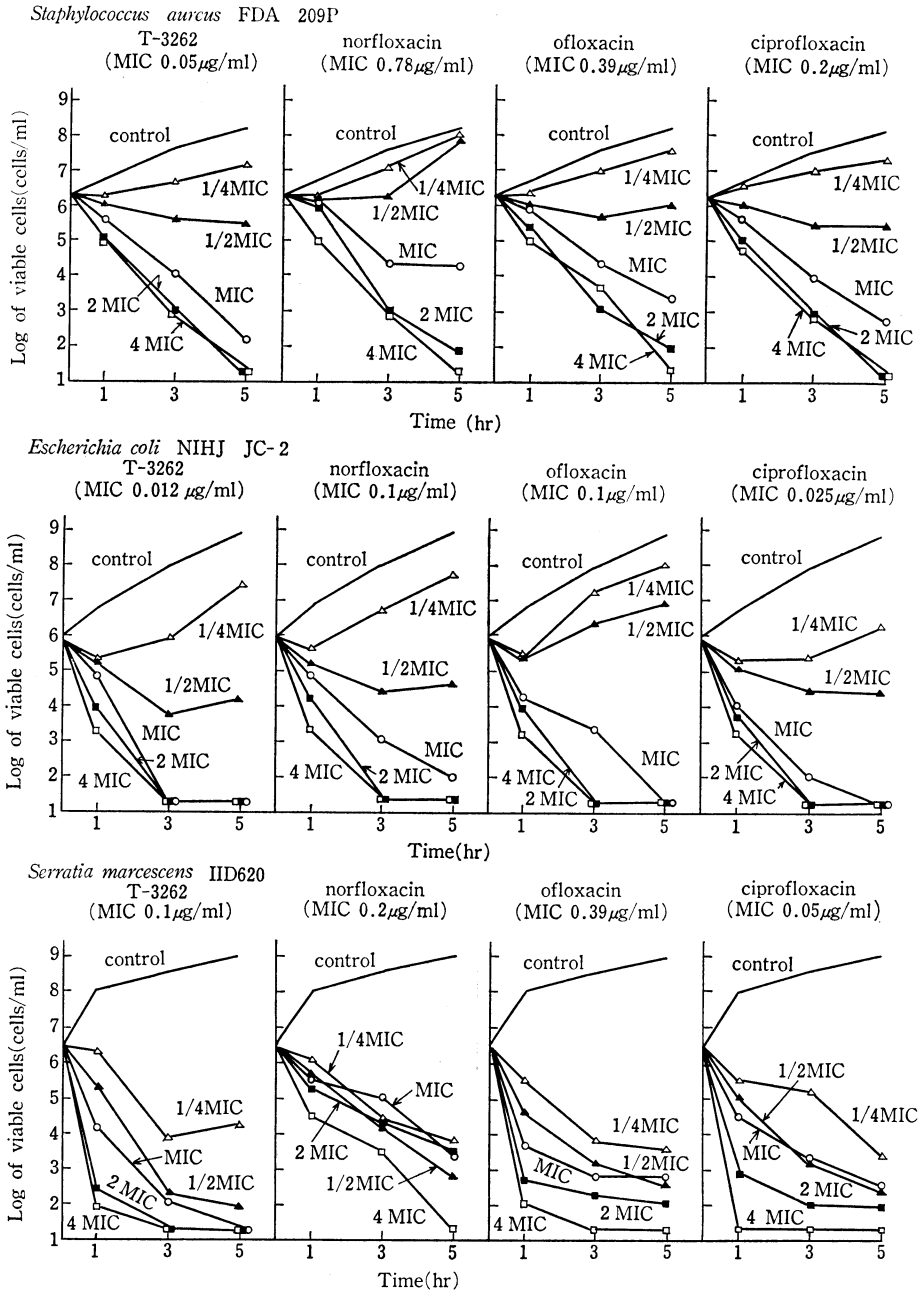


Fig. 28. Bactericidal effects of T-3262.

