

Piromidic Acid の基礎的、臨床的検討 (第 2 報)

とくに感受性ディスク法ならびにその臨床応用

金 沢 裕

新潟鉄道病院内科

倉 又 利 夫

同 薬 剤 科

(昭和 46 年 7 月 29 日受付)

新合成化学療法剤である Piromidic acid^{5,6)}(以下, PA と略記)について、われわれは⁴⁾ききにその抗菌力、またその主要生体内代謝物である β -Hydroxypiromidic acid, Substance N の抗菌力、さらに生体内活性代謝物の分離定量法について報告した。今回は本剤使用の際に臨床検査として必要な感受性ディスク法に検討を加え、さらに少数ではあるが尿路感染に使用したので、その成績を報告する。

感受性ディスク法に関する検討

PA のように新しく出現した薬剤の臨床的感性、耐性に相当する最小発育阻止濃度 (MIC) の基準は全く不明で、多くの起因菌についての MIC と薬剤投与による臨床効果の集計の上に、将来定められるべきものであり、必ずしも根拠の明らかでない薬剤量を含有するディスクにより +, - などの成績のみが検査室から天下り的に臨床家におしつけられるべきものではなく、適当に規定された実験条件での MIC を推定することが臨床的感性検査の目的と考えられる。われわれ¹⁻³⁾は、単一ディスク (single disc) を用いる定量測定をふくめて、化学療法剤の感受性測定法についてたびたび報告してきた。今回は PA についても本法が適用されるか、とくに本剤は生体内活性代謝物が臨床効果に大きく影響すると思われるので、活性代謝物をも含有するディスクの調製についてもとくに検討した。

実験材料ならびに実験方法

培地：つぎのような組成の粉末寒天培地 (感性ディスク用培地, MUELLER-HINTON 変法) を用いた。

Heart infusion	300 ml
Casamino acid	16.5 g
Starch	1.5 g
Glucose	2.0 g
L-Tryptophane	50 mg
L-Cystine	50 mg
Biotin	0.005 mg
Agar	15.0 g

Distilled water 1,000 ml

pH 7.4 NaCl 0.8%

5% 血液添加または非添加

供試菌株：Fig. 1 に示すように、臨床検査の対象になることが多いと考えられる 18 種 112 株を用いた。

希釈法による MIC 値測定：薬剤の 2 倍希釈系列、400, 200, 100, 50……mcg/ml 濃度含有の寒天平板培地上に、発育がよく、コロニー形成の比較的早い菌は、寒天平板 cm^2 当り $10^3 \sim 10^4$ 程度に、コロニー形成のややおそい菌は cm^2 当り $10^4 \sim 10^5$ 程度に接種した。37°C に 16~24 時間培養し、肉眼的に発育阻止濃度を測定し、約 6 回繰返して得た値の幾何平均の $1/\sqrt{2}$ を最も信頼すべき MIC 値とした。

ディスク法の実施方法：内径 85~90 mm の規格型ペトリ皿に培地を 20 ml ずつ分注し、水平に固めた。供試菌コロニーの 1~2 白金耳程度を 1 ml の滅菌水または broth に懸濁し、ブドウ球菌、腸内細菌の場合はその 1 白金耳を、淋菌、ヘモフィルス、レンサ球菌、肺炎球菌などはその 10 白金耳程度を 0.5 ml に懸濁し、その 1 白金耳を、1 枚の寒天平板上におとし、20 個程度の小ガラス玉を入れ、ゆりうごかして均等に拡げた。このさいの接種菌量は前者では cm^2 当り $10^3 \sim 10^4$ 程度、後者では $10^4 \sim 10^5$ 程度のことかたしかめられている。

