

## Pipemidic acid の抗菌作用

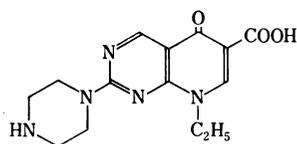
清水当尚・高瀬善行・中村信一・片江宏巳・南 明

中田勝久・井上 了・石山正光・久保雄嗣

大日本製薬株式会社総合研究所

Pipemidic acid (PPA)<sup>1)</sup> は一連の pyridopyrimidine 誘導体の研究から Piromidic acid (PA)<sup>2)</sup> に続いて見出された新しい合成抗菌剤で、その化学構造は Fig. 1 に示すとおりである。本剤は PA および Nalidixic acid (NA)<sup>3)</sup> と同様、主としてグラム陰性菌に有効であるが、緑膿菌や PA および NA 耐性菌にも有効である。経口投与で消化管からよく吸収され、組織中に高濃度に分布し、大部分は未変化体のまま尿中に排泄される。本報では PPA の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を PA, NA, Cephalexin (CEX), Ampicillin (ABPC), Carbenicillin (CBPC) および Gentamicin (GM) の作用と一部比較しながら報告する。

Fig. 1 Chemical structure of pipemidic acid



## 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

PPA および PA は当研究所で合成されたものを用いた。使用した PPA は三水和物であるが、その力価は常に無水物の量で表現した。NA は市販錠剤 (ウイントマイロン; 第一製薬) から抽出、精製したものを用いた。これらの薬剤を水に溶解する際には等モルの水酸化ナトリウムを添加した。

CEX (塩野義製薬), GM (硫酸塩; 塩野義製薬), ABPC (ナトリウム塩; 明治製薬), CBPC (ナトリウム塩; 藤沢薬品), Tetracycline (TC) (塩酸塩; 武田薬品), Chloramphenicol (CP) (三共) および Streptomycin (SM) (硫酸塩; 大日本製薬) は市販品を用いた。

## 2. 使用菌株

*Serratia marcescens* X100 は大阪大学微生物病研究所, *Yersinia enterocolitica* MY-79 は鳥取大学農学部家畜微生物学教室, *Pasteurella multocida* M-17 は大阪府立大学農学部家畜微生物学教室から分与されたものを、臨床分離株は全国の病院から送付されたものを

同定確認して使用した。その他の使用菌株は当研究所の保存株である。

## 3. 最小発育阻止濃度

とくに記載しないかぎり日本化学療法学会感受性測定法に従った。使用培地は菌種により異なる場合があるので、まとめて Table 1 に示した。

Table 1 Media used

	Medium	Organism
Preculture	BHI	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i>
	BHI+5% horse serum	<i>Corynebacterium pyogenes</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
	Chocolate agar	<i>Haemophilus influenzae</i>
	GC medium	<i>Neisseria meningitidis</i>
	TSB+3% NaCl	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>V. alginolyticus</i>
	TSB	the other organisms
MIC Determination	Blood agar	<i>Corynebacterium pyogenes</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
	Chocolate agar	<i>Haemophilus influenzae</i>
	HIA+3% NaCl	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>V. alginolyticus</i>
	HIA	the other organisms

BHI: Brain Heart Infusion (Difco)

TSB: Trypto-Soy Broth (Eiken)

HIA: Heart Infusion Agar (Eiken)

Chocolate agar: Trypto-Soy Agar (Eiken)+10% defibrinated rabbit blood

Blood agar: HIA+10% defibrinated rabbit blood

GC medium: 15g Polypeptone (Daigoeyo), 1g Starch Soluble, 4g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5g NaCl, 10g Bacto-Agar (Nissui), 1g Yeast Extract (Difco) and 10g Bacto-Hemoglobin (Difco) in 1 liter water

These media were all adjusted to pH 7.3.

培養温度は通常は 37°C を用いたが、*Yersinia enterocolitica* の場合だけ 25°C とした。なお、*Haemophilus influenzae* および *Neisseria meningitidis* はローソク培養を行なった。

#### 4. 諸因子の MIC 値に及ぼす影響

馬血清およびコール酸ソーダの添加、培地 pH の変化および接種菌量の MIC 値に及ぼす影響は Nutrient broth または agar, pH 7.0 を用いる液体または寒天希釈法<sup>4)</sup> により調べた。

#### 5. 殺菌作用

Nutrient broth, pH 7.0 に被験菌を約  $10^4$  生菌/ml に接種し、37°C で 3 および 6 時間培養後、生菌数を Nutrient agar 上で測定し、生菌数が減少した場合、殺菌作用があると判定した。

