

## Piromidic acid の基礎的、臨床的検討 (第1報)

—とくに抗菌力, 併用効果, 体液中活性濃度, 代謝物濃度について—

金沢 裕

新潟鉄道病院内科

倉又利夫

新潟鉄道病院薬剤科

おもにグラム陰性桿菌に抗菌力を示す新合成化学療法剤としての Piromidic acid<sup>4,8)</sup> (以下PAと略記) の、基礎的検討としての *in vitro* 抗菌力, 体内活性濃度測定, 代謝物濃度測定, 併用効果などについて検討を加えたので報告する。

## 抗菌力について

実験方法: 病原菌として日常検査の対象となることの多い13種, 67株について, 抗菌力を感性ディスク用培地(日産) pH 7.4 を用いる寒天平板2倍希釈法で測定した。

成績: その成績は Table 1 に示すようで, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus-Providencia* には MIC 25  $\mu\text{g/ml}$  以下のかかなりな抗菌力を示し, *E. coli*, *Shigella flexneri* の一部には MIC 0.39  $\mu\text{g/ml}$  以下のきわめて強い抗菌力を呈した。しかし, *Pseudomonas* には 400  $\mu\text{g/ml}$  以上の MIC で抗菌力はきわめて弱く,

*Klebsiella* にも MIC 100  $\mu\text{g/ml}$  以下で抗菌力のやや劣る傾向がみられた。ブドウ球菌に対しては MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以下と, 腸内細菌群に近い抗菌力を示したが, 腸球菌には MIC 400  $\mu\text{g/ml}$  以上の抗菌力しかみられなかつた。

既知代謝物 ( $\beta$ -Hydroxy PA および Substance N) の抗菌力

実験材料および実験方法: PA の生体内代謝物として,  $\beta$ -Hydroxy PA および Substance N (いずれも大日本製薬総合研究所提供, Fig. 1 参照) を入手することができたので, 代表的菌株20について PA とこの2物質の抗菌力を前述の寒天平板希釈法で測定した。

実験成績: その成績は Table 2 に示すようで, 緑膿菌以外の腸内細菌に対しては,  $\beta$ -Hydroxy PA は PA に比し1~4倍(平均2.7倍)の抗菌力の増強がみられた。しかし Substance N の MIC は 200  $\mu\text{g/ml}$  以上で,

Table 1 Piromidic acid の抗菌力

(化学療法学会標準法)

菌種	株数	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )												
		0.195	0.390	0.781	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400	<
<i>Staph. aureus</i>	16					1	14	1						
<i>Staph. epidermidis</i>	3					3								
<i>Strept. faecalis</i>	1													1
<i>E. coli</i>	11		1			2	3	4	1					
<i>Klebsiella</i>	4					1			1	1	1			
<i>Citrobacter</i>	1							1						
<i>Cloaca</i>	2							2						
<i>Serratia</i>	1							1						
<i>Shigella sonnei</i>	3					1	2							
<i>Shigella flexneri</i> 3a	2	1	1											
<i>Salmonella</i>	8						2	6						
<i>Proteus-Providencia</i>	5					1	1	3						
<i>Pseud. aeruginosa</i>	10												2	8

標準株 MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ): *Staph. aureus* 209 P 12.5  
*E. coli* NIHJ 6.25

Fig. 1

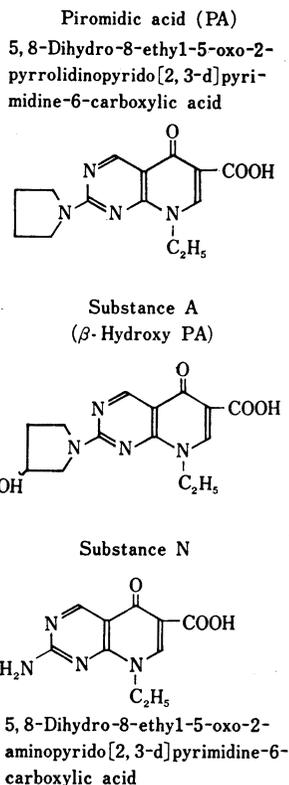


Table 2 Piromidic acid および 2つの代謝物の抗菌力

菌 株	寒天平板希釈法による MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	PA	$\beta$ -Hydroxy PA	Substance N
<i>Staph. aureus</i> 209 P	3.12	12.5	200
<i>Staph. aureus</i> No. 1	3.12	25	200
<i>Staph. aureus</i> No. 3	3.12	12.5	200
<i>Staph. aureus</i> No. 4	6.25	25	200
<i>E. coli</i> NIHJ	3.12	0.78	100
<i>E. coli</i> K-12	12.5	6.25	200
<i>Kleb. pneumonia</i> 602	1.56	0.39	200
<i>Kleb. pneumonia</i> Y	50	12.5	>200
<i>Sh. sonnei</i> 5185	3.12	1.56	100
<i>Sh. flexneri</i> 3a 5184	0.195	0.195	100
<i>Cloaca</i>	12.5	6.25	>200
<i>Salm. enteritidis</i> 1098	25	6.25	200
<i>Salm. paratyphi</i> B 182	25	6.25	200
<i>Serratia</i> 15	12.5	6.25	100
<i>Prot. vulgaris</i> sp	6.25	3.12	200
<i>Prot. mirabilis</i> sp	25	12.5	>200
<i>Rettgerella</i> sp	25	6.25	100
<i>Providencia</i> sp	50	12.5	100
<i>Pseud. aeruginosa</i> No. 29	>200	200	>200
<i>Pseud. aeruginosa</i> No. 35	>200	200	>200