NIHJ JC-2, *E. coli* NIHJ, *K. pneumoniae* Y-41, *P. mirabilis* T-111, *P. vulgaris* GN 3027, *E. cloacae* IID 977, *S. marcescens* IID 620 および *P. aeruginosa* IFO 3445 を用い接種菌量 10^8 cells/ml および 10^4 cells/ml で MIC および MBC を測定し、その結果を Table 7 に示した。T-3262 はいずれの菌株に対しても 10^4 cells/ml および 10^6 cells/ml とともに MIC と MBC がほぼ

一致し殺菌的であった。この傾向は NFLX, OFLX も同様であった。

(2) 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus FDA 209 P, *E. coli* NIHJ JC-2 および *S. marcescens* IID 620 を用い対数増殖期の菌に薬剤を作用させその後の変化を5時間まで観察し、その結果を Fig. 28 に示した。T-3262 は対照とした NFLX, OFLX

Table 8. *In vivo* antibacterial activity of T-3262 against systemic infection

Organism	Challenge dose (cells/mouse)	Mucin	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (95% confidence limit) (mg/mouse)
<i>S. aureus</i> SMITH	1.0 \times 10 ⁷	5%	T-3262	0.012	0.015 (0.012 -0.019)
			NFLX	0.78	0.35 (0.27 -0.45)
			OFLX	0.2	0.091 (0.070 -0.12)
<i>S. aureus</i> F-605	4.4 \times 10 ⁸	10%	T-3262	0.05	0.037 (0.028 -0.048)
			NFLX	1.56	1.9 (1.2 -2.9)
			OFLX	0.39	0.23 (0.18 -0.29)
<i>S. pneumoniae</i> D-289	6.0 \times 10 ⁵	—	T-3262	0.2	0.43 (0.23 -0.80)
			NFLX	1.56	>4
			OFLX	0.78	2.2 (1.5 -3.2)
<i>E. coli</i> TK-16	8.4 \times 10 ⁶	—	T-3262	0.006	0.0020 (0.0016-0.0024)
			NFLX	0.025	0.054 (0.043 -0.068)
			OFLX	0.025	0.0072 (0.0055-0.0094)
<i>E. coli</i> TK-366	1.1 \times 10 ⁴	5%	T-3262	0.006	0.0022 (0.0015-0.0032)
			NFLX	0.05	0.065 (0.049 -0.088)
			OFLX	0.012	0.0085 (0.0059-0.021)
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	2.7 \times 10 ³	5%	T-3262	0.1	0.26 (0.21 -0.32)
			NFLX	0.1	2.1 (1.6 -2.8)
			OFLX	0.2	0.22 (0.18 -0.27)
<i>K. pneumoniae</i> Y-50	1.6 \times 10 ⁸	5%	T-3262	0.012	0.0065 (0.0050-0.0084)
			NFLX	0.05	0.078 (0.051 -0.12)
			OFLX	0.05	0.011 (0.0079-0.014)
<i>S. marcescens</i> IID620	8.0 \times 10 ⁷	5%	T-3262	0.2	0.045 (0.035 -0.057)
			NFLX	0.1	0.089 (0.068 -0.12)
			OFLX	0.1	0.029 (0.023 -0.036)
<i>S. marcescens</i> W-196	9.1 \times 10 ⁶	5%	T-3262	0.1	0.027 (0.022 -0.033)
			NFLX	0.1	0.043 (0.033 -0.056)
			OFLX	0.2	0.024 (0.019 -0.031)
<i>P. mirabilis</i> T-111	2.4 \times 10 ⁷	5%	T-3262	0.2	0.038 (0.029 -0.049)
			NFLX	0.1	0.11 (0.087 -0.13)
			OFLX	0.2	0.042 (0.033 -0.053)
<i>P. vulgaris</i> T-181	3.6 \times 10 ⁷	5%	T-3262	0.1	0.042 (0.033 -0.053)
			NFLX	0.05	0.094 (0.069 -0.13)
			OFLX	0.05	0.020 (0.017 -0.024)
<i>P. vulgaris</i> T-319	3.6 \times 10 ⁷	5%	T-3262	0.05	0.0079 (0.0048-0.013)
			NFLX	0.05	0.014 (0.0074-0.025)
			OFLX	0.05	0.0089 (0.0058-0.014)
<i>P. aeruginosa</i> S-406	5.0 \times 10 ⁵	5%	T-3262	0.1	0.26 (0.19 -0.36)
			NFLX	0.78	1.7 (1.2 -2.3)
			OFLX	0.78	1.2 (0.79 -1.7)
<i>P. aeruginosa</i> S-415	1.0 \times 10 ⁵	5%	T-3262	0.2	0.027 (0.019 -0.039)
			NFLX	1.56	0.34 (0.23 -0.50)
			OFLX	1.56	0.14 (0.096 -0.20)