#### 6. 併用効果

PPA と CBPC および PPA と GM を種々の割合に含む Nutrient broth, pH 7.0 に *Pseudomonas aeruginosa* Tsuchijima を  $2 \times 10^2$  生菌/5 ml/tube になるよう接種し、37°C, 24 時間培養後、菌の発育を肉眼的に観察し、併用効果の有無を調べた。

#### 7. 感染防禦試験

感染防禦効果はマウスにおける 4 種の実験的感染症で調べた。1 群 10 匹以上の体重約 20 g の雌雄 ddy-s マウスを用い、薬剤は皮下投与の場合は精製水に溶解し、経口投与の場合は 0.2% carboxymethyl cellulose に懸濁して与えた。ED<sub>50</sub> 値はプロビット法<sup>5)</sup> により計算した。各感染症の実験方法の詳細は次のとおりである。

全身感染症：雄マウスに 0.4 ml の菌液 (*Staphylococcus aureus* は生理食塩水、*Salmonella typhimurium* は Nutrient broth, その他の菌は 4% mucin 添加 Nutrient broth に懸濁) を静注 (*Staphylococcus aureus* の場合だけ) または腹腔内投与して感染を惹起した。感染菌量は *Staphylococcus aureus* No. 50774,  $5 \times 10^8$  生菌/マウス (5~10 LD<sub>50</sub>) ; *Escherichia coli* P-174,  $6 \times 10^5$  生菌/マウス (約 5 LD<sub>50</sub>) ; *Klebsiella pneumoniae* No. 13,  $3 \times 10^6$  生菌/マウス (10~50 LD<sub>50</sub>) ; *Proteus mirabilis* P-287,  $5 \times 10^4$  生菌/マウス (約 50 LD<sub>50</sub>) ; *Proteus morgani* Kono,  $4 \times 10^5$  生菌/マウス (50~100 LD<sub>50</sub>) ; *Pseudomonas aeruginosa* No. 12,  $4 \times 10^8$  生菌/マウス (50~100 LD<sub>50</sub>) ; *Pseudomonas aeruginosa* Ky-44,  $5 \times 10^2$  生菌/マウス (約 50 LD<sub>50</sub>) および *Salmonella typhimurium* S-9,  $5 \times 10^5$  生菌/マウス (50~100 LD<sub>50</sub>) であった。投薬は通常感染直後と 6 時間後の 2 回行なった。ただし *Pseudomonas aeruginosa* Ky-44 の場合は 0, 3 および 6 時間後の 3 回、*Salmonella typhimurium* の場合

は 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72 および 78 時間後の 8 回投薬を行なった。感染 1 週間後 (*Staphylococcus aureus* と *Salmonella typhimurium* の場合だけ 2 週間後) の生存率から効果を判定した。非投薬対照群の生存率は 0~5% であった。

上行性腎感染症：雌マウスを pentobarbital (大日本製薬) 麻酔下に開腹手術し、Trypto-Soy Broth (栄研) に懸濁した菌液 0.1 ml (約 100 ID<sub>50</sub>) を膀胱内に注入し感染を惹起した。感染菌量は *Staphylococcus aureus* No. 50774 および *Klebsiella pneumoniae* No. 13 では  $1.5 \times 10^5$  生菌/マウス、*Escherichia coli* P-5101 では  $1.5 \times 10^7$  生菌/マウス、*Pseudomonas aeruginosa* No. 12 では  $1.5 \times 10^4$  生菌/マウスであった。使用マウスは感染前日および当日の 2 日間絶水させた。投薬は感染 3, 8, 24, 30, 48 および 54 時間後に行なった。感染 5 日目にマウスを屠殺し、両腎を摘出し、その断面を培地上にスタンプして 37°C で 1 夜培養後、菌の発育の認められない場合を有効と判定した。菌検出用培地として *Staphylococcus aureus* では *Staphylococcus Medium* No. 110 (ニッサン)、*Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* では MacConkey Agar (ニッサン)、*Pseudomonas aeruginosa* では King Medium A (ニッサン) を用いた。この感染系ではマウスは死亡しないが、腎は通常肥大するとともに、ところどころに膿瘍を形成し、非投薬対照マウスの腎からは感染菌が常に検出された。