その抗菌力は著しく弱く、臨床的には有用でないと考えられた。

### Proteus-Providencia 菌群に対する本剤の

#### 抗菌力に及ぼす nitrofuran 剤の拮抗作用

われわれ<sup>2,3)</sup> はさきに *Proteus-Providencia* 菌群に対する Nalidixic acid の抗菌力が、ある種の nitrofuran 剤により拮抗され、しかもその nitrofuran 剤に特異性のあることを報告した。PA およびその生体内の強力な活性代謝物である  $\beta$ -Hydroxy PA についても同様な作用があるかを検討した。

#### 1. 実験材料および実験方法

*Proteus-Providencia* 菌群の各種、*Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Morganella*, *Rettgerella*, *Providencia* の各 2 株、計 10 株を寒天培地に混合接種して平板を作製し、その上に nitrofuran 剤 (nitrofurantoin 100  $\mu\text{g}$ , dihydroxymethylfuratrizine 20  $\mu\text{g}$  含有) ディスクを置き、ついで PA 50  $\mu\text{g}$ ,  $\beta$ -Hydroxy PA 50  $\mu\text{g}$  含有ディスクをこれに近くおいて培養し、出現した阻止円の交わる部分の形状をみて併用効果を判定した。

#### 2. 実験成績

Table 3 に示すように、Nalidixic acid, PA,  $\beta$ -Hyd-

Table 3

*Proteus-Providencia* 菌群に対する Nalidixic acid と Piromidic acid および  $\beta$ -Hydroxy PA の抗菌作用に対する nitrofuran 剤の影響 (Disc-平板法による)

供試菌株: *Proteus mirabilis* ..... 2 株  
*Proteus vulgaris* ..... 2 株  
*Morganella* ..... 2 株  
*Rettgerella* ..... 2 株  
*Providencia* ..... 2 株  
 計 10 株

Nitrofuran 剤	NA	PA	$\beta$ -Hydroxy PA
Nitrofurantoin	10/10*	10/10*	10/10*
Dihydroxymethylfuratrizine	0/10	0/10	0/10

\* 数字は陽性株数/供試株数

roxy PA は共通に、nitrofurantoin によつては拮抗作用をうけるが、dihydroxymethylfuratrizine によつては拮抗作用をうけないことが認められた (Fig. 2, Table 3)。

Fig. 2

Disc 法により *Proteus-Providencia* 菌群に対する Piromidic acid または  $\beta$ -Hydroxy PA の抗菌力に及ぼす nitrofurantoin 剤の影響を観察した一例

使用菌株: *Rettgerella* No. 2

中心ディスク:

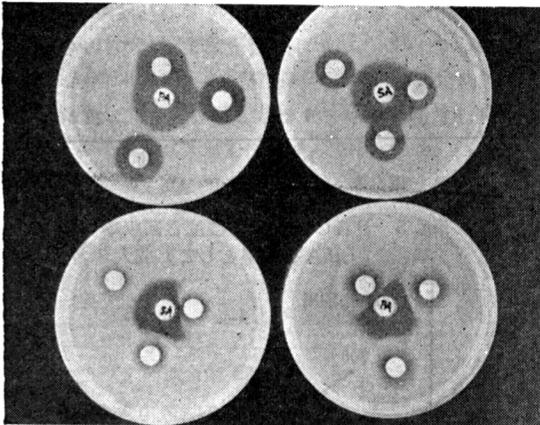
PA=Piromidic acid

SA=Substance A ( $\beta$ -Hydroxy PA)

周辺ディスク:

上段=dihydroxymethylfurazirizine

下段=nitrofurantoin



### 薄層カップ法による体液中濃度測定法

#### および測定成績

われわれ<sup>1)</sup>が Nalidixic acid などの合成化学療法剤を含めて体液中濃度測定法として、たびたび報告した薄層平板カップ法を用いた。

#### 1. 実験材料および実験方法

検定菌株: *Shigella flexneri* 3a 5184 (新潟県衛生研究所分与) および一部には *E. coli* KP を用いた。

培地: 感性ディスク用培地 (Mueller-Hinton 変法) を使用時 pH 6.5 に修正して用いた。

測定サンプル: 被検体として血清は pH 6.5 の 1/15 M phosphate buffer で 2 倍に、尿は同様 buffer で 20 倍に、胆汁は同様 buffer で 10 倍に希釈して用いた。標準サンプルとしては血清は薬剤を服用していない場合に採取した血清の pH 6.5 の 1/15 M phosphate buffer の 2 倍希釈液を、尿は buffer 溶液を用いて、PA の 20, 5, 1.25, 0.31, 0.078  $\mu\text{g/ml}$  含有の標準系列を調製した。一部には PA の活性代謝物として確認されている  $\beta$ -hydroxy 体についても標準系列を作製して用いた。

実験操作: 検定菌の 24 時間 broth 培養液を 0.1% の割に、50°C 前後に保つた溶解寒天培地に混和接種し、5ml ずつ水平に置かれた内径 90×90 mm のプラスチック

シャーレに分注して固めた。平板上にカップをたてサンプルを満たし、4 時間 4°C 前後に放置後 37°C に培養、12~16 時間後に出現した阻止円直径を計測した。

