

Pipemidic acid と併用可能な薬剤の検索

新井俊彦

慶応義塾大学医学部微生物学教室

(昭和55年4月21日受付)

Pipemidic acid と配合して合剤とすることによって臨床上有効性を高め得る薬剤を、構造および作用点の異なる12種の化学療法剤について系統的に検索した。その結果、tetracycline, streptomycin, erythromycin, colistin および polymyxin B は pipemidic acid との併用で相互にまったく助け合わず、sulfisoxazol, chloramphenicol, kanamycin, ampicillin および cephalixin との組合せは相加的效果を、そして、nalidixic acid と nitrofurantoin との組合せは相乗的效果を期待できることがわかった。そこで、副作用の少ない nalidixic acid との併用効果を定量的にしらべ、この併用が相乗効果をもつことを確認した。これらの両剤は、対象とする多くの病原菌、日和見感染菌に対する効果で、抗菌スペクトルの拡大をともなう抗菌力の増強をもたらすことから、優れた合剤を与えるものと期待できる。

序 文

Pipemidic acid, 8-ethyl-5, 8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperaziny)-pyrido [2,3-d] pyrimidine-6-carboxylic acid trihydrate (PPA)¹⁾は主にグラム陰性菌に有効な薬剤として知られており、構造の類似な nalidixic acid (NA) では無効な緑膿菌や NA 耐性菌にも抗菌活性をもつといわれており²⁾、これ自体、優れた合成抗菌剤である。しかし、われわれは、日和見感染菌などによる感染症が容易に菌交代をおこすことを考えて、抗菌スペクトルの拡大、抗菌力の増強、あるいは耐性菌出現防止や副作用の軽減を目的に PPA の有効性をさらに高める配合剤の系統的検索を試みた。

材料と方法

薬剤：PPAの原末は大日本製薬総合研究所 中村信一博士から分与を受けた。また、NAの原末は第一製薬傍土和彦博士から分与されたものを使用した。その他の薬剤を含むディスクは市販のもの（昭和ディスク、昭和薬品化工）から12種、すなわち、sulfisoxazol (SI), tetracycline (TC), streptomycin (SM), chloramphenicol (CP), kanamycin (KM), NA, nitrofurantoin (NF), ampicillin (ABPC), cephalixin (CEX), colistin (CL), polymyxin B (PL) および erythromycin (EM) を選んで用いた。

菌種と菌株：PPAがグラム陰性菌に抗菌域をもつことから、標準指示菌としては *Escherichia coli* NIHJ 株を用い、併用効果の定量的測定には *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* および *Pseudomonas aeruginosa* の臨床分離株も用いた。

培地：菌株の前培養のための液体培地には Trypticase soy broth (BBL) を、また薬剤感受性試験用の固型培地には感受性ディスク用培地（日水）を用いた。

併用効果のスクリーニング試験：無薬剤、および PPA をそれぞれ 0.1, 0.4, および 1.6 $\mu\text{g/ml}$ に含む寒天平板を準備し、それに *E. coli* NIHJ 株の対数増殖期の液体培養を、約 10^7 個の細胞が直径 85 mm の円型平板表面に均等に拡がるように塗布し、直ちに市販の薬用ディスクをその上において、37°C で1夜（18時間）培養した。効果の判定は、各薬剤ディスクによる指示菌の発育阻止円の直径を無薬剤平板と PPA を含む平板とで比較することによった。

併用効果の確認試験：PPA および NA の2倍段階希釈液を作り、それぞれの溶液 0.5 ml ずつの組合せをシャーレに入れ、14 ml の寒天培地を加えて、異なる濃度の2薬剤の組合せを含む薬剤平板とした。これに、対数増殖期の液体培養を、無薬剤平板に 500~1,000 個の集落を与えるように希釈して表面に塗抹し、37°C で1夜培養して、出現した集落数を計数した。判定は、集落の大きさにかかわらず、集落数が無薬剤平板の 60% までを卍、60~10% を卍、10% 以下を十とし、集落が数個（0.05% 以下）のものは土、まったく見られないものを一とした。

成 績

併用効果のスクリーニング試験

PPA を含む寒天培地上での各種薬剤ディスクによる *E. coli* NIHJ 株に対する発育阻止円の直径と、その無薬剤培地上の値に対する相対値を Table 1 にまとめた。調