肺感染症：雌マウスに *Pseudomonas aeruginosa* No. 12 の生理食塩水懸濁液 0.05 ml ( $2 \times 10^7$  生菌/マウス、約 10 LD<sub>50</sub>) を経鼻的に肺に滴下し感染を惹起した。この感染系では滴下された菌はマウスの肺中で増殖し、数時間後には肺は著しく充血し、マウスは死亡するに至る。投薬は感染直後、1 および 3 時間後に行ない、効果は感染 5 日目のマウスの生存率から判定した。非投薬対照群の生存率は 0~5% であった。

皮膚感染症：雌マウスの側背部を脱毛し、その皮下に *Pseudomonas aeruginosa* No. 12 の生菌約  $9 \times 10^8$  個 (5~10 ID<sub>50</sub>) を含む生理食塩水 0.2 ml を接種した。感染 0, 3, 6, 24, 27 および 30 時間後に合計 6 回の投薬を行ない、4 日目に接種部位の皮膚膿瘍の有無を観察し、膿瘍形成の認められない場合を有効と判定した。非投薬対照群では皮膚膿瘍は常に形成された。

## 結 果

### 1. 抗菌スペクトル

PPA の抗菌スペクトルを PA, NA, CEX および ABPC と比較して Table 2 に示す。PPA は *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium*

Table 2 Antibacterial spectrum of pipemidic acid compared with that of piromidic acid, nalidixic acid, cephalexin and ampicillin

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	PPA	PA	NA	CEX	ABPC
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	25	12.5	100	6.25	0.39
<i>S. aureus</i> 209P, JC-1	12.5	12.5	100	1.56	0.05
<i>S. aureus</i> No. 50774	25	12.5	50	3.13	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25	3.13	6.25	1.56	0.39
<i>Corynebacterium pyogenes</i> C-21	25	50	400	1.56	0.20
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> Agata	100	200	400	1.56	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> A65	200	400	400	0.78	0.025
<i>S. pneumoniae</i> I Neufeld	200	>400	>400	3.13	0.05
<i>Listeria monocytogenes</i> LI-2402	200	>400	>400	25	0.39
<i>Escherichia coli</i> K-12	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13
<i>E. coli</i> NIHJ, JC-2	1.56	25	12.5	25	12.5
<i>E. coli</i> P-5101	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW10	3.13	25	6.25	12.5	3.13
<i>S. sonnei</i> EW33	1.56	6.25	3.13	3.13	0.39
<i>Salmonella enteritidis</i> No. 1891	1.56	6.25	3.13	3.13	0.20
<i>S. typhimurium</i> S-9	3.13	12.5	3.13	6.25	0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> No. 13	6.25	50	12.5	12.5	200
<i>Proteus vulgaris</i> OX <sub>19</sub>	6.25	6.25	6.25	100	200
<i>P. morgani</i> Kono	3.13	25	6.25	>400	200
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> S-1	3.13	3.13	1.56	25	200
<i>Serratia marcescens</i> X100	6.25	50	12.5	>400	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tsuchijima	12.5	100	100	>400	>400
<i>P. aeruginosa</i> No. 12	25	200	100	>400	>400
<i>Neisseria meningitidis</i> Osa	1.56	1.56	3.13	0.39	0.013
<i>Haemophilus influenzae</i> Shiga	1.56	1.56	1.56	12.5	0.78
<i>Yersinia enterocolitica</i> MY-79	1.56	6.25	1.56	50	200
<i>Pasteurella multocida</i> M-17	1.56	0.78	1.56	3.13	0.20
<i>Brucella abortus</i> Kusayanagi	200	>400	>400	50	0.20

*pyogenes* など一部のグラム陽性菌に抗菌活性を示したが、その作用はPAとほぼ同程度でCEXやABPCより弱かった。これに対し、グラム陰性菌では、PPAはほとんどの菌に対し1.56~6.25  $\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示し、その作用はPA、NAおよびCEXより一般に強かった。PPAはPAおよびNAと同様CEXまたはABPCに非感受性の*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*などに抗菌活性を示すとともに、PA、NA、CEXおよびABPCに耐性の緑膿菌に対しても12.5~25  $\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示した。

## 2. 臨床分離緑膿菌の感受性

患者分離緑膿菌のPPA、CBPCおよびGMに対する感受性をTable 3に示す。検討した緑膿菌100株中99株は12.5~50  $\mu\text{g/ml}$ のPPAで増殖が阻止され、そのMICは一般にCBPCより低く、GMより高かった。また、PPAはCBPCおよびGM耐性緑膿菌にも有効であった。