#### 2. 実験成績

薬剤濃度と阻止円直径の関係: 標準サンプルを用いに行なつた成績についての薬剤濃度と阻止円直径の関係は、Fig. 3 および Table 4 に示すように、薬剤の対数濃度と阻止円直径の間にはほぼ直線関係が成立した。したがって、未知濃度の測定は普通カップ法の方式が適用されると考えられた。その最低測定可能域は、PA,  $\beta$ -Hydroxy PA とともに 0.078 ( $\leq 0.1$ )  $\mu\text{g/ml}$  程度であつた。また、pH 6.5 buffer 溶液のほうが血液希釈よりもわずかに阻止円が大きく、また PA より  $\beta$ -Hydroxy PA が阻止円がわずかに大きい傾向がみられた。検定菌としては *Sh. flexneri* 3a 5184 のほうが *E. coli* KP に比し常に阻止円が鮮明な傾向があつたので、以下本株を用いることにした。

#### 3. 測定成績

次に、実際に PA を経口投与した場合の体液中 (血清, 尿, 胆汁) 濃度を、PA を基準として成人 3 名について測定した。

血清中濃度: 1,000 mg を経口投与した場合の血清中濃度は、Fig. 4 に示すように、ピークは 2~4 時間で最高 5.2~7.4  $\mu\text{g/ml}$  で、8 時間にわたり 1.2~3.2  $\mu\text{g/ml}$  の有効血中濃度の持続がみられた。

尿中濃度: また、1,000 mg 経口投与後の尿中活性濃度および回収率を測定した。その成績は Fig. 5 のように、最高 68~300  $\mu\text{g/ml}$  を示し、12 時間にわたり 16  $\mu\text{g/ml}$  以上の有効濃度の排泄がみられ、12 時間回収率

Table 4 薄層平板カップ法における薬剤濃度と阻止円直径 (mm) の関係  
検定菌: *Sh. flexneri* 3a 5184

薬 剤	濃度 $\mu\text{g/ml}$	被 検 体	
		M/15 Phosphate buffer pH 6.5	Plasma + Buffer (1:1)
PA	20	33.75 $\pm$ 1.15	34.00 $\pm$ 1.03
	5	28.10 $\pm$ 0.85	27.75 $\pm$ 0.89
	1.25	22.38 $\pm$ 0.53	22.00 $\pm$ 0.75
	0.31	17.05 $\pm$ 0.42	16.30 $\pm$ 0.47
	0.078	11.12 $\pm$ 0.63	9.90 $\pm$ 1.02
Substance A ( $\beta$ -Hydroxy PA)	20	38.50 $\pm$ 0.85	37.45 $\pm$ 1.10
	5	31.40 $\pm$ 1.01	30.08 $\pm$ 0.54
	1.25	25.25 $\pm$ 0.45	24.12 $\pm$ 0.78
	0.31	19.13 $\pm$ 0.52	18.43 $\pm$ 0.47
	0.078	11.05 $\pm$ 0.75	11.50 $\pm$ 0.98

