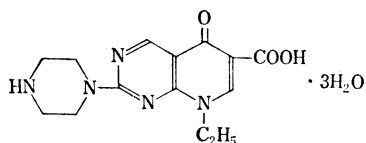


## Pipemidic acid の細菌学的評価 とくに *in vitro*, *in vivo* の抗緑膿菌作用について

五島瑳智子・堂ヶ崎 勲・金子康子・小川正俊  
滝田聖親・辻 明良・高橋邦子・桑原章吾  
東邦大学医学部微生物学教室

### はじめに

Pipemidic acid は基本骨格に pyridopyrimidine 環を有する抗菌性化学物質で、化学名は 8-ethyl-5, 8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperaziny)-pyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acid trihydrate で、構造式は下記のとおりである。



主としてグラム陰性菌に抗菌力を示し、緑膿菌や Nalidixic acid 耐性菌にも有効であり、とくに緑膿菌感染には経口投与での有用性が期待される。

本報告は Pipemidic acid の抗菌作用を、*in vitro*, *in vivo* について検討し、とくに緑膿菌実験感染における治療について、種々の条件による有効性の詳細な実験を行なった。その成績のあらましである。

### 実験方法

#### 1. 薬剤

Pipemidic acid<sup>1)</sup> (PPA) は水に難溶であり、また、エタノール、メタノール、*n*-ブタノール、アセトン、クロロホルム、ベンゼン、エーテル、*n*-ヘキサンにも難溶である。実験には希アルカリ (NaOH) に溶解した。

他の薬剤は Piromidic acid (PA), Nalidixic acid (NA), Carbenicillin (CBPC), Sulbenicillin (SB-PC), Gentamicin (GM) などを使用した。

#### 2. 菌種と菌株

実験に使用した菌は、*in vitro* では主として臨床分離グラム陰性桿菌を用い、一部は教室保存株を使用した。グラム陽性菌では臨床分離の *Staphylococcus aureus* だけを用いた。

#### 3. 感受性測定法

日本化学療法学会感受性測定法<sup>2)</sup> およびその改良法に準じて行なった。臨床分離株の感受性はすべて  $10^6$ /ml の菌液接種で測定した MIC である。

#### 4. 感染防禦実験

実験感染に用いたマウスは ddN 系、雄、5 週齢で、臨床材料から分離された *Pseudomonas aeruginosa* の 2 菌株をそれぞれマウス腹腔内に感染させ、PPA を経口投与し、5 日間観察、マウスの生死により ED<sub>50</sub> を算出した。

### 実験成績

#### 1. *In vitro* 抗菌作用

##### 1) 臨床分離株の感受性分布

グラム陰性桿菌である *E. coli* 20 株, *Klebsiella* 20 株, *Shigella* 20 株, *Salmonella* 10 株, *Proteus vulgaris* 4 株, *Proteus mirabilis* 7 株, *Proteus morgani* 3 株, *Proteus inconstans* 3 株, *Proteus rettgeri* 3 株, *Serratia* 25 株, *Enterobacter cloacae* 26 株, *Pseud. aeruginosa* 40 株, *Pseud. aeruginosa melanin* 株 39 株, *Pseud. aeruginosa mucoid* 株 7 株の感受性分布は Fig. 1 に示してあるが、これらのすべての菌種において、PPA は PA より抗菌力が強く、とくに *Pseud. aeruginosa* に対して優れている点が注目される。

*Pseud. aeruginosa* に対する PPA の MIC は 12.5  $\mu$ g/ml に大部分の株が集中しており、NA, PA だけでなく CBPC, SBPC よりも MIC 値が低い。

##### 2) 緑膿菌の薬剤感受性相関

Fig. 2 は *Pseud. aeruginosa* 40 株の感受性相関を示したものである。GM に比べれば MIC は大きい、その他の薬剤との比較では PPA の MIC が小さく、耐性を示す株はほとんど認められなかった。