## 3. 交差耐性

抗生物質耐性菌に対するPPAの作用をTable 4に示す。PPAは種々の抗生物質耐性菌に感受性菌とほぼ同様のMIC値を示した。Table 5はPPAのPAおよびNA耐性菌に対する作用を示したものである。PPAは大部分のPAおよびNA耐性菌に対し12.5~25  $\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示し、そのPAおよびNAとの交差耐性は

Table 3 Sensitivity of clinical isolates of genus *Pseudomonas* to pipemidic acid, carbenicillin and gentamicin

Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	>200
Pipemidic acid	0	0	0	0	30	54	15	1	0	0
Carbenicillin	0	0	0	0	1	2	48	31	4	14
Gentamicin	24	52	9	7	1	0	3	4	0	0

Figures show number of strains.

Table 4 *In vitro* activity of pipemidic acid against bacteria resistant to various antibiotics

Organism	MIC of PPA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Resistance to antibiotics
<i>Escherichia coli</i> P-77	1.56	TC
<i>E. coli</i> P-382	1.56	SM, TC
<i>E. coli</i> P-50c	1.56	SM, ABPC
<i>E. coli</i> P-210	1.56	ABPC, CEX
<i>E. coli</i> P-47	1.56	SM, CP, TC
<i>E. coli</i> P-54	1.56	SM, CP, TC
<i>E. coli</i> P-63a	1.56	SM, CP, TC
<i>E. coli</i> P-209	1.56	SM, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-50a	1.56	SM, CP, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-76	1.56	SM, CP, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-93d	1.56	SM, CP, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-203	1.56	SM, CP, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-197	3.13	SM, CP, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-218	3.13	SM, CP, TC, ABPC
<i>E. coli</i> P-140a	3.13	SM, CP, TC, ABPC, CEX
<i>Klebsiella pneumoniae</i> P-338	3.13	ABPC
<i>K. pneumoniae</i> P-160	1.56	SM, ABPC, CEX
<i>K. pneumoniae</i> P-224	3.13	SM, CP, TC, ABPC
<i>K. pneumoniae</i> P-286	3.13	SM, CP, TC, ABPC
<i>K. pneumoniae</i> P-258	6.25	SM, CP, TC, ABPC
<i>Shigella flexneri</i> 4a P-330	1.56	ABPC, CEX
<i>S. sonnei</i> P-313	1.56	SM, CP, TC
<i>S. sonnei</i> P-291	1.56	SM, CP, TC
<i>Proteus mirabilis</i> P-362	3.13	CP, TC
<i>P. mirabilis</i> P-161	3.13	SM, TC, ABPC
<i>P. mirabilis</i> P-74	6.25	CP, TC, ABPC

SM : Streptomycin, CP : Chloramphenicol, TC : Tetracycline, ABPC : Ampicillin, CEX : Cephalexin.

不完全であった。

#### 4. 諸因子の MIC 値に及ぼす影響

PPA の MIC 値は Table 6, 7, 8, 9 に示すとおり馬血清の添加, コール酸ソーダの添加および培地 pH の変化により, ほとんど影響されなかったが, PA および NA の MIC 値はかなり影響された。接種菌量が増加した場合は 3 剤とも MIC 値は高くなった。

#### 5. 殺菌作用

PPA は Fig. 2 に示すとおり, ブドウ球菌では 25  $\mu\text{g/ml}$ , 大腸菌では 1.56  $\mu\text{g/ml}$ , 緑膿菌では 6.25~12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で殺菌作用が認められたが, MIC 以下の濃度では再増殖が見られた。

#### 6. 併用効果

PPA と CBPC および GM との併用効果を緑膿菌で

Table 5 *In vitro* activity of pipemidic acid against bacteria resistant to piromidic acid and nalidixic acid

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	PPA	PA	NA
<i>Escherichia coli</i> K-12, NA-r*	25	>400	200
<i>E. coli</i> P-84	25	>400	>400
<i>E. coli</i> P-174	25	>400	>400
<i>E. coli</i> P-184	25	>400	>400
<i>E. coli</i> P-233	25	>400	>400
<i>E. coli</i> P-244	25	>400	>400
<i>E. coli</i> P-307	25	>400	>400
<i>E. coli</i> P-447	25	>400	400
<i>E. coli</i> P-509	50	>400	>400
<i>Proteus mirabilis</i> P-287	12.5	>400	>400
<i>P. mirabilis</i> P-334	12.5	>400	>400
<i>P. rettgeri</i> P-438	12.5	400	400
<i>P. morganii</i> P-114	25	>400	>400
<i>Klebsiella pneumoniae</i> P-256	100	>400	>400

\* A nalidixic acid-resistant strain made *in vitro*. All other resistant strains are clinical isolates.