8 枚の平板使用

Fig. 3

薄層平板カップ法における薬剤濃度と阻止円直径

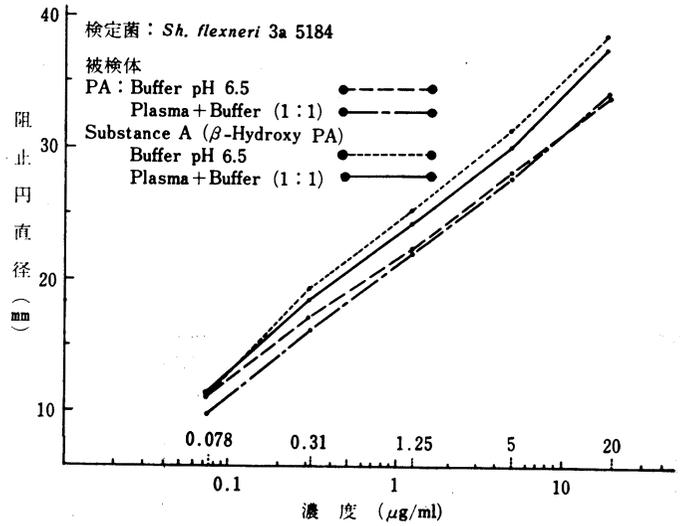


Fig. 4 PAの血中生物学的活性濃度 (PAを標準として) 成人3名

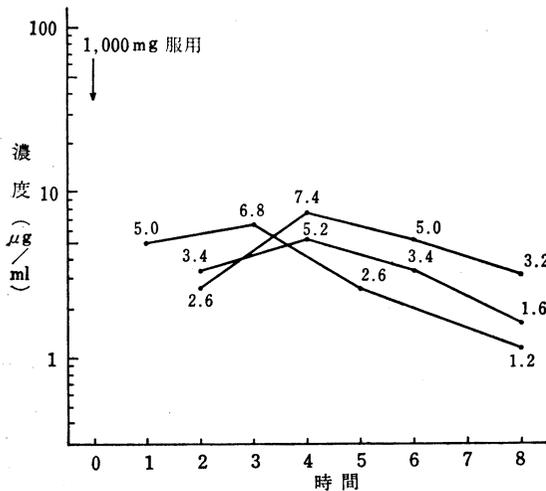


Fig. 5 PAの尿中活性濃度と回収率 (PAを標準として) 成人3名

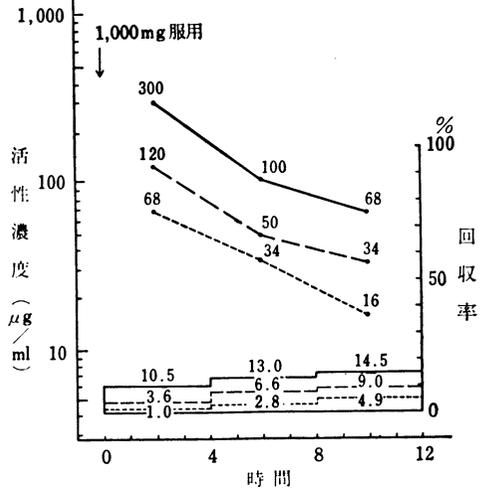
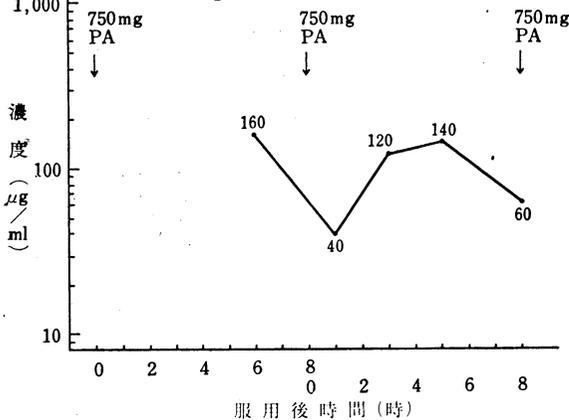


Fig. 6 胆汁内活性濃度 (PAを標準として)

胆汁瘻より採取  
750mg ずつ 8 時間ごと投与中



は 4.9~14.5% であつた。

胆汁中濃度: 750 mg 毎 8 時間服用中の胆汁 (胆汁瘻より採取) の活性濃度は, Fig. 6 のようで, 40~160 μg/ml であつた。

体液中における Piromidic acid 代謝物の検討:  
とくにその活性濃度の分離定量について

1. 原理

PA およびその代謝物の多くが酸性側でクロロホルム層によく移行する性質を利用して, 体液より PA およびその代謝物を抽出して濃縮, 既知の代謝物とともに蛍光クロマトシートにスポットとし, 薄層クロマトグラフィ (TLC) で展開し, 蛍光法でスポットを検出して代謝物の存在を確認し, さらに Bioautogram で生物学的活性濃度を分離定量した。

## 2. 実験方法

測定試料の調製法：血液，尿，胆汁より Table 5, 6, 7 の方法により PA および代謝物の抽出を行なった。

標準サンプルの調製：標準サンプルも薬剤を服用していない際に採取したヘパリン加血液，尿および胆汁に，PA および既知代謝物として入手しえた  $\beta$ -Hydroxy-PA, Substance N を加えて標準サンプルとした。

TLC 展開法： $\text{CHCl}_3$ - $\text{HCO}_2\text{H}$ - $\text{HCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$  (10 : 1 : 4) を展開溶媒として，Eastman chromatogram No. 6060 (蛍光含) をシートとして展開した。乾燥後に UV ランプ照射し，スポットを確認して記載した。

Bioautogram：測定平板としては，*Sh. flexneri* 3a 5184, 24 時間 broth 培養液を感性ディスク用培地に 0.1 % に接種して，角型平板プラスチックに分注し，ほぼ 1 mm の平らな寒天層を作製する (10×13 cm に 15 ml を分注した)。次いでクロマトシートを寒天平板上に密着させ，37°C に培養し，16 時間後にクロマトシートを寒天平板より取り去り，阻止帯の出現を観察した。

Table 5 血液よりの抽出法

ヘパリン加全血 2 ml  
|  
pH 4.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , citrate buffer 2 ml  
|  
 $\text{CHCl}_3$  4 ml  
|  
振盪 30分  
|  
遠沈 10分  
|  
 $\text{CHCl}_3$  層 2 ml をとる  
|  
濃縮乾固  
|  
 $\text{CHCl}_3$  0.1 ml に溶解  
|  
その 5  $\mu\text{l}$  をスポットする

Table 6 尿よりの抽出法

尿 2 ml  
|  
2N-HCl 1 滴  
|  
pH 1.0 KCl·HCl buffer 0.8 ml  
|  
 $\text{CHCl}_3$  4 ml  
|  
振盪 30分  
|  
遠沈 10分  
|  
 $\text{CHCl}_3$  層 3 ml をとる  
|  
濃縮乾固  
|  
 $\text{CHCl}_3$  0.5 ml に溶解  
|  
その 2  $\mu\text{l}$  をスポットする

Table 7 胆汁よりの抽出法

胆汁 2.5 ml  
|  
水 3.5 ml 添加  
|  
dil-HCl で pH 4.0 に調製  
|  
 $\text{CHCl}_3$  12 ml  
|  
振盪 30分  
|  
遠沈 10分  
|  
 $\text{CHCl}_3$  層 5 ml をとる  
|  
濃縮乾固  
|  
 $\text{CHCl}_3$  0.5 ml に溶解  
|  
その 3  $\mu\text{l}$  をスポットする

## 3. 実験成績

各体液について行なつて得た蛍光スポット，および Bioautogram による阻止帯を，各検体ごとに示すと Fig. 7 のようであつた。すなわち，血中からはおもに PA が，次いで  $\beta$ -hydroxy 体が，尿中からは  $\beta$ -hydroxy 体が最も多く，胆汁からは PA および  $\beta$ -hydroxy 体がそれぞれ抗菌作用の主体と考えられた。しかし，尿には Substance N に相当するスポットが明らかに証明された。さらに Fig. 7 に示されているように，いわゆる Substance B と称すべきスポットが PA~Substance N の Rf の間に PA に近く出現し，かなり抗菌力を示す場合のあることが明らかにされた。しかし，Substance B は純品として得られていないので，この点は今後の問題と考えられる。

