

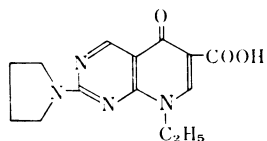
合成化学療法剤 Piromidic acid に関する細菌学的研究

中澤昭三・石山正光・大塚 博・笹瀬和子・西ヶ谷芳子

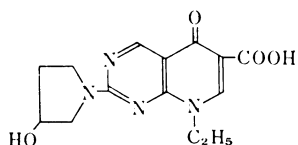
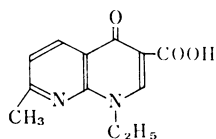
京都薬科大学微生物学教室

Piromidic acid (以下PAと略す)は1970年大日本製薬総合研究所において開発された合成化学療法剤で、その化学名は5,8-Dihydro-8-ethyl-5-oxo-2-pyrrolidinopyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylic acidである。

今回私どもは、類似の合成化学療法剤である Nalidixic acid (以下NAと略す)を対照薬剤として本剤の細菌学的研究を行なったので報告する。



Piromidic acid

 β -Hydroxy-piromidic acid

Nalidixic acid

実験方法

(1) 抗菌スペクトラム

常法の日本化学療法学会感受性測定法に従い、教室保存の標準菌種40株についてその感受性(MIC mcg/ml)測定を行なった。レンサ球菌群, 肺炎球菌群, ジブテリア菌については10%馬血液加寒天培地を, クロストリジウム属についてはT.G.C.培地を, ナイセリア属についてはG・C培地を使用した。

(2) 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料より分離されたブドウ球菌98株, 大腸菌25~31株について上記同様そのMICを測定し, その感受性分布を調べた。

(3) 水溶液の安定性

PA, NAともに1mcg/mlの水溶液を作製し, 5°C, 37°C, 室温で30日間 *Escherichia coli* NIH JC株を

試験菌とし, 液体希釈法によりその力価の減少を検討した。

(4) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地のpH, 接種菌量, 血清添加の影響を, PAのほうは *Staphylococcus aureus* 209-P JC および *Escherichia coli* NIH JC株を, NAは *Escherichia coli* NIH JC株を試験菌として検討した。なお, pH, 血清の検討には液体希釈法を用い, 一方接種菌量の検討は寒天平板希釈法により実施した。

(5) 抗菌作用型式の観察

PAは *Staphylococcus aureus* 209-P JC および *Escherichia coli* NIHにつき, またNAは *Escherichia coli* NIHについてbrain heart infusion培地を使用し, いずれの試験菌も対数期 logarithmic phaseの途上において種々の濃度の薬剤を加え, 以後経時的に2, 4, 6, 8, 24および48時間後の生菌数を37°C 24時間寒天平板培養によって測定した。

(6) PAの生体内代謝物 β -Hydroxypiromidic acid (以下PA-OHと略す) 抗菌スペクトラム

Heart infusion mediumを用い教室保存の標準菌種について液体希釈法によつてその抗菌力(MIC)を測定した。

(7) マウス実験の大腸菌感染症に対する治療実験

Escherichia coli NIH株の37°C 24時間寒天培養したものを生理食塩水に浮遊し, 6%ムチンと当量混合し, その4~5 LD₅₀をマウスに腹腔攻撃した。そして2時間後種々の濃度のPA, NAおよびPA-OHを0.5% CMCに懸濁させ経口投与し, その生存率を観察, そのED₅₀も概算した。

実験結果

抗菌スペクトラムはTable 1, 2に示すとおりである。すなわち, PAはブドウ球菌に対し12.5~25mcg/mlと弱いながら抗菌力を有しているが, NAは全く無効である。また, グラム陽性桿菌のバシラス属に対してはPA, NAともに3.12~12.5mcg/mlとほぼ同程度の抗菌力が認められた。また, 陰性球菌のナイセリア属については0.39~1.56mcg/mlの抗菌力をPA, NAともに有するが, 陰性桿菌に対してはブドウ球菌とは反対にPAよりNAのほうが約2~4倍その抗菌力が強いこ