Table 6 Influence of serum on MIC

Organism	Horse serum (%)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		PPA	PA	NA
<i>S. aureus</i> Terajima	0	25	12.5	100
	40	25	50	300
<i>E. coli</i> K-12	0	1.56	1.56	1
	40	1.56	6.25	10
<i>P. aeruginosa</i> Tsuchijima	0	12.5		
	40	12.5		

The broth-dilution method.

Table 7 Influence of sodium cholate on MIC

Organism	Sodium cholate (%)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		PPA	PA	NA
<i>S. aureus</i> Terajima	0	50	12.5	100
	1	50	25	300
	5	50	50	
<i>E. coli</i> K-12	0	1.56	1.56	3
	1	1.56	3.13	3
	5	1.56	6.25	
<i>P. aeruginosa</i> Tsuchijima	0	25		
	1	25		
	5	50		

The agar-dilution method.

Table 8 Influence of medium pH on MIC

Organism	pH	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		PPA	PA	NA
<i>S. aureus</i> Terajima	6.0	25	1.56	25
	6.5	25	3.13	25
	7.0	25	12.5	50
	7.5	25	25	200
	8.0	25	50	200
<i>E. coli</i> K-12	6.0	1.56	0.78	1.56
	6.5	1.56	0.78	1.56
	7.0	1.56	1.56	1.56
	7.5	1.56	1.56	1.56
	8.0	1.56	3.13	3.13
<i>S. flexneri</i> 2a EW10	6.0	3.13	3.13	1.56
	6.5	1.56	3.13	1.56
	7.0	1.56	6.25	3.13
	7.5	1.56	12.5	6.25
	8.0	1.56	25	6.25
<i>P. aeruginosa</i> Tsuchijima	6.0	12.5		
	6.5	12.5		
	7.0	12.5		
	7.5	12.5		
	8.0	12.5		

The broth-dilution method.

Table 9 Influence of inoculum size on MIC

Organism	Inoculum* (dilution)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		PPA	PA	NA
<i>S. aureus</i> Terajima	10 <sup>0</sup>	>100		>100
	10 <sup>1</sup>	100		>100
	10 <sup>2</sup>	50	30	100
	10 <sup>3</sup>	25	30	100
	10 <sup>4</sup>	25	10	100
	10 <sup>5</sup>	25	10	50
	10 <sup>6</sup>	25	10	50
<i>E. coli</i> K-12	10 <sup>0</sup>	3.13		3.13
	10 <sup>1</sup>	3.13		3.13
	10 <sup>2</sup>	1.56	3	1.56
	10 <sup>3</sup>	1.56	3	0.78
	10 <sup>4</sup>	1.56	1	0.78
	10 <sup>5</sup>	1.56	1	0.78
	10 <sup>6</sup>	0.78	1	0.78
<i>P. aeruginosa</i> Tsuchijima	10 <sup>0</sup>	50		>100
	10 <sup>1</sup>	25		>100
	10 <sup>2</sup>	25		>100
	10 <sup>3</sup>	12.5		100
	10 <sup>4</sup>	12.5		100
	10 <sup>5</sup>	12.5		50
	10 <sup>6</sup>	6.25		25
10 <sup>7</sup>	6.25		12.5	

The broth-dilution method.

\* One drop of each dilution of an overnight culture was used as inoculum.