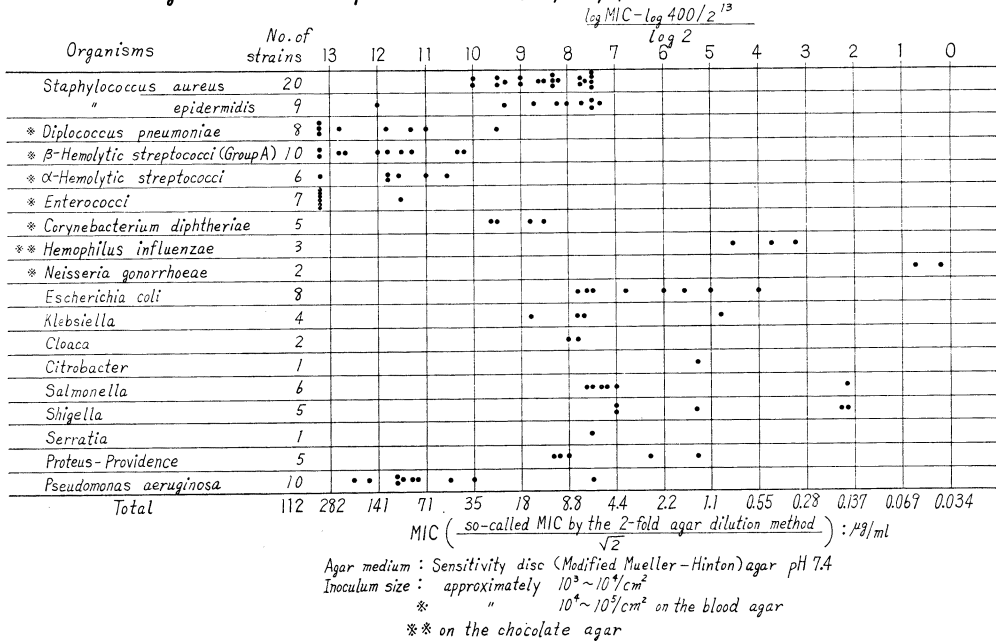
ディスクを置いて直ちに培養し、16 時間後に阻止円直径を測定する (普通法)。

寒天平板 cm^2 当り $10^6 \sim 10^7$ 程度に濃厚に菌を接種して、3~4 時間で阻止円の出現した場合、5~6 時間で阻止円の出現した場合に分けて判定する (迅速法)。

普通法の 1/10 程度に菌を接種し、27°C 程度で培養して、16 時間で阻止円が出現せず、24 時間以内で阻止円の出現した菌株についてのみ阻止円を計測する (遅延判定)。

阻止円の計測：上述のそれぞれの方法によつて現われた阻止円直径を直角 2 方向から計測し、平均値を求めた。

Fig.1 Microorganisms used for constructing regression lines and their sensitivities against the mixture of piromidic acid and β -hydroxy piromidic acid (1:1)