Therapy : p.o. at 1 hr after i.p. infection

ED₅₀ : LITCHFIELD-WILCOXON method (n=15)MIC : Inoculum size, 1 loopful of bacterial suspension (10⁶ cells/ml)

NFLX : norfloxacin OFLX : ofloxacin

および CPFX と同様優れた殺菌作用を示し、*S. aureus*、*E. coli* に対しては Sub MIC 濃度で一部 regrowth が認められたが 1 MIC で殺菌的に作用した。*S. marcescens* に対しては Sub MIC 濃度でも殺菌的に作用した。

(5) マウス実験の全身感染症に対する治療効果

S. aureus 2株, *S. pneumnoiae* 1株, *E. coli* 2株, *K. pneumoniae* 2株, *S. marcescens* 2株, *Proteus* 属 3株および *P. aeruginosa* 2株を用いたマウス実験の全身感染症に対する治療効果を NFLX, OFLX を対照薬剤として検討し、その結果を Table 8 に示した。T-3262 の各種グラム陽性菌に対する ED₅₀ 値は 0.015~0.43 mg/mouse で OFLX の約 1/5, NFLX の約 1/10~1/50 の値であった。グラム陰性菌の *E. coli*, *P. aeruginosa* に対する ED₅₀ 値は 0.0022~0.26 mg/mouse で OFLX の約 1/4, NFLX の約 1/6~1/30 の値であった。また *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Proteus* 属に対する ED₅₀ 値は 0.0065~0.26 mg/mouse で OFLX とほぼ同等, NFLX の約 1/2~1/10 の値であった。

III. 考 察

ピリドンカルボン酸系抗菌剤は 1962 年 Winthrop 研究所の LESHER ら⁹⁾によって合成された NA の発見を嚆矢とし、その後 oxolinic acid, cinoxacin, pipemidic acid などが合成され臨床に供された。しかし、これらはグラム陰性菌にしか効力が及ばず、その抗菌力もそれほど強力なものではないため、その適用範囲は主として尿路感染症に限定されていた。

近年、キノロン環およびナフチリジン環の 6 位にフッ素を導入することによりグラム陽性菌にも抗菌力を示すことが報告された⁴⁾。この知見を基にして NFLX, OFLX, ENX および CPFX などの新しい薬剤が続々と開発され応用されている。これらの薬剤は前者の NA などの薬剤と区別してニューキノロン剤と呼ばれ、グラム陰性菌からグラム陽性菌まで抗菌スペクトラムは広がり、また抗菌力は第 3 世代のセフェム剤に匹敵するため、尿路感染症のみならず呼吸器感染症を含む各科領域の感染症の治療に用いられるようになった。

T-3262 はグラム陽性菌、グラム陰性菌および嫌気性菌に対し広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有する新しいピリドンカルボン酸系抗菌剤である。特に MRSA を含むグラム陽性菌に対しては従来のニューキノロン剤と比較して最も強い抗菌力を示し、またグラム陰性菌に対しては CPFX とほぼ同程度の抗菌力を示し、NFLX, OFLX より優れた抗菌力を示すことは注目に値する。また近年、日和見感染症の起炎菌として増加しつつある *P. aeruginosa* を含むブドウ糖非醗酵菌⁵⁾や呼吸器感染症において出現頻度が高い *H. influenzae* および *B.*

*catarrhalis*⁶⁾ に対しても本剤は優れた抗菌力を示した。更に、T-3262 は *B. fragilis* を含む嫌気性菌群においても強い抗菌力を発揮し、また NA 耐性の *Enterobacteriaceae* に対してもほとんど交叉耐性を示さず強い抗菌力を有していた。

MIC 値に及ぼす諸因子の影響では、T-3262 は培地の種類、ヒト血清添加においてほとんど抗菌力に影響を受けなかったが、培地 pH についてグラム陰性菌で酸性側よりアルカリ性側の方が強い抗菌力を示した。一般に、キノロン剤は NA, miloxacin および cinoxacin のように酸性側で強い抗菌力を示す薬剤^{7,8)}と、NFLX などのニューキノロン剤や本剤のようにアルカリ性側で強い抗菌力を示す薬剤がある^{9,10)}。キノロン剤は DNA gyrase に作用し、DNA 合成の複製を阻害することにより細菌を死にいたらしめることが知られているが^{11,12)}、ニューキノロン剤や T-3262 が NA 耐性菌にほとんど交叉耐性を示さないこと、培地 pH による抗菌作用の挙動が NA などの古いタイプのキノロン剤と異なることから、DNA gyrase の他に別の作用も有しているのかも知れない。T-3262 の抗菌作用は検討したいずれの菌でも MIC と MBC がほぼ一致し、また増殖曲線に及ぼす影響を見ると、本剤は短時間で菌を死滅させ、その作用は殺菌的であった。