Fig. 2 Bactericidal action of pipemidic acid

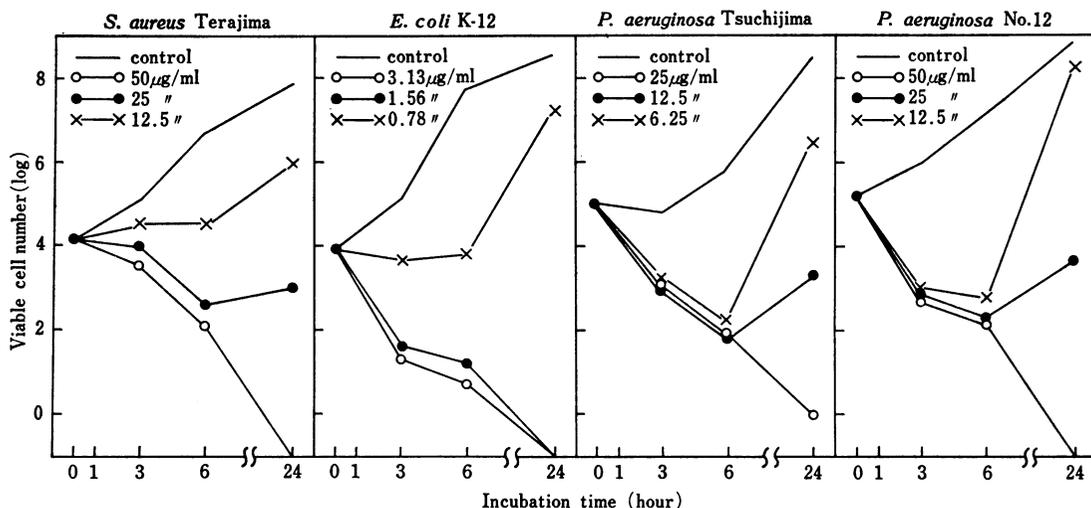


Fig. 3 Combination effect of pipemidic acid and carbenicillin or gentamicin

		Pipemidic acid (µg/ml)				
		6.25	3.13	1.56	0.78	0
Carbenicillin (µg/ml)	6.25	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	+	+
	1.56	-	-	+	+	+
	0.78	-	-	+	+	+
	0.39	-	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+
		Pipemidic acid (µg/ml)				
		6.25	3.13	1.56	0	
Gentamicin (µg/ml)	0.2	-	-	-	-	
	0.1	-	-	+	+	
	0.05	-	+	+	+	
	0	-	+	+	+	

+ : No inhibition of bacterial growth.  
 - : Inhibition of bacterial growth.  
 Method : The broth-dilution method.

調べたところ、Fig. 3 に示すように協力的な作用が認められた。

7. 感染防禦効果

マウスの実験的感染症における PPA の感染防禦効果を PA, NA, CEX, ABPC および CBPC と比較して Table 10 に示す。全身感染症では PPA は PA および NA とは異なりブドウ球菌感染症に有効であったが、その作用は CEX, ABPC および CBPC より弱かった。いっぽう、グラム陰性菌感染症では、PPA は他の 5 剤と

は異なり試験したすべての菌種に有効で、その ED<sub>50</sub> 値は 11.7~186 mg/kg/dose であった。一般に PPA のグラム陰性菌感染症に対する効果は PA, NA, CEX, ABPC および CBPC より強く、また、抗生物質および NA 耐性菌ならびに緑膿菌にも PPA は有効であった。

経口投与による PPA の抗緑膿菌効果は、感受性株の No. 12 では皮下投与による CBPC のそれとほぼ同じであったが、CBPC および GM 耐性の Ky-44 株では CBPC は無効であるのに対し PPA は有効であった。

上行性腎感染症では PPA および PA はブドウ球菌感染症に有効であったが、CEX および ABPC に比しその作用は弱かった。大腸菌感染症では PPA の ED<sub>50</sub> 値は 3.5 mg/kg/dose で、PA とほぼ等しく、NA の約 1/2, CEX, ABPC および CBPC の約 1/10 であった。肺炎桿菌感染症では ABPC は無効であったが、他の 4 剤は有効であり、その ED<sub>50</sub> 値は PPA では 11.9 mg/kg/dose であり、PA, NA および CEX の約 1/2, CBPC の約 1/40 であった。緑膿菌感染症では PPA の ED<sub>50</sub> 値は 29.1 mg/kg/dose で CBPC の約 1/4, 他の 4 剤の 1/10~1/40 以下であった。

緑膿菌の肺および皮膚感染症では皮下投与の CBPC はほとんど無効であるのに対し PPA は経口投与で有効で、その ED<sub>50</sub> 値はそれぞれ 82.6 および 173 mg/kg/dose であった。

考 察

PPA は化学構造的には PA<sup>2)</sup> および NA<sup>3)</sup> と類似しているが、抗菌作用面では若干異なる性質を有している。抗菌スペクトルでは PPA は PA と同様、主としてグラム陰性菌、ブドウ球菌などに有効であるが、PA