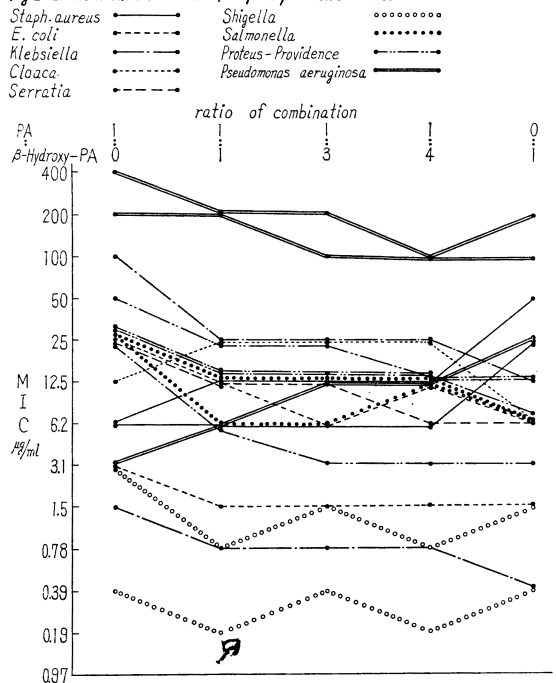
実験成績

ディスク含有量の検討

本剤の主要生体内活性代謝物としては β -Hydroxy PA が知られている。われわれも、PA および β -Hydroxy PA を中心に体内活性物質の分離定量を行なった。その成績では PA と β -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 程度の成績がえられた。いつぼう、本剤使用の適応症としては、第1に尿路感染症、ついで胆道感染と考えられるが、これら疾患で起菌に薬剤の作用する部位は、それぞれ腎組織、尿路壁の組織、および胆道系内壁の組織であろう。したがって、前者では血液中と尿中の薬剤活性濃度、後者では血液中と胆汁中の薬剤活性濃度が、その臨床効果を左右するものと考えられる。したがって血中と尿中濃度の中間、または血中と胆汁中濃度の中間の活性物質濃度が臨床効果に関係する可能性が大きいと思われる。ディスク法としては、これらの組合せをある程度共通に表現する必要がある。上記の成績から適当と推定される PA : β -Hydroxy PA の比を 1 : 1, 1 : 3, 1 : 4 とした混合物と、それぞれ単独の場合についての抗菌力を比較検討した。

PA, β -Hydroxy PA 混合比の MIC 値に及ぼす影響 : すなわち Fig. 2 に示すように 20 株の菌に対して各々の MIC を寒天平板希釈法で測定した。それぞれ単独と混合物ではかなり差があるが、混合物ではその比が 1 : 1, 1 : 3, 1 : 4 の間には大差のない傾向がみられた。

Fig.2 Effect of ratio of PA and β -Hydroxy-PA on MICs of the mixture



ディスク含有薬剤濃度について : これらの成績を参考にすると PA と β -Hydroxy PA の 1 : 1 の混合物で、本剤投与時の生体抗菌力のある程度代表しうる可能性があると考えられた。またその際のディスク含有量としては、尿中活性濃度の下限である 100 mcg/ml 程度以下の

Table 1 Statistical analysis on the relationship between MICs and diameters of inhibition zones obtained by the single disc method of piromidic acid, β -hydroxy piromidic acid and their mixture (1:1)

Strains employed			
<i>Staph. aureus</i>	4	<i>Shigella</i>	2
<i>E. coli</i>	2	<i>Salmonella</i>	2
<i>Klebsiella</i>	2	<i>Ps. aeruginosa</i>	2
<i>Cloaca</i>	1	<i>Proteus-Providence</i>	4
<i>Serratia</i>	1	Total	20

Agent	No. of data obtained	Correlation coefficient	Simple regression equation
Piromidic acid	80	0.910	$D=30.97-11.65 \log \text{MIC}$
β -Hydroxy piromidic acid	80	0.926	$D=34.50-11.31 \log \text{MIC}$
Mixture(1:1)	80	0.938	$D=30.76-10.27 \log \text{MIC}$

MIC の菌が阻止円を示す 50 mcg/ml 含有が適当であることが、予備実験でたしかめられた。

ディスク含有薬剤の MIC と阻止円直径の関係：PA 単独， β -Hydroxy PA 単独，両者の 1:1 混合物の 3 つをそれぞれ 50 mcg ずつ，ディスク（直径 8 mm）に含有させディスク法を行ない，阻止円直径と希釈法による MIC の関係を実験的に求めて，その値を統計的に検討した。その結果は Table 1 に示すように，いずれの場合も MIC と阻止円の間には充分な相関がみとめられ，また混合物（1:1）を用いた場合にも，単独に比しその相関が低下するという傾向はみられなかつた。したがってディスク法として，混合物（1:1）を用いても不都合でないと考えられた。そこで以下 1:1 の混合物を基準として用いるディスク法を検討した。

血液添加の MIC 値に及ぼす影響：Table 2 に示すよ

Table 2 Influence of adding sheep blood at the rate of 5% on the MICs of the mixture of piromidic acid and β -hydroxy piromidic acid (1:1) obtained by the 2-fold agar dilution method

Basal medium : Modified MUELLER-HINTON (Sensitivity disc) agar pH 7.4	
Strains employed :	
<i>Staphylococcus aureus</i>	40
<i>Salmonella</i>	8
<i>Citrobacter</i>	2
<i>E. coli</i>	16
<i>Shigella</i>	6
<i>Klebsiella</i>	8
<i>Enterobacter</i>	4
<i>Serratia</i>	2
<i>Proteus-Providence</i>	10
<i>Pseudomonas</i>	13
Total	109

Ratio of MIC ($\frac{\text{with blood}}{\text{without blood}}$)	Number of data obtained
4	1
2	37
1	58
1/2	13
1/4	0