##### 3) その他の菌種の PPA 感受性

PPA は一般にグラム陽性菌に対する抗菌力は弱いとされているが、*Staph. aureus* に対しては PA よりも効果が低く、NA とほぼ同程度かあるいは NA よりもわずかながら活性が劣る傾向がみられた。

このほかグラム陰性桿菌のうち、臨床材料から分離報告の増加している菌種についても、その抗菌作用の成績の一部を Table 1 にまとめた。

菌種は *Staph. aureus* のほかは *Pseud. maltophilia* 20 株, *Pseud. cepacia* 17 株, *Acinetobacter anitratum*

Fig. 1 Sensitivity distribution of clinical isolates

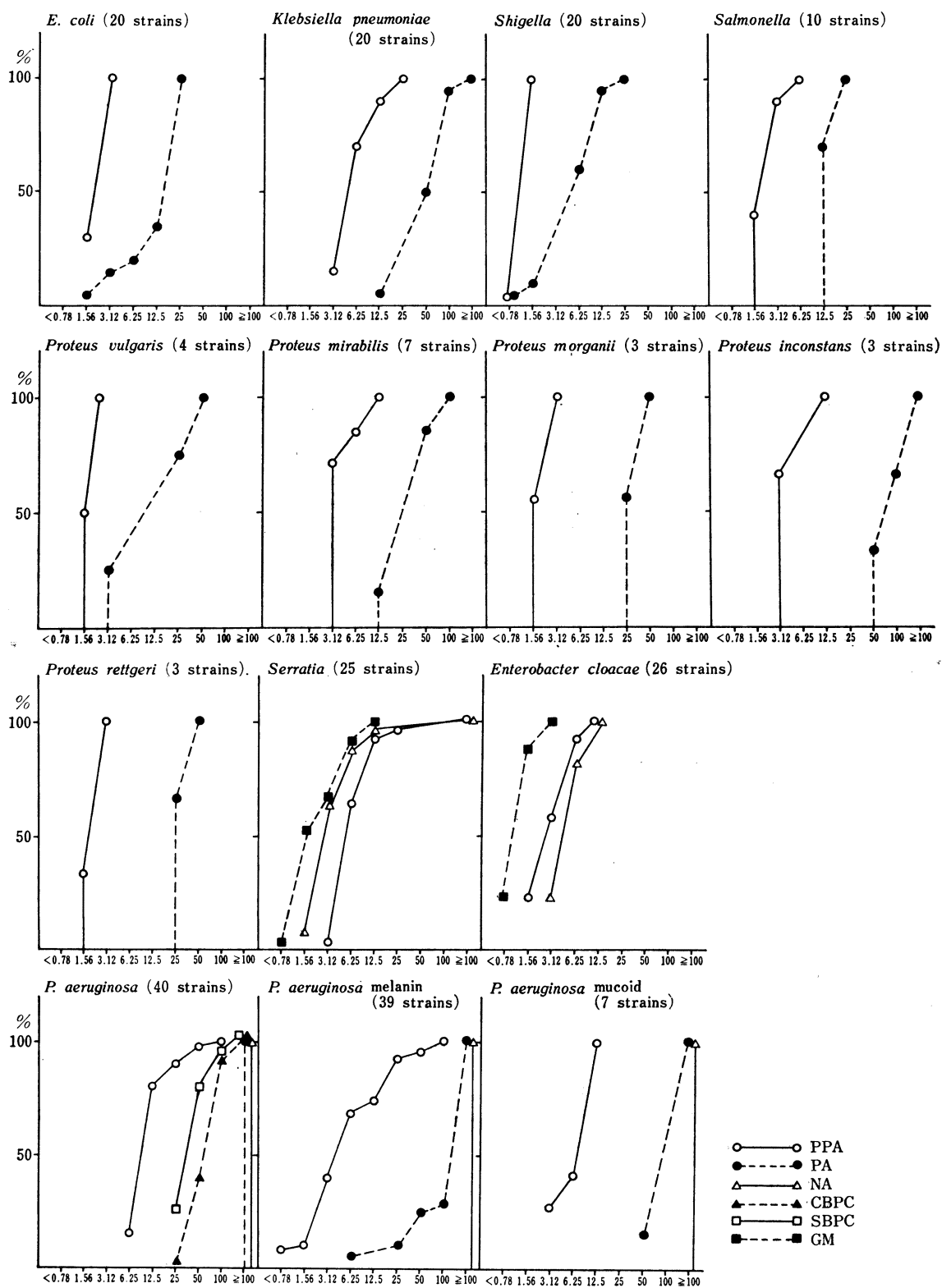
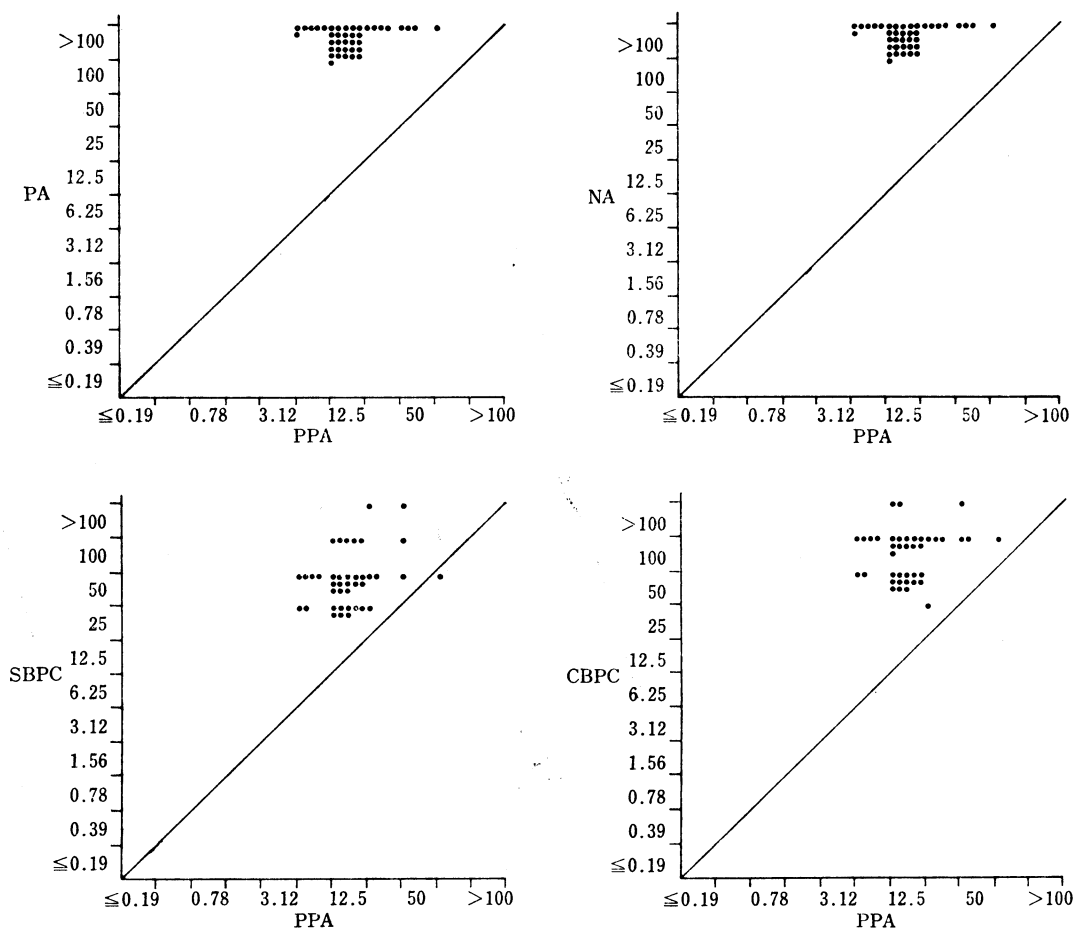


Fig. 2 Sensitivity correlogram of *Pseud. aeruginosa* (40 strains)