## 4. 活性代謝物の分離定量法の検討

発育阻止帯と薬剤濃度の関係：ヘパリン加血液および尿に PA,  $\beta$ -Hydroxy PA を 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25  $\mu\text{g/ml}$  になるように加えて TLC 法で展開して，Bioautogram を行ない，出現した阻止帯の面積をプランメーターで 0.1  $\text{cm}^2$  まで測定した。その成績について，片対数方眼紙上に薬剤濃度を対数目盛で，阻止帯面積の平方根を整数目盛でプロットした。その結果は Fig. 8 に示すように，いずれの場合も両者の間にほぼ直線関係が成立することが認められた。

測定法：したがつて，被検体と標準サンプルを同時に処置して TLC を行ない，Bioautogram 上に出現した阻止帯面積を求め，標準サンプルについての標準曲線を求めて，その上に被検体面積に相当する被検体濃度を求めることができるわけである。

測定成績：上述の方式で PA 服用後の PA,  $\beta$ -Hydroxy PA の分離定量測定を行なった。なお，Substance B に相当すると思われる活性値は Substance B の標準

Fig. 7 PAの TLC-螢光法, Bioautogram による代謝物の検出

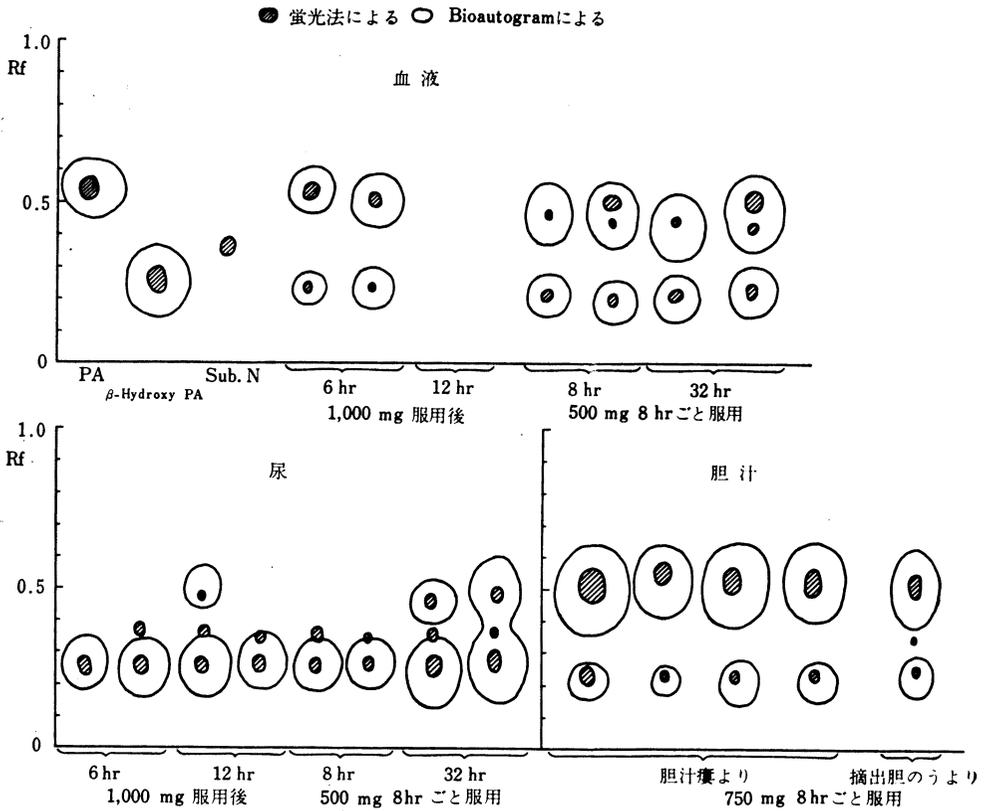


Fig. 8 薬剤濃度と TLC 展開 Bioautogram 上の阻止帯面積との関係

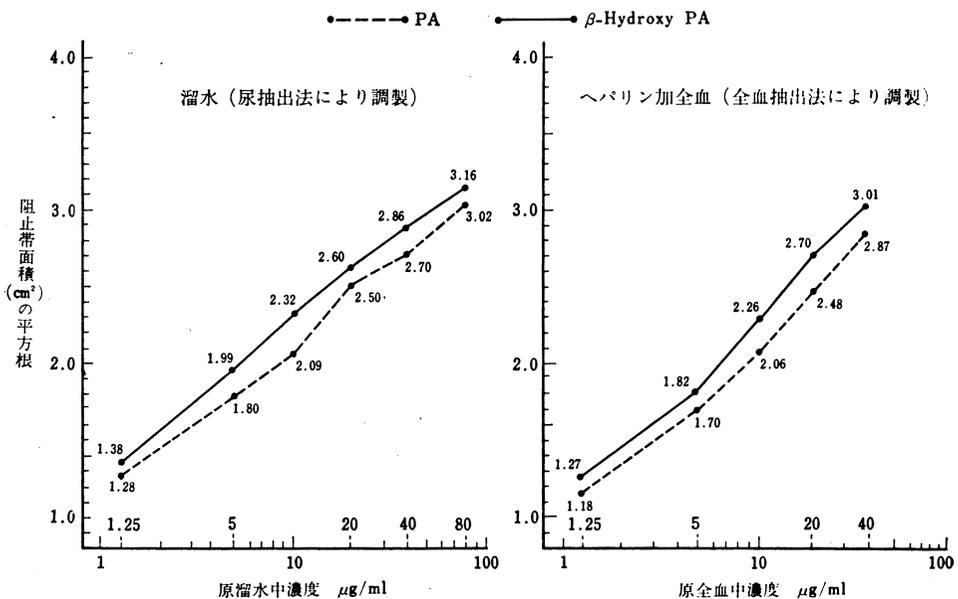


Table 8 PA 1,000 mg 服用後の血中各成分の測定値

時 間	6		12		備 考	
	No.1	No.2	No.1	No.2		
成 人						
成分およびその比	PA $\mu\text{g/ml}$	7.0	3.5	-	-	PAを基準にして測定* - : <0.5 $\mu\text{g/ml}$ - : <5 $\mu\text{g/ml}$ † - : <0.25 $\mu\text{g/ml}$ * * <i>Sh. flexneri</i> 3a 5184 を検定菌とする bioassay † UV ランプによる蛍光により判定
	Sub. B	-	-	-	-	
	Sub. N	-	-	-	-	
	Sub. A $\mu\text{g/ml}$	3.2	1.2	-	-	
	Sub. A / PA	0.45	0.34			

Table 9 PA 500 mg 8時間ごと服用中の血中成分測定および尿中各成分の測定値

時 間	血中成分測定				備 考	尿中成分測定				備 考	
	初回服用 8時間後		4回服用 8時間後			初回服用 8時間後		4回服用 8時間後			
	No.1	No.2	No.1	No.2		No.1	No.2	No.1	No.2		
成 人											
成分およびその比	PA $\mu\text{g/ml}$	}6.0 }7.0		}12 }16		PAを基準にして測定 - : <5 $\mu\text{g/ml}$ + : >250 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-	PAを基準にして測定 - : <10 $\mu\text{g/ml}$ + : >250 $\mu\text{g/ml}$
	Sub. B						-	-	160	280	
	Sub. N	-	-	-	-		+	+	+	+	
	Sub. A $\mu\text{g/ml}$	1.6	1.4	3.1	5.6		200	460	710	800	
	Sub. A/ PA+Sub. B	0.26	0.20	0.39	0.35		>8.0	>18	4.4	2.8	

Table 10 PA 1,000 mg 服用後の尿中各成分の測定値

時 間	6		12		備 考	
	No.1	No.2	No.1	No.2		
成 人						