マウス実験の全身感染症において、T-3262 は経口投与によりグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して優れた治療効果を示した。特にグラム陽性菌に対しては、本剤は *in vitro* 同様 *in vivo* でも優れた治療効果を示したことは、今後呼吸器感染症を含む各科領域の感染症の治療に期待できる。

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) 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
- 2) LITCHFIELD J T, WILCOXON F : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Therap. 96 : 99~113, 1949
- 3) LESHER G Y, FROELICH E J, GRUETT M D, BAILEY J H, BRUNDAGE R P : 1,8-Naphtyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J. Med. Pharm. 5 : 1063~1065, 1962
- 4) KOGA H, ITOH A, MURAYAMA S, SUZUE S, IRIKURA T : Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-

- carboxylic acids. J. Med. Chem. 23 : 1358~1363, 1980
- 5) 藪内英子：耐性化の現状 3) 非酵酵母。日本臨床, 44 : 973~977, 1986
 - 6) 副島林造, 中川義久：各科における新しい抗菌薬の耐性菌からみた使い方—内科・呼吸器科領域— Prog. Med. 7 : 1763~1767, 1987
 - 7) 井沢昭雄, 木崎容子, 入江健二, 江田靖子, 小松敏昭, 並木信重郎, 水谷 卓, 長手尊俊, 神郡邦男, 大村貞文：新化学療法剤 AB-206 の抗菌作用。Chemotherapy 26(S-4) : 48~59, 1978
 - 8) 俵 勝也, 吉田 正, 竹間盛夫, 元川清司：Cinoxacin の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 28 (S-4) : 46~65, 1980
 - 9) 伊藤 明, 村山 哲, 平井敬二, 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 29(S-4) : 66~82, 1981
 - 10) 西野武志, 田中真由美, 監物英男, 谷野輝雄：新しい合成化学療法剤 BAYo 9867 (ciprofloxacin) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 33(S-7) : 39~63, 1985
 - 11) SUGINO A, PEEBLES L, KREUZER K N, COZZARELLI N R : Mechanism of action of nalidixic acid : Purification of *Escherichia coli* A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 : 4767~4771, 1977
 - 12) 山下 悟, 矢島英彦, 井上松久, 三橋 進：BAY o 9867 (ciprofloxacin) の抗菌作用。Chemotherapy 33(S-7) : 1~17, 1985

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF T-3262, A NEW PYRIDONE CARBOXYLIC ACID

TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE, AKIRA YOTSUJI, TOSHIO HAYASHI

SHINZABUROU MINAMI, SEIKI OKAMOTO, YOSHIKO YAMASHIRO

HARUMI ARAKI, YUUKO ITOU and KEIKO MOTOMURA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

2-4-1 Shimookui, Toyama 930, Japan

We compared the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-3262, a new pyridone carboxylic acid derivative, with those of norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX) and ciprofloxacin (CPFV). The results are summarized as follows.

1) T-3262 had a broad antibacterial spectrum against Gram-positive and negative bacteria. T-3262 was the most potent, and was superior to NFLX against Gram-positive bacteria, and almost equal to CPFV against Gram-negative bacteria.

2) T-3262 had potent antibacterial activity against non-fermentative Gram-negative rods including *Pseudomonas aeruginosa*, and obligate anaerobes including *Bacteroides fragilis*.

3) T-3262 had potent antibacterial activity against mecicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nalidixic acid resistant Gram-negative bacteria.

4) The antibacterial activity of T-3262 was hardly changed by the kind of medium and the addition of human serum to the culture medium. However, its activity was enhanced in alkaline medium.

5) The action of T-3262 was bactericidal at MIC.

6) T-3262 showed excellent therapeutic effect on systemic infection in mice with Gram-positive and negative bacteria. Especially, T-3262 had the most potent therapeutic effect against Gram-positive bacteria.