とが認められた。

臨床分離株の感受性分布については Fig. 1, 2 に示すとおりである。すなわち、ブドウ球菌 98 株については PA は 50 mcg/ml にピークを示し、前述した教室保存の標準株の示す MIC より 4 倍程度感受性が悪かつた。また大腸菌についてはそのピークをみると、PA 25~50 mcg/ml, NA 6.25 mcg/ml と NA のほうが約 4 倍すぐれた感受性分布を示した。

水溶液の安定性については Fig. 3, 4 に示すとおりで、PA, NA とともにそれぞれ 30 日, 60 日間の観察では 5°C, 37°C, 室温保存ともに全く安定で、この間の力価の減少は全く認められなかつた。

抗菌力に及ぼす諸因子の影響の中で、培地の pH については Fig. 5, 6 に示すとおり PA はブドウ球菌、大腸菌ともに酸性側で著明な抗菌力の増強が認められない。大腸菌で試験した NA も同様の傾向が認められた。次に接種菌量の影響については Fig. 7, 8 に示すとおりで、PA はブドウ球菌、大腸菌ともに 10⁸ 個/ml 以上で 1 段階抗菌力の減弱がみられたが、それほど大きな影響は受けなかつた。また NA もほぼ同様であつた。人血清添加による抗菌力の影響については Fig. 9, 10 に示すとおり PA はブドウ球菌、大腸菌ともに 1% 血清添加まで抗菌力の変動は受けないが、それ以上ではかなり抗菌力の減弱がみられた。対照の NA も同傾向であつた。

抗菌作用型式については Fig. 11, 12, 13 に示すとおりブドウ球菌に対し PA は低濃度で静菌作用がみられるが、MIC 以上の濃度ではかなりの殺菌作用 bactericidal action がみられた。また、大腸菌については PA, NA とともに各濃度段階に応じかなり顕著な殺菌作用を認めたが、MIC 以下の濃度では両剤とも再び数時間後に菌の増殖を許した。

PA の代謝物である PA-OH の抗菌スペクトラムは Table 3 に示すとおりブドウ球菌については PA 12.5 mcg/ml, PA-OH 50~100 mcg/ml, NA ≥ 100 mcg/ml と抗菌力は弱くなっているが、種々のグラム陰性桿菌については、たとえば大腸菌に対し PA 12.5, PA-OH 6.25, NA 6.25 と NA と全く同一の抗菌力を認めた。

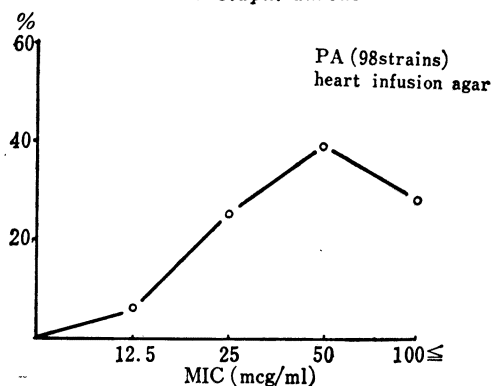
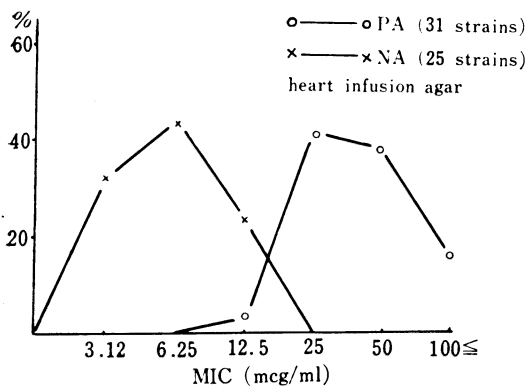
Table 1 Antibacterial spectrum of PA against gram-positive organisms