成分およびその比	PA $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-	PAを基準にして測定* - : <10 $\mu\text{g/ml}$ - : <250 $\mu\text{g/ml}$ † * <i>Sh. flexneri</i> 3a 5184 を検定菌とする bioassay † UV ランプによる蛍光により判定
	Sub. B	-	-	-	-	
	Sub. N	+	-	+	-	
	Sub. A $\mu\text{g/ml}$	640	480	150	160	
	Sub. A/ PA+Sub. B	>25	>19	>6	>4	

Table 11 PA 750 mg 8時間ごと服用中の胆汁中各成分の測定値

採 取 時 間	3 回服用後 6~8 時間		4 回服用後 0~2 時間		5 回服用後 6~8 時間		3 回服用後 0~2 時間		備 考	
成 人										
成分およびその比	PA $\mu\text{g/ml}$	}170 }		}68 }		}160 }		}80 }		PAを基準として測定* - : <5 $\mu\text{g/ml}$ † * <i>Sh. flexneri</i> 3a 5184 を検定菌とする bioassay † UV ランプによる蛍光により判定
	Sub. B									
	Sub. N	-	-	-	-	-	-	+	?	
	Sub. A $\mu\text{g/ml}$	26	16	32	28	22				
	Sub. A/PA +Sub. B	0.15	0.23	0.20	0.35	0.32				
	case 1				case 2					

が目下入手不能であるので、一応 PA を標準として表現した。

また、全活性値中における  $\beta$ -Hydroxy PA と PA (Substance B を含めて) の割合を算出した。その値は Table 8, 9, 10, 11 に示すようで、血中では  $\beta$ -Hydroxy PA は PA (Substance B を含めて) の  $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{2}$  程度、尿中では 3~25 倍、胆汁では  $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{2}$  程度であった。

### 考 案

Nalidixic acid と類似構造を有し、グラム陰性桿菌に抗菌力を有する PA に検討を加えた。とくに本剤は清水ら<sup>9)</sup>によりその生体内代謝物についてある程度明らかにされているので、入手しえた Substance A ( $\beta$ -Hydroxy PA) および Substance N についても並行して実験をすすめた。

抗菌力については寒天平板希釈法での成績は *Pseudomonas*, *Klebsiella* を除くグラム陰性桿菌に *Proteus-Providencia* 菌群を含めて、MIC 25  $\mu$ g/ml 以下の抗菌力を示し、さらに生体内代謝物として重視されている  $\beta$ -Hydroxy PA はいつそう強い抗菌力を呈した。したがって、*Proteus-Providencia* 菌群を含めたグラム陰性桿菌に有力な薬剤の少ない今日、本剤のこの方面での有効性が期待される。しかし、一面抗ブドウ球菌作用は、PA では MIC はかなり強力であるが、その生体内活性代謝物として有力な  $\beta$ -Hydroxy PA の抗菌力は PA に比してやや減弱することが明らかにされたので、*in vivo* における抗ブドウ球菌作用はやや割引して考える必要があるかもしれない。

抗菌作用に関連した事項として、われわれ<sup>2,9)</sup> は、さきに Nalidixic acid の *Proteus-Providencia* 菌群に対する抗菌作用が、特定の nitrofurantoin 剤により拮抗される現象をみだしたが、本剤および主要代謝物である  $\beta$ -hydroxy 体も全く同様な現象を示した。したがって、本剤の作用機序は Nalidixic acid とほぼ共通であろうと推定される。