Table 1 Growth inhibitions of various drug discs against *E. coli* NIHJ on pipemidic acid-containing modified Mueller-Hinton agar

drug in disc	Conc. PPA ($\mu\text{g/ml}$) in agar					
	Growth inhibition zone (diameter : mm) and relative size					
	A	B	B/A	C	C/A	D
	0	0.1		0.4		1.6
sulfisoxazol	23	23	1.00	26	1.13	—
tetracycline	34	32	0.94	34	1.00	—
streptomycin	36	36	1.00	35	0.97	—
kanamycin	32	32	1.00	36	1.13	—
chloramphenicol	39	40	1.03	47	1.21	—
nalidixic acid	29	30	1.03	46	1.59	—
nitrofurantoin	16.5	18	1.09	22.5	1.36	—
ampicillin	26	27	1.04	31	1.19	—
cephalexin	17	19	1.12	19	1.12	—
colistin	15	16	1.07	14	0.93	—
polymyxin B	14	14	1.00	15	1.08	—
erythromycin	29	28	0.97	29	1.00	—

查12薬剤のうち、PPAの寒天平板への添加濃度に従って阻止円の拡大がほとんど見られないもの(相対比1.1以下)はTC, SM, EM, CL, およびPLの5剤であり、やや拡大が見られたもの(相対比1.1~1.3)はSI, KM, CP, ABPCおよびCEXの5剤、著明な拡大を示したものはNAとNFであった。

併用効果の確認試験

スクリーニング試験で併用により抗菌効果の増強が検出されたものを2群に分け、低度の群からはABPCを、高度の群からはNAを選んでPPAとの組合せについて、それぞれを2段階階希釈の濃度の組合せで含む平板上での単個菌の発育の有無を検出する方法によって併用効果を定量的に測定した。被験指示菌としては、まず、スクリーニング試験に用いた*E. coli* NIHJ株を用いた。そ

Fig. 1 Antibacterial effect of pipemidic acid against *E. coli* NIHJ in combination with ampicillin on modified Mueller-Hinton agar

Conc. ABPC ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. PPA ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	≡	≡	≡	≡	—
0.05	≡	≡	≡	≡	—
0.1	≡	≡	≡	≡	—
0.2	≡	≡	≡	+	—
0.4	±	±	±	+	—
0.8	—	—	—	+	—

Fig. 2 Antibacterial effect of pipemidic acid against *E. coli* NIHJ in combination with nalidixic acid on modified Mueller-Hinton agar

Conc. NA ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. PPA ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	≡	≡	≡	≡	—
0.1	≡	≡	≡	≡	—
0.2	≡	≡	≡	—	—
0.4	+	+	—	—	—
0.8	—	—	—	—	—

Fig. 3 Antibacterial effect of pipemidic acid against *Klebsiella pneumoniae* in combination with nalidixic acid

Conc. NA ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. PPA ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1
0	≡	≡	≡	≡	+	—
0.2	≡	≡	≡	≡	+	—
0.4	≡	≡	≡	≡	+	—
0.8	≡	+	+	+	—	—
1.6	+	+	+	—	—	—
3.1	—	—	—	—	—	—

Fig. 4 Antibacterial effect of pipemidic acid against *Serratia marcescens* in combination with nalidixic acid

Conc. NA ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. PPA ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1
0	≡	≡	≡	≡	+	—
0.05	≡	≡	≡	≡	+	—
0.1	≡	≡	≡	≡	+	—
0.2	≡	≡	≡	+	+	—
0.4	≡	+	+	+	—	—
0.8	+	+	+	—	—	—
1.6	—	—	—	—	—	—

の結果、PPAとABPCの併用(Fig. 1)は相乗効果であるのに対して、PPAとNAの併用(Fig. 2)では明らかな相乗効果のあることがわかった。そこで、PPAとNAに対して異なる感受性を有する*K. pneumoniae*(Fig. 3)、*S. marcescens*(Fig. 4)および*P. aeruginosa*(Fig. 5)に対する併用効果をしらべた。その結果、PPA

Fig. 5 Antibacterial effect of pipemidic acid against *Pseudomonas aeruginosa* in combination with nalidixic acid

Conc. NA ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. PPA ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	0.4	0.8	1.6	3.1	6.25
0	+++	+++	+++	+++	+++	—
1.6	+++	+++	+++	+++	+++	—
3.1	+++	+++	+++	+++	++	—
6.25	+++	+++	+++	++	+	—
12.5	+++	++	++	+	—	—
25	+	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—

と NA に等しい感受性をもつがやや抵抗性の高い *Klebsiella*, NA により感受性の高い *Serratia*, および PPA により感受性の *Pseudomonas* の 3 種のいずれの菌株でも, PPA と NA の併用が相乗効果をもつことが確認された。

考 察

各種病原菌の耐性化にともなって, 新しい抗菌物質の開発が必要であることは論をまたない。しかし, 新規の薬剤の開発速度がにぶっている現在, それぞれの用途に対して優れた抗菌剤をとりあげ, それらをさらに有効に利用するための配合剤を考えることも有用なことと考えられる。そこで, われわれは, グラム陰性菌に優れた抗菌力を持ち, 安全性も高い PPA をとり上げることにした。