Test organisms		PA	NA
Cocci	<i>Staph. aureus</i> 209-P	25	200
	<i>Staph. aureus</i> Smith	12.5	25~50
	<i>Staph. aureus</i> Terashima	25	200
	<i>Staph. aureus</i> Neumann	12.5	200
	<i>Staph. aureus</i> E-46	25	200
	<i>Staph. albus</i>	100	>200
	<i>Strepto. hemolyticus</i>	200	200
	<i>Strepto. faecalis</i>	>200	>200
	<i>Strepto. viridans</i>	>200	>200
	<i>Diplo. pneumoniae</i> I	>200	>200
	<i>Diplo. pneumoniae</i> II	>200	>200
	<i>Diplo. pneumoniae</i> III	>200	>200
	<i>Cory. diphtheriae</i>	100	>200
	<i>Sarcina lutea</i>	>200	>200
Bacilli	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25	3.13
	<i>Racillus anthracis</i>	3.13~6.25	12.5
	<i>Clostridium tetanii</i>	100	100
	<i>Clostridium welchii</i>	>100	100
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 607	>200	>200

Table 2 Antibacterial spectrum of PA against gram-negative organisms

Test organisms		PA	NA
Cocci	* <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.56	0.78
	* <i>Neisseria meningitidis</i>	0.78	0.39
Bacilli	<i>E. coli</i> NIH JC	25	6.25
	<i>E. coli</i> NIH	25	3.12~6.25
	<i>E. coli</i> Ikaken	0.39~0.78	0.78~1.56
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	25~50	12.5~25
	<i>Salmonella typhosa</i> T-287	6.25~12.5	3.12~6.25
	<i>Salmonella typhosa</i> O-901	6.25~25	3.12
	<i>Salmonella enteritidis</i>	100 ≤	200
	<i>Salmonella paratyphi</i> A	12.5~25	12.5~50
	<i>Salmonella paratyphi</i> B	50	6.25~25
	<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	25	6.25
	<i>Shigella flexneri</i> 2a	12.5~25	6.25
	<i>Shigella flexneri</i> Komagome	12.5~25	1.56~3.12
	<i>Shigella boydii</i> EW-28	6.25	1.56~3.12
	<i>Shigella sonnei</i> EW-33	6.25	1.56~3.12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	200 <	200 <
	<i>Proteus morgani</i> Kono	25~50	3.12~6.25
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	12.5	6.25~12.5	
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	50	6.25~12.5	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5	3.12~6.25	

Heart infusion agar medium 37°C 24 hrs. *G · C medium

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolated *Staph. aureus*Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolated *E. coli*Table 3 Antibacterial spectrum of β -Hydroxy PA against various strains

Test organisms	PA	β -Hydroxy PA	NA
<i>Staph. aureus</i> 209-P JC	12.5	50~100	100≤
<i>Staph. epidermidis</i>	100≤	100≤	100≤
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25	3.12	3.12
<i>E. coli</i> NIH	12.5	6.25	6.25
<i>Salmonella typhosa</i> T-287	6.25~12.5	3.12	3.12
<i>Salmonella enteritidis</i>	100≤	100≤	100≤
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	6.25	3.12	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.25	3.12	3.12
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	3.12	3.12	3.12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	100≤	100≤	100≤

Tube dilution method: heart infusion medium 37°C 24 hrs.