19 株, *Alcaligenes faecalis* 11 株, *Moraxella* 6 株である。

*Pseud. maltophilia*, *Pseud. cepacia* に対しては NA のほうがよく, *Pseudomonas* 属の菌種でも *Pseud. aeruginosa* に対する抗菌力と平行しない。これらの菌種は GM に対しても耐性を示す菌群である。

*Acinetobacter anitratum* に対しても NA, GM のほうがよく, これら 2 剤の MIC のピークは 3.12~6.25  $\mu\text{g/ml}$  であるのに, PPA は 100  $\mu\text{g/ml}$  で抗菌作用は認められない。

*Alcaligenes faecalis* に対しては菌株差が大きく, 3.12~100  $\mu\text{g/ml}$  の間に MIC が分布しており, NA, GM の抗菌作用には及ばない。

*Moraxella* は菌株数が少ないが, NA, GM と同様 PPA にも耐性で, 効果は期待できない。

2. *In vivo* 抗菌作用——緑膿菌マウス実験感染における感染防禦効果

臨床分離緑膿菌の 2 株を試験菌とし, 腹腔内接種にて感染させたマウスに, PPA を経口投与し, 生死により  $\text{ED}_{50}$  を算出した。

Table 2 はその実験成績の全容を数値で表わし, Fig. 3, 4 は治療効果と実験条件の関係を見やすくするため図示したものである。また, Table 2 のなかの *Pseud. aeruginosa* GNB-2-139 株における CBPC の実験成績は同時に行なったものではないが, CBPC を皮下投与としたほかは同様の実験条件で行なったものである。

CBPC のほうが  $\text{ED}_{50}$  値が大きく, とくに大量菌を感染させたマウスでは, 3 回の分割投与で PPA の  $\text{ED}_{50}$  は 7.05 mg/mouse であるのに, CBPC は 86 mg/mouse 以上で, ほとんど無効と判断される。

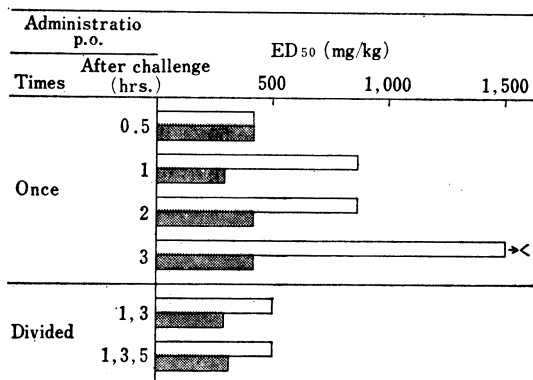
#### 1) 攻撃菌量と $\text{ED}_{50}$

一般に薬剤の治療効果は攻撃菌量により変動する。*Pseud. aeruginosa* GNB-2-29 株の攻撃菌量を 5% mucin 添加で  $1 \times 10^6/\text{mouse}$  とした場合と, mucin 無

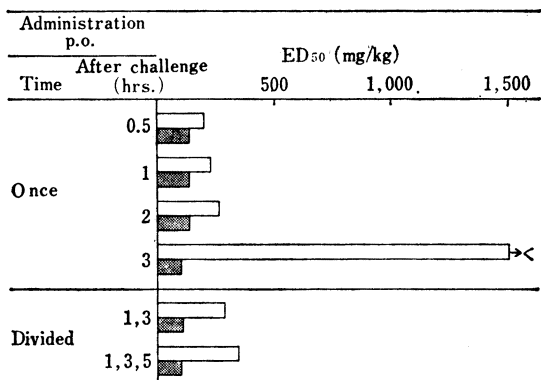
[illegible]