Geometrical mean \approx 1.19

うな菌株を用いて，脱フィブリン羊血液を 5% 添加，非添加の際の MIC 値の変動を検し，5% 血液添加で，平均 1.19 程度で MIC 値の変動はすくないと考えられた。

標準曲線の調製

普通法は 6 回，迅速法と遅延法は 2 回に分けて実施し，それぞれの菌種の阻止円直径の平均値をもとめた。

Table 3 Statistical analysis of the relationship between MICs of the mixture of piromidic acid and β -hydroxy piromidic acid and diameters of inhibition zones

Method	(Incubation time in hours)	No. of data obtained	Correlation coefficient	Regression equation	Range of deviation of MICs expressed as rejection limit*
Conventional	Approx. 16 hrs	630	-0.939	$D=31.61-10.99 \log \text{MIC}$	(3.2~0.31)~(3.3~0.30)
	Approx. 24 hrs (delayed)	81	-0.938	$D=40.50-14.39 \log \text{MIC}$	(3.4~0.29)~(3.6~0.28)
Rapid	4 hrs	140	-0.589	$D=20.08-5.87 \log \text{MIC}$	(6.1~0.17)~(6.4~0.16)
	6 hrs	104	-0.692	$D=25.70-8.32 \log \text{MIC}$	(4.8~0.21)~(5.1~0.20)

Rejection limit was obtained by the formula : $\pm t_{0.05} \sqrt{S^2 y x \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{Sx^2} \right)}$

where, y = diameter of inhibition zone

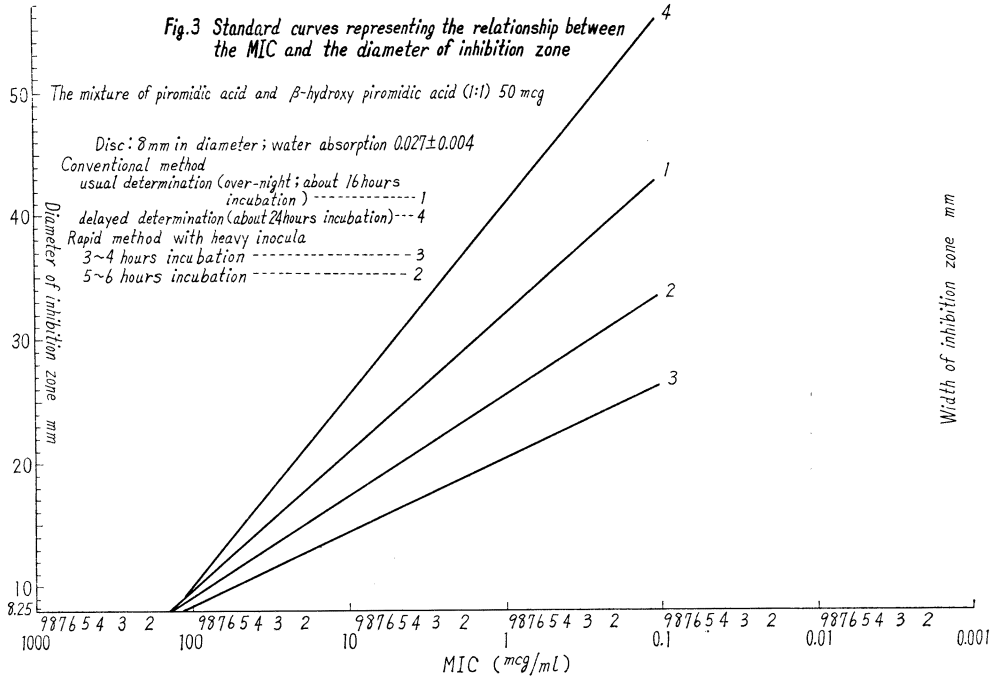
$$x = \frac{\log \text{MIC} - \log 400/2^{13}}{\log 2} + 0.5$$

t = T -distribution coefficient of STUDENT

Sx^2 = Sum of squares of deviations of x

$S^2 y x$ = variance from regression line

* Where MIC corresponding to the diameter of the inhibition zone is taken as 1.0 ; $\alpha=0.05$