また代謝物の臨床分離大腸菌に対する感受性分布は Fig. 14 に示すとおり PA と NA の中間に位置し、かなり NA に近づいていることが認められた。

Fig. 3 Stability of PA aqueous solution

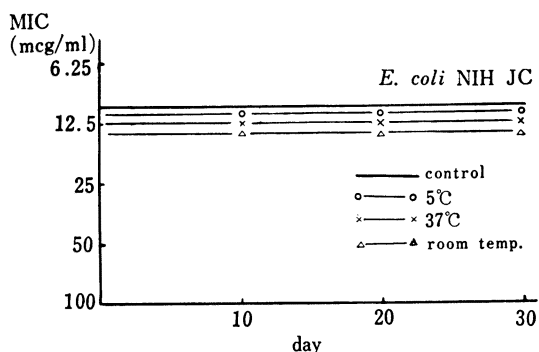
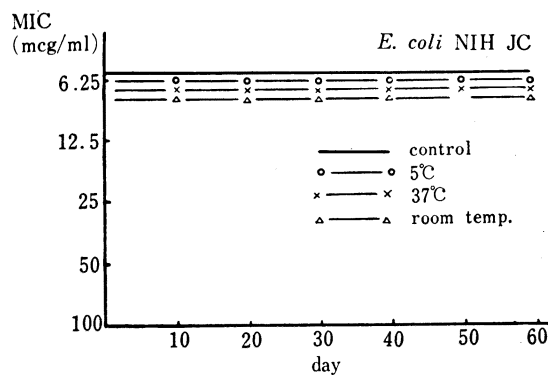


Fig. 4 Stability of NA aqueous solution



マウス実験の大腸菌感染症に対する治療実験は Fig. 15, 16, 17 に示すとおり *in vitro* と同様 PA より NA のほうがかなりすぐれた成績を示している。しかし、PA の代謝物である PA-OH と NA を比較すると、両剤とも ED₅₀ 0.4~0.6 mg/mouse と全く同程度の *in vivo* 抗菌力が認められた。

総括および考案

1970年大日本製薬総合研究所で開発された新しい国産の合成化学療法剤 Piromidic acid (PA) について、構造類似の既知合成化学療法剤 Nalidixic acid (NA) を比較薬剤として、その細菌学的評価を行なったところ、本剤は NA と同様におもにグラム陰性菌群に感受性を示すが、更にグラム陽性菌の一部である

ブドウ球菌に対しても感受性を示し、この点で NA とやや異なつた抗菌スペクトラムを有するといえる。しかしながら、その抗菌力はグラム陰性菌では NA の 1/2~1/4