Table 2 Protecting effect of PPA on *Pseud. aeruginosa* infection in mice

| <i>Pseudomonas</i><br>strain       | Challenge<br>dose<br>(cells/mouse) | Mucin | Medication<br>time<br>(hrs.) | ED <sub>50</sub> (mg/mouse) |                                                             |
|------------------------------------|------------------------------------|-------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                    |                                    |       |                              | PPA                         | CBPC                                                        |
| GNB-2-139<br>(MIC : 25→6.25 µg/ml) | 5 × 10 <sup>4</sup>                | +     | 0.5                          | 2.77                        | 7.0                                                         |
|                                    | 5 × 10 <sup>4</sup>                | +     | 1                            | 2.77                        |                                                             |
|                                    | 5 × 10 <sup>4</sup>                | +     | 2                            | 2.77                        |                                                             |
|                                    | 5 × 10 <sup>4</sup>                | +     | 3                            | 2.21                        |                                                             |
|                                    | 5 × 10 <sup>4</sup>                | +     | * 1, 3                       | ≡ 2.34                      |                                                             |
|                                    | 5 × 10 <sup>4</sup>                | +     | * 1, 3, 5                    | 2.21                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 0.5                          | ≡ 3.97                      | >86.0                                                       |
|                                    | 1 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 1                            | 4.73                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 2                            | ≡ 5.34                      |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 3                            | >30                         |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>8</sup>                | —     | * 1, 3                       | 5.77                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>8</sup>                | —     | * 1, 3, 5                    | 7.05                        |                                                             |
| GNB-2-29<br>(MIC : 50→12.5 µg/ml)  | 1 × 10 <sup>6</sup>                | +     | 0.5                          | 8.32                        | Administration:<br>PPA...p. o.<br>CBPC...s. c.<br>* divided |
|                                    | 1 × 10 <sup>6</sup>                | +     | 1                            | 5.77                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>6</sup>                | +     | 2                            | 8.32                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>6</sup>                | +     | 3                            | 8.32                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>6</sup>                | +     | * 1, 3                       | 5.77                        |                                                             |
|                                    | 1 × 10 <sup>6</sup>                | +     | * 1, 3, 5                    | 6.27                        |                                                             |
|                                    | 2 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 0.5                          | 8.32                        |                                                             |
|                                    | 2 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 1                            | ≡17.32                      |                                                             |
|                                    | 2 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 2                            | ≡17.32                      |                                                             |
|                                    | 2 × 10 <sup>8</sup>                | —     | 3                            | >30                         |                                                             |
|                                    | 2 × 10 <sup>8</sup>                | —     | * 1, 3                       | ≡10                         |                                                             |
|                                    | 2 × 10 <sup>8</sup>                | —     | * 1, 3, 5                    | ≡10                         |                                                             |

Fig. 3 Protecting effect of PPA on *Pseud. aeruginosa* infection in mice

Test strain : *Pseud. aeruginosa* GNB-2-29  
 MIC { 50 µg/ml inoculum size 10<sup>8</sup>/ml  
       { 12.5 µg/ml inoculum size 10<sup>6</sup>/ml  
 Challenge dose { Mucin (—) 2 × 10<sup>8</sup>/mouse  
                   { Mucin (+) 1 × 10<sup>6</sup>/mouse  
 — without mucin  
 ▨ with 5% mucin

Fig. 4 Protecting effect of PPA on *Pseud. aeruginosa* infection in mice

Test strain : *Pseud. aeruginosa* GNB-2-139  
 MIC { 25 µg/ml inoculum size 10<sup>8</sup>/ml  
       { 6.25 µg/ml inoculum size 10<sup>6</sup>/ml  
 Challenge dose { Mucin (—) 1 × 10<sup>8</sup>/mouse  
                   { Mucin (+) 5 × 10<sup>4</sup>/mouse  
 — without mucin  
 ▨ with 5% mucin

添加で  $2 \times 10^8$ /mouse とした場合を比べると, mucin 添加少量菌攻撃群は全体に  $ED_{50}$  値が低く, 治療効果が良好である。もう 1 株の *Pseud. aeruginosa* GNB-2-139 株においても同様の傾向が示されている。