Table 10 Effect on various experimental infections in mice

Infection system	Organism	ED <sub>50</sub> : mg/kg/dose (MIC : µg/ml)					
		PPA	PA	NA	CEX	ABPC	CBPC
		po	po	po	po	po	sc
Systemic infection	<i>S. aureus</i> No. 50774	237 (25)	>800 (12.5)	>800 (50)	13.9 (6.25)	2.2 (0.2)	8.1 (1.56)
	<i>E. coli</i> P-5101	26.7 (3.13)	65.6 (12.5)	33.7 (3.13)	213 (12.5)	120 (6.25)	53.6 (12.5)
	<i>E. coli</i> P-174, NA-r	145 (25)	>800 (>400)	>800 (>400)	—	—	—
	<i>S. typhimurium</i> S-9	11.7 (3.13)	28.8 (12.5)	24.8 (3.13)	53.8 (6.25)	5.2 (0.2)	27.2 (0.78)
	<i>K. pneumoniae</i> No. 13	22.6 (6.25)	>100 (50)	49.8 (12.5)	8.2 (12.5)	383 (200)	380 (400)
	<i>P. morgani</i> Kono CEX, ABPC-r	21.5 (3.13)	56.3 (25)	25.6 (6.25)	>800 (>400)	>1,600 (200)	20.3 (3.13)
	<i>P. mirabilis</i> P-287 NA-r	50 (12.5)	>800 (>400)	>800 (>400)	16.2 (12.5)	>1,600 (>400)	200 (100)
	<i>P. aeruginosa</i> No. 12	103 (25)	>400 (200)	259 (100)	>1,600 (>400)	>1,600 (>400)	116 (100)
	<i>P. aeruginosa</i> Ky-44 GM, CBPC-r	186 (25)	>1,600 (400)	>200 (200)	>400 (>400)	>1,600 (>400)	>800 (>400)
Ascending kidney infection	<i>S. aureus</i> No. 50774	182	882	>400	<3.1	<0.8	—
	<i>E. coli</i> P-5101	3.5	4.7	6.6	44.2	36.3	27.9
	<i>K. pneumoniae</i> No. 13	11.9	39.6	40.8	35.4	>800	400
	<i>P. aeruginosa</i> No. 12	29.1	562	306	>1,600	1,350	130
Pulmonary infection	<i>P. aeruginosa</i> No. 12	82.6	>1,600	>200	>800	>1,600	1,238
Dermal infection	<i>P. aeruginosa</i> No. 12	173	—	—	—	—	>800

Abbreviation ; sc, subcutaneous ; po, oral.

およびNAではほとんど無効の緑膿菌に対しても抗菌作用を示す。PPA と抗生物質との間に交差耐性が見られない点はPA およびNAと同様であるが、PPA はPA およびNA耐性菌にもある程度の抗菌作用を示す。なぜそのように類似化合物間で交差耐性が不完全なのか、その理由の解明は今後の研究課題である。PA およびNAでは血清添加や培地 pH がアルカリ性の場合に MIC 値が上昇するが、PPA の MIC 値はこれらによりほとんど影響されなかった。マウスの実験的感染症では経口投与された PPA はブドウ球菌には弱い作用しか示さな

ったが、グラム陰性菌には PA, NA, CEX, ABPC および CBPC より一般に優れた感染防禦効果を示した。本剤はまた、PA および NA 耐性菌ならびに緑膿菌による感染症にも有効であった。このような良好な *in vivo* 効果はそのグラム陰性菌に対する強い *in vitro* 抗菌作用のためだけでなく、続報<sup>6)</sup>で示すとおり、組織内濃度の高いことおよび代謝的安定性とも密接に関連していると考えられる。緑膿菌感染症では PPA は経口投与で有効であり、その経口投与による効果は皮下投与による CBPC の効果より優れていたが、経口投与で緑膿菌感

染症に有効な薬剤の少ないこと<sup>7,8)</sup>を考えると、この成績は注目される。最近 CBPC および GM に同時に耐性の緑膿菌の分離が報告されている<sup>9,10,11)</sup>。PPA が CBPC および GM 耐性緑膿菌感染症にも有効であったことは、そのような菌の感染症の治療に PPA が役立つかもしれないことを示唆している。

### 結 論

PPA (8-ethyl-5, 8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acid) は PA に続いて見出された新しい pyridopyrimidine 系合成抗菌剤である。本剤は緑膿菌を含むグラム陰性菌および一部のグラム陽性菌に抗菌活性を示し、そのグラム陰性菌に対する抗菌作用は一般に PA, NA, CEX などより強かった。PPA は抗生物質とは交差耐性を示さず、PA および NA 耐性菌にもある程度の抗菌作用を示した。本剤の MIC 値は血清やコル酸ソーダの添加または培地 pH の変化によりあまり影響されなかったが、接種菌量の増加により上昇した。PPA は MIC 以上の濃度では殺菌作用を示し、CBPC および GM とは協力的に作用した。マウスにおける種々の実験的感染症では、PPA は経口投与で有効であり、そのグラム陰性菌感染症に対する効果は一般に PA, NA, CEX, ABPC および CBPC より強かった。また、PA および NA 耐性菌感染症にも有効であった。緑膿菌感染症では PPA は経口投与で有効であり、その効果は皮下投与による CBPC の効果より優れていた。