Fig. 5 Effects of pH on antibacterial activities of PA

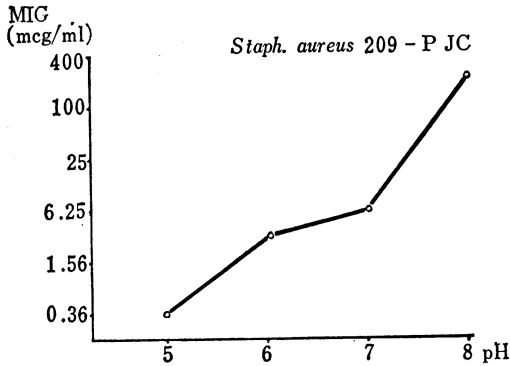


Fig. 6 Effects of pH on antibacterial activities of PA and NA

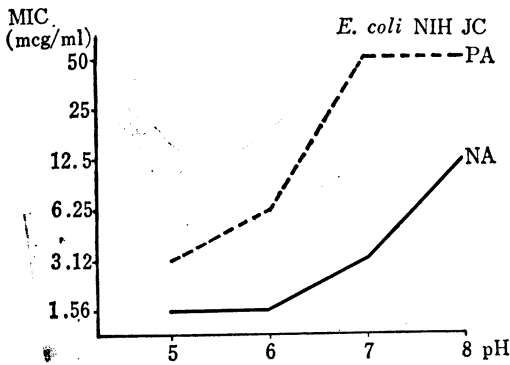


Fig. 7 Effect of inoculum on antibacterial activity of PA and NA

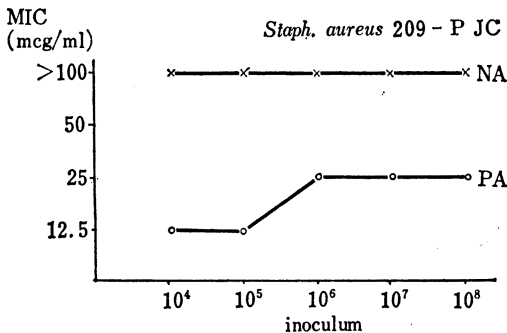


Fig. 8 Effect of inoculum on antibacterial activity of PA and NA

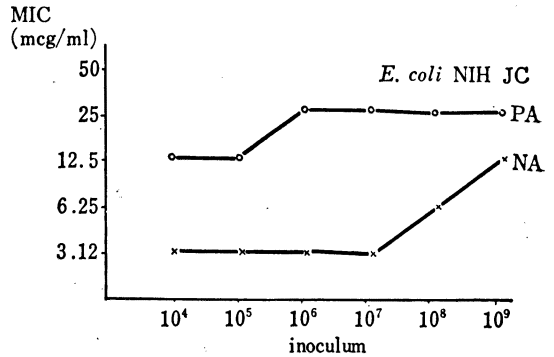


Fig. 9 Effects of human serum on antibacterial activities of PA

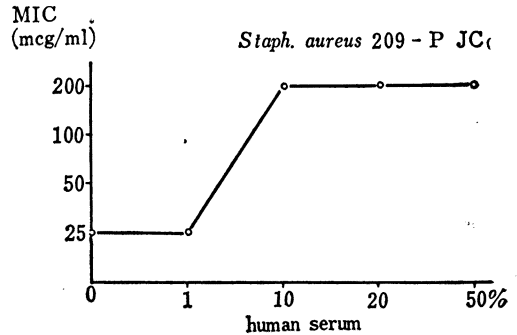
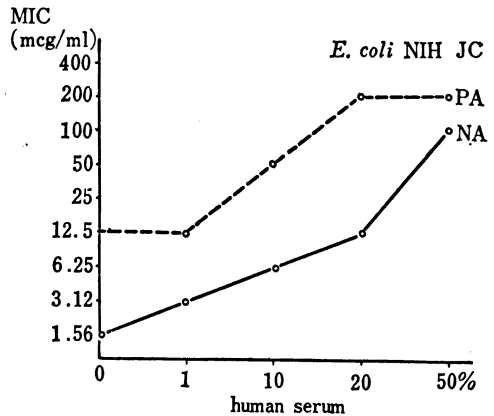


Fig. 10 Effects of human serum on antibacterial activities of PA and NA



程度でやや弱く、ブドウ球菌に対する抗菌力も強効とはいえない。そのことは患者分離の臨床分離株であるブドウ球菌 98 株、大腸菌、数 10 株について検討した感受性分布の成績をみても明らかである。本剤は NA と同様非常に安定で、1 カ月間の 5°C あるいは室温、また 37°C

保存においても全く力価は減少しなかつた。抗菌力に及ぼす培地 pH、接種菌量、人血清蛋白の影響は NA とほとんど同様な傾向を示した。また本剤の *in vitro* の抗菌作用型式はブドウ球菌に対しては MIC 以上では殺菌的であり、それ以下では静菌的な作用が認められ