## 2) 投与回数, 投与時間と $ED_{50}$

PPA は経口投与であるが, マウスに菌を感染させてから 30 分, 1 時間, 2 時間, 3 時間にそれぞれ 1 回投与した場合と, 同量の PPA を 1 時間, 3 時間の 2 回に分割投与した場合, 1 時間, 3 時間, 5 時間の 3 回に分割投与した場合の治療効果を Fig. 3, 4 により比べてみると, 2 株とも大量菌を感染させた場合の感染後 3 時間投与群の治療効果が悪く, いっぽう, 感染後 1 時間までに第 1 回の投与を行なった場合は, たとえ分割投与でもほぼ同様の  $ED_{50}$  値を示している。

## 考 察

PPA はグラム陰性菌に対する抗菌作用が主であるが, その活性の程度は従来グラム陰性桿菌用として市販されている NA に比べ, ほとんどの菌種に対してより強力である。しかし, 黄色ブドウ球菌をはじめ数種の菌, たとえば *Pseud. maltophilia*, *Pseud. cepacia*, *Acinetobacter anitratum* などに対しては NA よりも抗菌力は劣り, これらの菌種に対する有効性は期待できない。

もっとも注目されるのは緑膿菌に対する抗菌作用で, 同系統の PA よりも, さらに強力である。

経口投与によるマウスの治療実験では, 抗緑膿菌作用のある注射用ペニシリン群よりも  $ED_{50}$  値が小さく, とくに大量菌を感染させた場合, CBPC の治療効果が著しく低下するのに比べ, PPA ではそれほど大きな違いはない。

マウス実験感染では一般に攻撃菌量を多くして大量の菌を一度に感染させるときは, 投与時間が遅れると治療効果が著しく低下するが, PPA も同様であって, 感染後 2 時間, 3 時間とだんだん  $ED_{50}$  が大きくなる。ただし, 感染菌量が少ない場合,  $ED_{50}$  の動揺はわずかである。

この現象はマウス体内での PPA の動態, および PPA の抗菌作用のメカニズムなどが考えられるが, 緑膿菌感染マウスに対する治療効果はかなり安定で, 実験条件の変動による  $ED_{50}$  の動揺はペニシリン系薬剤より少ないと思われた。

## ま と め

PPA の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用を検討し, 次のような結果を得た。

1. PPA は主としてグラム陰性桿菌に抗菌力が強く, 一般の腸内細菌, および緑膿菌に対し, PA, NA より強い抗菌活性を示す。ただし, ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌のなかには PPA に感受性を示さない菌種がある。

2. 臨床材料から分離された緑膿菌のマウス実験感染において, 経口投与で良好な治療効果を示した。その  $ED_{50}$  値はアミノ配糖体系抗緑膿菌剤より大きく, ペニシリン系抗緑膿菌剤より小さい。

## 文 献

- 1) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA, Y. TAKASE & N. KUROBE: Pipemidic acid: Absorption, distribution, and excretion. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7(4): 441~446, 1975
- 2) 石山俊次, ほか: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 16: 98~99, 1963

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF PIPEMIDIC ACID:  
*IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTI-*PSEUDOMONAS*  
*AERUGINOSA* ACTIVITY

SACHIKO GOTO, ISAO DOGASAKI, YASUKO KANEKO,  
MASATOSHI OGAWA, TOSHICHIKA TAKITA, AKIYOSHI TSUJI,  
KUNIKO TAKAHASHI and SHOGO KUWAHARA  
Department of Microbiology, School of Medicine,  
Toho University

*In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of pipemidic acid (PPA) was examined with the following results.

1. PPA showed potent antibacterial activity mainly against gram-negative bacilli and it was more potent against most enteric bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* than piromidic acid and nalidixic acid. There were some organisms insusceptible to PPA among gram-negative bacilli which did not ferment glucose.

2. PPA showed good therapeutic effect by the oral route in mouse experimental infections due to *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical materials.

Its ED<sub>50</sub> values were higher than those of anti-*Pseudomonas* aminoglycosides and lower than of anti-*Pseudomonas* penicillins.