次いでわれわれが Nalidixic acid を含めて多くの合成化学療法剤の濃度測定に用いられることを報告した薄層平板カップ法に、*Sh. flexneri* 3a を検定菌として用いることにより、本剤および体内活性代謝物として重要な  $\beta$ -Hydroxy PA を 0.1  $\mu$ g/ml 以上を容易に測定しうることを確かめた。

本剤 1,000 mg 服用後は、血中で 6 時間以上にわたり、また尿中では 12 時間以上にわたり活性値がみられ、尿中濃度は血中濃度の 10 倍以上で、胆汁中にも血中濃度の数倍以上の活性値が証明された。

複合合成剤の体内分離定量については、村川ら<sup>9)</sup>、藤井ら<sup>9)</sup>により TLC による分離定量法が報告されてい

る。われわれは今日代謝物の分離定量法を本剤について試みた。基本的検討として Bioautogram 上における阻止帯の面積の対数と含有濃度の対数が並行関係にあることを確かめたので、この関係を利用して容易に代謝物の未知濃度が測定可能となつた。

複合薬剤の分離定量では元来異なる薬剤であるので、阻止帯は分離して正円形をえやすいと考えられるが、今回のような代謝物の分離定量では、その性状が著しく近いものの検討であり、TLC 展開後の阻止帯が必ずしも正円形とはなりがたいことがあると考えられる。したがって、プランメーターによる面積測定はこのような検討の際に十分応用しうるものと考えられる。

本剤内服後の体液(血液、尿、胆汁)について、PA および入手しえた代謝物としての  $\beta$ -Hydroxy PA、Substance N を標準として、TLC 展開後蛍光法および Bioautogram を併用してこの点の検討を行なつた。その結果は上述のように、血中からは PA が  $\beta$ -Hydroxy PA の数倍程度、尿ではその関係が逆になり、胆汁では PA が  $\beta$ -hydroxy 体をやや上回る成績であった。また、Substance N に相当するものがおもに尿中に証明されたが、*in vivo* 抗菌力は望むべくもないほど活性は低いと考えられた。以上の成績は清水ら<sup>9)</sup>がおもにラットについて行なつた成績とほぼ一致するものであつたが、胆汁内の PA と  $\beta$ -Hydroxy PA との関係は必ずしも一致しなかつた。これは試験生体の差も除外しえないが、われわれの胆汁採取症例が多少とも肝、胆道系に機能障害を伴つていたという止むをえない、むしろ化学療法の対象となる可能性のある条件下のためかとも考えられた。また、一部の体液にいわゆる Substance B に相当する活性部分が明らかにされたので、将来その標準品をえてその活性部分を検討追加できるよう要望される。

いずれにしても本剤が生体内で  $\beta$ -Hydroxy PA となり、抗菌力が増強されるということは、抗菌剤の抗菌力と臨床効果の関連を生体内代謝物を通じて観察することの必要性を強く示すものと考えられる。したがって、臨床的感受性測定法としてのディスク法などでは今後代謝物をも考慮して調製されるようにする必要がある。

### 結 語

グラム陰性桿菌におもに抗菌力を有する新合成化学療法剤である Piromidic acid についての基礎的検討を行なつた。

1) 寒天平板希釈法により 13 種、67 株の細菌に対し、MIC を測定して抗菌力を検した。*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus-Providencia* に対しては MIC 25  $\mu$ g/ml 以下のかんりの抗菌力を示したが、*Klebsiella* には MIC 100  $\mu$ g/ml 以下でやや劣り、*Pseudomonas*

には MIC 400  $\mu\text{g/ml}$  以上で抗菌力は弱かった。*Staphylococcus* にも MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以下のかんりの抗菌力を示した。

2) 本剤の生体内代謝物として明らかにされている  $\beta$ -Hydroxy PA と Substance N の抗菌力を PA のそれと比較した。 $\beta$ -Hydroxy PA はグラム陰性桿菌に対して、PA に比し 2~4 倍の抗菌力増強を示したが、*Staphylococcus* に対しては、2 倍程度抗菌力は減弱した。Substance N は MIC 200  $\mu\text{g/ml}$  以上で抗菌力は著しく弱かった。

3) 本剤および  $\beta$ -Hydroxy PA の *Proteus-Providence* 菌群に対する抗菌力は、特定の nitrofurantoin (たとえば nitrofurantoin) により拮抗されることが認められた。

4) 体液中濃度測定法として *Sh. flexneri* 3a 5184 株を検定菌とする薄層平板カップ法が適用され、その測定下限は PA,  $\beta$ -Hydroxy PA とともに 0.1  $\mu\text{g/ml}$  程度であった。本法により本剤を経口投与した際の体液中濃度を測定した。1,000 mg 経口投与後の血中濃度は、最高 5.2~7.4  $\mu\text{g/ml}$  で、8 時間にわたり 1.2  $\mu\text{g/ml}$  以上の活性値がみられた。同様投与後の尿中濃度は最高 300  $\mu\text{g/ml}$  で、12 時間にわたり 16  $\mu\text{g/ml}$  以上の活性値がえられ、12 時間回収率は 5~15% であった。胆汁にも最高 160  $\mu\text{g/ml}$  の活性濃度の排泄が認められた。