併用を考える場合, 未知の病原菌や菌交代をおこしような感染症の治療に対して, 抗菌スペクトルの異なる薬剤を配合することが考えられる。しかし, これらの組合せが目的の病原菌に対する作用で拮抗効果をもっている, 抗菌活性が低下しても困るし, また, 副作用を増強することがあってはならない。したがって, 組合せる薬剤は, 少なくとも相加効果, できれば相乗効果をあらわすもので, また, 危険な副作用のないものでなければならない。

そこで, まず, 併用によって効果の高まるものを既存の抗菌物質の中で構造, 作用機作の異なるものを系統的に選んで試験した。その結果, SI, KM, CP, ABPC および CEX は少なくとも PPA との併用によって抗菌効果が高まり, さらに, NA および NF では著明な抗菌活性の増強があることがわかった。したがって, これらの薬剤は全て, 少なくとも併用で用いることが可能であると考えられる。

しかし, スクリーニング試験では併用の効果を定量的にみるることができないので, 併用効果の低度の群と著明な群から, それぞれ副作用の最も少ない ABPC と NA を選んで, 併用時の抗菌活性をしらべた。その結果, PPA と ABPC との併用は相加効果あるいはそれよりも効果の低いものであるのに対して, PPA と NA の併用は相乗効果をもっていることが明らかになった。すなわち, スクリーニング試験でかなり大きな差がみられるものだけが相乗効果をあらわすことがわかった。

そこで, 併用効果が高く, 副作用も少なく, その上吸入, 排泄が PPA⁴⁾ と同じ傾向を示す NA^{4,5)} との組合せにしぼって, 菌交代の可能性が高く, それぞれの薬剤に対する抵抗性が少しずつ異なる菌種について, さらに併用効果をしらべた。その結果, これらのいずれの菌種に対しても PPA と NA の組合せが相乗効果をもつことが確認された。すなわち, NA あるいは PPA の一方により抵抗性の菌種に対しても, この併用はそれぞれ単独より少ない量で有効なのである。

合剤は単なる併用療法とは異なり, すでに分離して使用することができないのであるから, それだけに安全性が高く, また, はっきりした用途をもち, なお且つ相乗効果があつて用量が減らせるなど, 配合による利益がきりかななものではなければならない。その点, PPA は, NA と類似の構造をもっており, その吸入, 排泄などの生体内での挙動も NA と同じ傾向を示す。したがって, PPA と NA の配合が相乗効果をもっていることは, 用途も同じであり, *in vitro* の併用効果から直接生体内での効果を推定でき, その上, 用量を減らすことができるから, 副作用の可能性を軽減することも期待でき, 優れた合剤となるものと考えられる。

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-piperaziny) pyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acids and their derivatives. J. Med. Chem. 18: 74~79, 1975
- 2) 清水当尚, 高瀬善行, 中村信一, 片江宏己, 南明, 中田勝久, 井上 了, 石山正光, 久保雄剛: Pipemidic acid の抗菌作用. Chemotherapy 23: 2659~2667, 1975
- 3) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA, Y. TAKASE & N. KUROBE: Pipemidic acid: Absorption, distribution and excretion. Antimicrob. Agents & Chemoth. 7: 441~446, 1975
- 4) 金沢 裕, 倉又利夫: 寒天平板拡散法による Nalidixic acid の体液中濃度測定法ならびに感受性測定法. Chemotherapy 12: 176~179, 1964
- 5) 清水喜八郎, 原田敏雄, 畠山正己, 国井乙彦, 廣

立恒夫, 山田栄八郎, 島田 馨: Nalidixic acid
の基礎的ならびに臨床的研究。Chemotherapy 12

: 384~389, 1964

SCREENING OF DRUGS EFFECTIVE FOR COMBINATIONAL APPLICATIONS WITH PIPEMIDIC ACID

TOSHIHIKO ARAI

Department of Microbiology, Keio University School of Medicine

We examined twelve different chemotherapeutics for their antibacterial effects in combinational applications with pipemidic acid (PPA), and found that tetracycline, streptomycin, erythromycin, colistin and polymyxin B had independent effect, sulfisoxazol, chloramphenicol, kanamycin, ampicillin and cephalixin had additive effect, and nalidixic acid and nitrofurantoin had synergistic effect with PPA. Despite the similar patterns of absorption, distribution and excretion with PPA, NA is known to have slightly different antibacterial spectrum. Therefore, the combination of PPA and NA could have wider antibacterial spectrum and more antibacterial effect on various Gram negative bacteria than either one of them.