(本研究期間は昭和47年4月から48年9月である。)

### 文 献

- 1) MATSUMOTO, J. & S. MINAMI: Pyrido [2, 3-d] pyrimidine antibacterial agents. 3. 8-Alkyl- and 8-vinyl-5, 8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acids and their derivatives. J. Med. Chem. 18 : 74~79, 1975
- 2) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & Y. TAKASE: Piromidic acid, a new antibacterial agent: antibacterial properties. Antimicrob. Agents & Chemother. -1970 : 117~122, 1971
- 3) LESHER, G. Y.; E. J. FROELICH, M. D. GRUETT, J. H. BAILEY & R. P. BRUNDAGE: 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J. Med. Pharm. Chem. 5 : 1063~1065, 1962
- 4) 清水当尚, 中村信一, 高瀬善行: 新抗菌剤 Pipemidic acid の研究 I 抗菌作用. Chemotherapy 19(5) : 379~386, 1971
- 5) MILLER, L. C. & M. L. TAINTER: Estimation of the ED<sub>50</sub> and its error by means of logarithmic-probit graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57 : 261~264, 1944
- 6) 清水当尚, 中村信一, 黒部暢之, 高瀬善行: Pipemidic acid の吸収, 分布および排泄. Chemotherapy 23(9) : 2724~2729, 1975
- 7) ENGLISH, A. R.; J. A. RETSEMA, V. A. RAY & J. E. LYNCH: Carbenicillin indanyl sodium, an orally active derivative of carbenicillin. Antimicrob. Agents & Chemother. 1 : 185~191, 1972
- 8) MILLER, A. K.; B. M. FROST, M. E. VALIANT, H. KROPP & D. HENDLIN: Phosphonomycin. V. Evaluation in mice. Antimicrob. Agents & Chemother. -1969 : 310~312, 1970
- 9) BRYAN, L. E.; M. S. SHAHRABADI & H. M. VAN DEN ELZEN: Gentamicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : R-factor-mediated resistance. Antimicrob. Agents & Chemother. 6 : 191~199, 1974
- 10) KORFHAGEN, T. R.; J. C. LOPER & J. A. FERREL: *Pseudomonas aeruginosa* R factors determining gentamicin plus carbenicillin resistance from patients with urinary tract colonizations. Antimicrob. Agents & Chemother. 7 : 64~68, 1975
- 11) WATANAKUNAKORN, C. & T. BANNISTER: Comparison of the *in vitro* activity of BL-P1654 with gentamicin and carbenicillin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents & Chemother. 6 : 471~473, 1974

## ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PIPEMIDIC ACID

MASANAO SHIMIZU, YOSHIYUKI TAKASE, SHIN-ICHI NAKAMURA,  
HIROMI KATAE, AKIRA MINAMI, KATSUHISA NAKATA,  
SATORU INOUE, MASAMITSU ISHIYAMA  
and YUJI KUBO

Research and Development Division, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Pipemidic acid, 8-ethyl-5,8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido [2,3-d] pyrimidine-6-carboxylic acid, is a new derivative of piromidic acid. It was active against gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* as well as some gram-positive bacteria. Its potency against gram-negative bacteria was generally greater than that of piromidic acid, nalidixic acid and cephalexin. Cross-resistance was not observed between pipemidic acid and various antibiotics, and most of bacteria resistant to piromidic acid and nalidixic acid were moderately susceptible to pipemidic acid.

The activity of pipemidic acid was scarcely affected by the addition of serum, sodium cholate or change of medium pH, but was subject to the influence of inoculum size. Its action was bactericidal above minimal inhibitory concentrations. Additive effect was observed when pipemidic acid was used in combination with carbenicillin or gentamicin. Pipemidic acid was effective by the oral route on various experimental infections in mice. Its *in vivo* efficacy against gram-negative bacteria was generally better than that of piromidic acid, nalidixic acid, cephalexin, ampicillin and carbenicillin. The infection with bacteria resistant to piromidic acid and nalidixic acid was successfully treated with pipemidic acid.

In *Pseudomonas aeruginosa* infections, orally administered pipemidic acid was more effective than subcutaneously injected carbenicillin.