Fig. 11 Bactericidal effect of PA against *Staph. aureus* 209-P JC

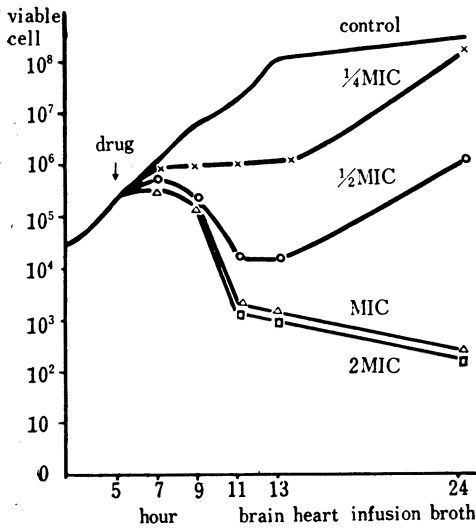


Fig. 12 Bactericidal effect of PA against *E. coli* NIH

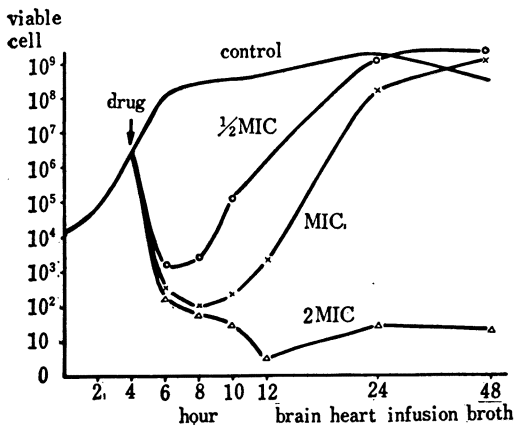


Fig. 13 Bactericidal effect of NA against *E. coli* NIH

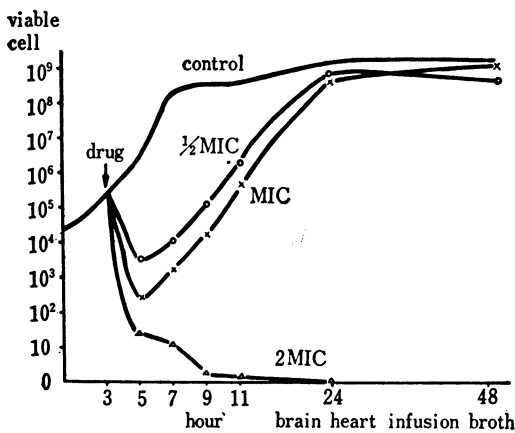


Fig. 14 Sensitivity distribution of clinical isolates of *E. coli* (30 strains)