5) 本剤の代謝物として明らかにされている  $\beta$ -Hydroxy PA および Substance N を標準として、TLC 法に蛍光法および Bioautogram を併用して体液中における代謝物の分離検出を行なった。その際 Bioautogram における阻止帯の面積の平方根と薬剤濃度の対数の間に直線関係が成立した。したがって、本法により代謝物の活性濃度の測定が可能であった。その結果 PA (ただし一部 Substance B を含む) と  $\beta$ -Hydroxy PA の割合は、血中では 2~5:1、尿中では 1:3~25、胆汁では 2~7:1 程度であった。

おわりに PA および一部代謝物を提供された大日本製薬総合研究所、胆汁採取にご協力いただいた新潟大学外科加藤 清博士に厚く感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 金沢 裕, 倉又利夫: サルファ剤の生物学的活性濃度測定法ならびに 2, 3 サルファ剤についての測定成績。Chemotherapy 8 (5): 478~485, 1960
- 2) 金沢 裕, 倉又利夫: Nalidixic acid の基礎的検討 (第 2 報)。Chemotherapy 14 (1): 39~42, 1966
- 3) 金沢 裕, 倉又利夫: *Proteus-Providence* 菌群に対する Nalidixic acid と nitrofurantoin 系薬剤の拮抗作用。日本細菌学会雑誌 21 (4): 210~216, 1966
- 4) 清水当尚, ほか: 新抗菌剤 Piromidic acid の研究 I. 抗菌作用, II. 吸収, 分布, 排泄および代謝。Chemotherapy 19 (5): 379~393, 1971
- 5) 村川武雄, 西田 実, 五島瑤智子, 藤井良知, 紺野昌俊: AB-Pc と MCI-Pc の thin layer chromatography-bioautography 系による分離定量。第 17 回日本化学療法学会総会, 大阪, 1969 年 4 月
- 6) 藤井良知, 紺野昌俊, 岡田一郎, 熊谷道彦, 吉田昭雄, 松崎明紀: Aminobenzyl-Pc, methylchlorphenylisoxazolyl-Pc 合剤の分離定量に関する研究。Chemotherapy 17 (8): 1620~1627, 1969
- 7) Y. KANAZAWA & T. KURAMATA: Agar-plate diffusion method for the assay of micro-biologically active concentration of synthetic chemotherapeutic agents in body fluids. 5th International Congress of Chemotherapy, Vienne 1967 Suppl.
- 8) M. SHIMIZU, et al.: Piromidic acid, a new antibacterial agent. Antimicrob. Agent & Chemother. -1970: 117~128, 1971

FUNDAMENTAL AND CLINICAL STUDIES ON PIROMIDIC ACID  
(1 ST REPORT)-WITH SPECIAL REFERENCE TO  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ACTIVE LEVELS AND  
QUANTITATIVE DETERMINATION OF SEPARATE ACTIVE  
METABOLITES LEVELS IN BODY FLUIDS

YUTAKA KANAZAWA and TOSHIO KURAMATA  
Department of Internal Medicine and Department of Pharmacy,  
Niigata Railway Hospital

Fundamental studies on a new synthetic chemotherapeutic agent, piromidic acid were performed with the results which may be summarized as follows:

1) In a study by the agar plate dilution method on a total of 67 strains of 13 species, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* and *Proteus-Providencia* were found to be fairly sensitive to the agent with the MICs of 25  $\mu\text{g/ml}$  or less. *Klebsiella* was slightly sensitive to it with the MICs of 100  $\mu\text{g/ml}$  or less. *Pseudomonas* was found to be resistant with the MICs of more than 400  $\mu\text{g/ml}$ . *Staphylococci* were fairly sensitive to it with the MICs of 25  $\mu\text{g/ml}$  or less.

2) The antimicrobial activities of  $\beta$ -hydroxypiromidic acid and substance N (5, 8-Dihydro-8-ethyl-5-oxo-2-aminopyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acid) which had been known to be its metabolites were compared with those of piromidic acid.  $\beta$ -Hydroxypiromidic acid showed 1 to 4 times higher activities against Gram-negative rods but 2 times or more lower activities against *Staphylococcus* than piromidic acid. Substance N showed considerably lower activities with the MICs of more than 100  $\mu\text{g/ml}$ .

3) An antagonistic effect was observed between piromidic acid or  $\beta$ -hydroxypiromidic acid and certain nitrofurantoin derivative (*e. g.* nitrofurantoin) in the antimicrobial activity against the group of *Proteus-Providencia*.

4) By the thin-layer cylinder-plate method using *Sh. flexneri* 3a 5184 as the test organism, active concentrations in the body fluids were assayable to the lower limit of 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . Following a single oral administration of 1,000 mg piromidic acid, the blood peak levels of 5.2~7.4  $\mu\text{g/ml}$  were observed at 3~4 hours with the persistence of more than 1.2  $\mu\text{g/ml}$  over ensuing 8 hours. Urinary levels were 68~300  $\mu\text{g/ml}$  and urinary recovery was 5~15% during 12 hours. It was also excreted in the bile at its maximum concentration of 160  $\mu\text{g/ml}$ .

5) The metabolites of the agent in the body fluids were separated and identified by means of a thin-layer-chromatographic method combined with fluorescent and bioautographic technique using piromidic acid,  $\beta$ -hydroxypiromidic acid and substance N as the standard compounds.

In the experiment, there existed a linear relationship between the logarithmic concentration of the drug and the square root of dimension of inhibition zones in the bioautogram. Consequently, its each active metabolite seemed to be assayable quantitatively by this method.

The approximate ratio of piromidic acid (including some of Substance B) and  $\beta$ -hydroxypiromidic acid thus obtained were 2 to 5 : 1 in the blood, 1 : 3 to 25 in the urine and 2 to 7 : 1 in the bile, respectively.