ついで、片対数方眼紙上に阻止円直径を整数目盛に、希釈法による MIC 値を対数目盛にとり、各々の実験条件の下で MIC と阻止円直径の関係を示す 1 次回帰式および相関係数を求めた (Table 3, Fig. 3)。この際、希釈法による MIC 値はさきに報告した PA, β -Hydroxy PA の単独、またはその中間にある程度近い値を示した。ただこの際注目すべきことは、淋菌が PA, β -Hydroxy PA の混合物に MIC 0.1 mcg/ml 以下で極めて強い感受性を示すと成績がえられたことである。

ディスクによる感受性測定法について

普通法において、16 時間培養で測定に十分な阻止円が出現した場合は簡易法、16 時間で十分な阻止円が出現せず、24 時間で出現した場合は遅延判定の曲線を用いて、MIC を推定できるわけである。

迅速に感受性を知るために 0.1 ml の滅菌水に 10 白金耳程度に菌を濃厚に浮遊し、濃厚菌液をつくり、その

1 白金耳を寒天平板上にガラス玉法で接種して、37°C で培養し、4 時間以内に阻止円の出現した場合には迅速 3~4 時間の曲線で、5~6 時間で阻止円の出現した場合には迅速 5~6 時間の曲線で、感受性をスクリーニングすることが出来るわけである。

また被検体 (膿, 尿など) を直接接種した寒天平板にディスクをおいて、感受性試験をおこなう Primary culture sensitivity disc 法のさいは、接種菌量を規定することが時に困難なことがあるので、測定に十分な阻止円の出現した時間に応じて、すなわち迅速 3~4 時間法、迅速 5~6 時間法、簡易法 (16 時間培養)、遅延法 (24 時間培養) のいずれかを適用して感受性を推定することが可能であろう。

実験誤差について：本ディスク法の実験誤差を検討するために、求められたすべての成績の標準曲線からのへだたりの存在範囲を、棄却限界の式 ($\alpha=0.05$) を適用

Table 4 Range of deviation of MIC values of the mixture of piromidic acid and β -hydroxy piromidic acid (1 : 1) obtained by the 2-fold agar dilution method

No. of organisms employed	No. of multiplicative test (N)	Rejection limit* ($\alpha=0.05$)
100 strains of bacteria	100 $\left(\frac{600}{6}\right)$	2.57~0.39

* Where sample mean is taken as 1.0

$$\text{Rejection limit} = \pm S t_{0.05} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

S : for sample standard deviation obtained from the formula $\sqrt{\frac{\sum R^2}{N}}$

R : differences of MIC values in the multiplicative tests repeated 6 times : $\left(\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{5}}\right)$

Table 5 Piromidic Acid の臨床経験

No.	診 断	発病時症状	細菌学的検査				使用量 (mg)	効果 (投薬 終了後)	観察期間 (投薬 終了後)	自他覚的 副作用
			検体	菌	感受性*					
1 27 j ♀	急性尿路感染症	発熱 排尿痛 濁尿	尿	<i>E. coli</i> 2.4×10 ⁶ /ml	TC >60 CP >100 Si >400 KM 9 NA 10 PA 6.0	— — — ++ ++ —	—** (500×4) ×9日	有効	2ヵ月	—
2 42 j ♀	"	排尿痛 濁尿	"	<i>E. coli</i> 6×10 ⁶ /ml	TC >60 CP >100 Si >400 KM 12 NA 12 PA 2.0	— — — ++ ++ —	—** (500×3) ×7日	有効	2週間	—
3 52 j ♀	"	発熱 濁尿	"	<i>E. coli</i> 1.1×10 ⁶ /ml	TC 6 CP 14 Si >400 KM 15 NA 5 PA 3.5	++ ++ — ++ ++ —	—** (500×3) ×7日	有効	2週間	—
4 27 j ♀	"	発熱 排尿痛 濁尿	"	<i>E. coli</i> 5.2×10 ⁶ /ml	CER 6 SM 15 KM 4 CP >100 TC >100 Sulf >400 PA 3.0	++ + ++ — — — —	—** (500×3) ×10日	有効 ↓ 再発	2週間	—

* 1 濃度 Disc 法(MIC mcg, u/ml 感受性の程度)