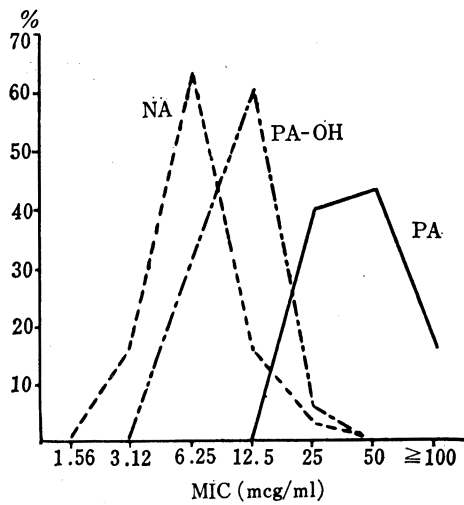


Fig. 15 Activity of PA in experimental *E. coli* infections in mice

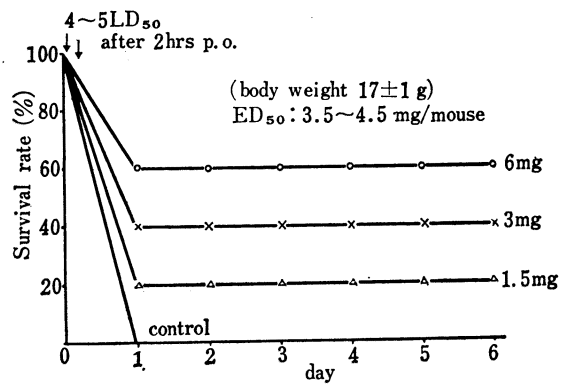


Fig. 16 Activity of PA-OH in experimental *E. coli* infections in mice

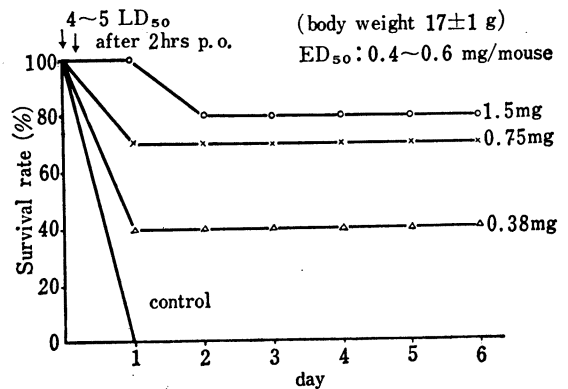
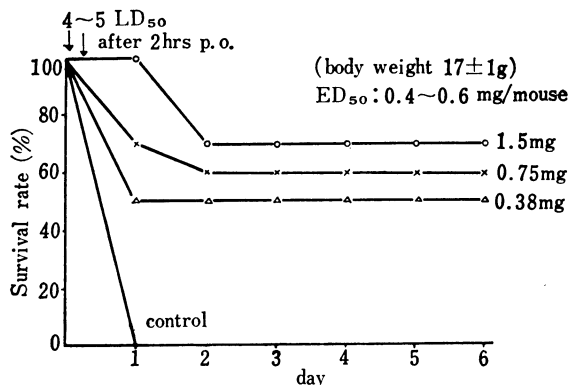


Fig. 17 Activity of NA in experimental *E. coli* infections in mice



た。また大腸菌に対してはNAと同様に 2MIC では顕著な殺菌作用が認められたが、MIC 以下の濃度では mutant が選択されて生き残り、再び増殖してきた。このことはNAについても同様に認められ、両剤の *in vitro* での耐性獲得が比較的早いことと一致している。次に PA をヒトに投与したときに得られる代謝物 PA-OH は、ブドウ球菌に対する抗菌力はPAより減弱するが、逆に大腸菌をはじめグラム陰性桿菌に対する感受性

はPAより一段と強力となり、NAと同程度まで近づくことが標準菌や臨床分離大腸菌で証明することができた。そして、更にこのことはマウス実験の大腸菌感染症における治療実験においても平行した結果が得られた。このことは本剤が *in vitro* においてNAよりやや劣る抗菌力を示すにもかかわらず、臨床的にはNAと同等の効果をあげていることの大きな原因の一つとも考えられ、非常に興味深い。今後、本剤の主体内薬物代謝の研究と相まって更に多くの動物治療実験を行ない、検討して行きたいと思う。

参考文献

- 1) 中澤昭三, 中村敏子, 丹羽能子, 余公元子: 新化学療法剤 Nalidixic acid に関する基礎的研究。Chemotherapy 13 (3): 139~145, 1965
- 2) 中澤昭三, 横田芳武, 石田邦子, 石田博一, 大谷光道, 吉田進彦: Nalidixic acid および Lincosycin と既知化学療法剤との併用効果。Chemotherapy 15 (2): 160~164, 1967
- 3) 中澤昭三, 小野尚子, 大槻雅子, 井澤武年: 合成セファロスポリン Cefazolin の細菌学的評価。Chemotherapy 18 (5): 512~520, 1970

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON PIROMIDIC ACID, A NEW SYNTHETIC CHEMOTHERAPEUTICS

SHOZO NAKAZAWA, MASAMITSU ISHIYAMA, HIROSHI OHOTSUKA,
KAZUKO SASASE and YOSHIKO NISHIGAYA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Piromidic acid is a new synthetic chemotherapeutics developed at Research Laboratories of Dainippon Pharmaceutical Co. in 1970. *In vitro* and *in vivo* studies on the anti-microbial action of piromidic acid have been carried out and the following results were obtained:

- 1) It was active primarily against gram-negative bacteria and *Staphylococci*.
- 2) Cross-resistance was not observed between piromidic acid and antibiotics but observed between piromidic acid and nalidixic acid.
- 3) The anti-microbial activity tended to increase when the pH of culture increased in relative acidity.
- 4) Piromidic acid was apparently bactericidal *in vitro* at or above the minimal inhibitory concentration.
- 5) In the studies with mice experimentally infected with *Escherichia coli*, piromidic acid and β -hydroxypiromidic acid showed the curative effects which were parallel with respective minimal inhibitory concentration values, their ED_{50} being found no more or less than that of nalidixic acid.