PA は PA+β-Hydroxy PA(1:1) 50 mcg 含有ディスク使用による値

** — : <10²/ml

して計算し、Table 3 に示す値がえられた。いつぼう、参考としての寒天平板 2 倍希釈法の実験誤差を検討する意味で、すべての寒天平板 2 倍希釈法による MIC 値を、同一菌株について 6 回ずつ測定し、その各菌株ごとの成績を総合して、MIC 値の存在範囲の棄却限界の幅を求め、Table 4 の成績がえられた。

両者は、実験条件がすべて同一でなく、またディスク法評価の基準となる MIC 値が、寒天平板 2 倍希釈法の実験誤差を必然的に含んでいるので、厳密な比較はやや困難と思われるが、測定値の存在範囲の幅から推定すると、本ディスク法の精度は、寒天平板 2 倍希釈法のそれにある程度近く、臨床的感受性測定法として、ある程度用いられると推定された。

臨床使用経験

つぎに少数例ではあるが、PA を臨床的に使用し、そ

の際上述のディスク法についても経験を加えたので、概要を表に示す (Table 5)。

いずれの症例も本剤の適応症と考えられる PA 感性のグラム陰性桿菌による急性の尿路感染症であり、4 例とも有効の成績がえられたが、うち 1 例は 2 週間目に再発した。いずれの症例でも上述のディスク法による判定が本剤使用の有要性を充分推定するのに役立つ。

考 按

ディスク法、希釈法を含めて臨床的感受性測定法としては、従来はほとんどは投与薬剤に対する感受性 (MIC) を求めて、臨床使用の指標としていた。しかし生体内で新たに活性代謝物を生ずる薬剤投与の場合は、その代謝物をも充分考慮したすなわち代謝物をも含んだ薬剤に対する感受性値が臨床検査成績としてはさらに有要であろう。たとえば Acetylspiramycin 投与時の臨床的感受性

測定としては、主要な活性代謝物である Spiramycin 含有ディスクの使用が合理的と思われる。今回検討の対象となつた PA については、その主要活性代謝物としての β -Hydroxy PA が明らかにされており、また現時点ではその純品を適量入手することが可能である。そこでわれわれ⁴⁾は TLC-Bioautogram 法により、PA 投与後の血清、尿、胆汁について活性代謝物の分離定量を試み、 β -Hydroxy PA の活性代謝物としての重要性を確認するとともに、服用薬剤である PA との濃度比を求めることができた。その成績は、血中では PA > β -Hydroxy PA、胆汁中では PA > β -Hydroxy PA、尿中では PA < β -Hydroxy PA であつた。

本薬剤使用の主要適応症である尿路感染、および第 2 適応症と考えられる胆道感染症の各々に対する化学療法の効果は、その病巣部位の化学療法剤の活性濃度、すなわち尿路感染の場合は血中と尿中、胆道感染の場合は血中と胆汁がそれぞれ、臨床効果に関係すると考えられる。

いつぼう、PA と β -Hydroxy PA の混合比が 1:1、1:3、1:4 ではその抗菌力がほぼ同一傾向を示すことが、実験的にみとめられた。そこで 1:1 の混合物をディスク含有薬剤としてディスク法の検討を行ない Single disc 法が成立することをたしかめることができた。

実際に PA 投与の有効であつた尿路感染症の起原因菌は、本ディスク法で十分な感受性を示すことがたしかめられた。

結 論

1) PA 投与時の臨床効果を推定するための感受性ディスク法として、PA およびその生体内主要活性代謝物を同時に含有する感受性ディスクの使用を適当と考え、検討を加えた。

2) 本剤投与の適応症である尿路感染、胆道感染の治療にあつて、重要な血中、尿中、胆汁中の活性物質を共通に表現する PA、 β -Hydroxy PA の比は 1:1~4 程度と考えられた。

3) 両物質の混合比は 1:1、1:3、1:4 としても *in*

vitro 抗菌力ならびに抗菌スペクトラムには大差はみられなかつた。

4) そこで PA と β -Hydroxy PA の等量混合物を含有するディスクを検討した。すなわち、18 種 112 株を用いての繰返し実験の結果として、希釈法 MIC とディスク阻止円の関係を示す 1 次回帰曲線を、i) 1 夜 16 時間培養の普通法、ii) 24 時間後判定の遅延法、iii) 濃厚菌接種による 3、4 時間培養後の 4 時間迅速法、iv) 同様にして 5、6 時間培養後判定を行なう 6 時間迅速法の各々について調製し、Single disc 法の成立をたしかめることができた。また、本ディスク法における実験誤差をも、希釈法のそれと比較しつつ検討した。

5) 本剤を 4 例の尿路感染症に使用し、いずれも効果がみられた。その際に分離起原因菌は、上述の PA、 β -Hydroxy PA 含有のディスクに感受性を示し、本感受性ディスク法が臨床検査として有要と考えられた。

文 献

- 1) 金沢 裕：細菌の化学療法剤感受性測定法としての感受性ディスク法。Chemotherapy 9(1): 50~67, 1961
- 2) KANAZAWA, Y.: Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agents & Chemother. 1961: 926~942, 1962
- 3) KANAZAWA, Y.: Single disc method for MIC determination. J. Antibiotics, Ser. A 19(4): 175~189, 1966
- 4) 金沢 裕、倉又利夫：Piromidic acid の基礎的、臨床的検討(第 1 報)。Chemotherapy 19(5): 333~342, 1971
- 5) SHIMIZU, M., Y. SEKINE, H. HIGUCHI, H. SUZUKI, S. NAKAMURA & K. NAKAMURA: Piromidic acid, a new antibacterial agent: absorption, distribution, excretion, and metabolism. Antimicrob. Agents & Chemother. 1970: 123~128, 1971
- 6) SHIMIZU, M., S. NAKAMURA & Y. TAKASE: Piromidic acid, a new antibacterial agent: antibacterial properties. Antimicrob. Agents & Chemother. 1970: 117~121, 1971

STUDIES ON PIROMIDIC ACID (REPORT II)

With Special Reference to Sensitivity Disc Test and its Clinical Application

YUTAKA KANAZAWA

Department of Internal Medicine, Niigata Railway Hospital, Niigata, Japan

TOSHIO KURAMATA

Department of Pharmacy, Niigata Railway Hospital, Niigata, Japan

1) Piromidic acid has been appreciated to be applicable to the urinary tract infections as well as the biliary tract infections. In the treatment of these diseases, it is considered that the concentration of active substances in the infected tissues, *i. e.* active levels in blood and in urine in the case of urinary tract infection and the ones in blood and in bile in the case of biliary tract infection, play important roles. According to our experiments, active principles of piromidic acid in body fluids were unchanged piromidic acid and β -hydroxypiromidic acid, a main active metabolite and the average ratios of them were about 4 : 1 in blood, about 1 : 10 in urine and about 3 : 1 in bile, respectively. It was considered under these circumstances that the mixture of piromidic acid and β -hydroxypiromidic acid might be one representative at the ratio of 1 : 1~4 if only one ratio should be selected for simplification of clinical tests on piromidic acid.

2) *In vitro* antibacterial activity of the mixture of piromidic acid and β -hydroxypiromidic acid was almost similar at the ratios of 1 : 1, 1 : 3 and 1 : 4.

3) On the basis of these results, sensitivity discs containing piromidic acid and β -hydroxypiromidic acid at the ratio of 1 : 1, were prepared. Correlations between minimum inhibitory concentrations by the serial dilution method and diameters of inhibition zones by the disc method were repeatedly investigated using 112 strains of 18 bacterial species. Then the linear regression curves were drawn for the following disc methods ; 1) conventional method where incubation time was about 16 hours, 2) delayed method where incubation time was about 24 hours, 3) rapid method where incubation time was 3~4 hours with heavy inoculum and 4) rapid method where incubation time was 5~6 hours with heavy inoculum, respectively.

4) Piromidic acid was administered in 4 cases of urinary tract infection and was effective in all cases. Infecting bacteria isolated from these cases were all determined to be sensitive by means of the disc method above mentioned. The results indicated the usefulness of the sensitivity test using the disc containing piromidic acid and β -hydroxypiromidic acid simultaneously for the laboratory control of chemotherapy with piromidic acid.