

γ-Pyridone-β-carboxylic acid を含む化学療法剤の構造と抗菌活性

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)

γ-pyridone-β-carboxylic acid 構造を含む化学療法剤の標的特異性と化学構造との関係を、これに属する各種薬剤について、その代表である nalidixic acid および pipemidic acid との併用効果によって解析した。その結果、これらはいずれも主作用点を DNA 複製を進行させる1つの同じ酵素とすると考えられるが、それとの結合部位はそれぞれの化合物の側基の化学構造に従って異なっており、それに応じてその結合を受ける酵素側の位置も相互に異なっていると考えられることがわかった。今回しらべた8薬剤は化学構造によって5群に分けられ、それらの結合位置の関係によって、相互の群の薬剤の相乗効果、相加効果、あるいはまったく独立に働くことが矛盾なく説明できた。

序 文

Nalidixic acid や pipemidic acid などの γ-pyridone-β-carboxylic acid 構造を含む化学療法剤は原核生物である細菌の DNA の複製を進行させる酵素を阻害して作用を現わすと考えられている^{1,2)}。これらは真核細胞の DNA 合成には作用しないために安全性が高い。そのため、すでにかかなりの数の類似構造物が開発されている。われわれはすでに人体薬として市販されているこれらの系統の薬剤の2つである nalidixic acid と pipemidic acid の併用が相乗効果をもつことを明らかにした³⁾。これは、本来作用点が同じであると考えられていた⁴⁾これらの2剤が実は異なる結合位置(作用点)をもつ可能性を示唆する。そこで、この系統に属する構造の異なる薬剤について、その nalidixic acid および pipemidic acid との併用効果をしらべることによって、それらの薬剤の作用点の相違と構造との関係を推測することにした。

材料と方法

薬剤: Nalidixic acid (NA), 1-ethyl-1,4-dihydro-7-(4-methylpiperazino-1-yl)-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (MPNA), 1-ethyl-1,4-dihydro-7-(morpholino-1-yl)-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (MONA) および 6-ethyl-1,3,6,7-tetrahydro-3-methyl-2,9-dioxothiazolo [5,4-f] quinoline-8-carboxylic acid (TQA) は第一製薬 堂森博士から分与を受けた。また, pipemidic acid (PPA) および piromidic acid (PA) は大日本製薬 清水博士から, oxolinic acid (OA) は田辺製薬, AM 715 (AM) は杏林製薬から分与を受けた。これらの薬剤の化学構造を Fig. 1 に示した。

菌株: 前報³⁾に用いたものを用いた。すなわち, *Escherichia coli* NIHJ JC 2 株を主に用い, 他にわれわれが保存している *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* および *Klebsiella pneumoniae* の臨床分離株各1株を用いた。

培地: 菌株の前培養は Trypticase soy broth (BBL) でおこない, 薬剤平板には感受性ディスク用培地(日本)を用いた。

併用効果の判定: 前報³⁾と同様である。すなわち, 各薬剤は 10 mg/ml に 0.1 N NaOH で溶かし, 直ちに必要な薬剤濃度の 30 倍の濃度に滅菌蒸留水で希釈して, 各シャーレにそれぞれの薬剤の濃度の異なる組合せの溶液を各 0.5 ml ずつ入れ, それに寒天培地 14 ml をそそ

Fig. 1 Antibacterial compounds containing γ-pyridone-β-carboxylic acid structure employed

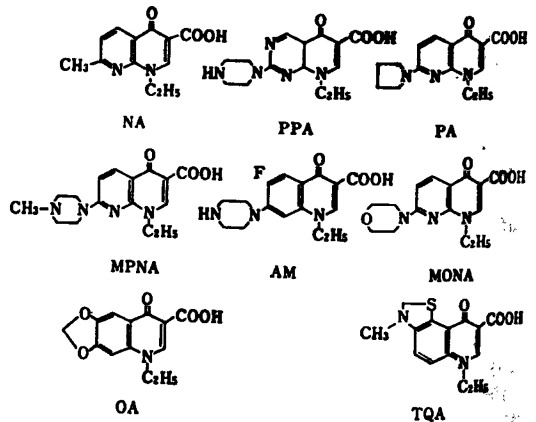


Fig. 2 Antibacterial activity of the combination of piromidic acid with nalidixic acid or pipemidic acid against *E. coli* NIHJ : JC 2

a. Combination of piromidic acid with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

P A	N A				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	++	—
0.1	##	##	++	—	—
0.2	##	##	+	—	—
0.4	+	—	—	—	—
0.8	—	—	—	—	—

b. Combination of piromidic acid with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

P A	PPA				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	++	—
0.1	##	##	##	—	—
0.2	##	##	++	—	—
0.4	+	—	—	—	—
0.8	—	—	—	—	—

Fig. 3 Antibacterial activity of the combination of oxolinic acid with nalidixic acid or pipemidic acid against *E. coli* NIHJ : JC 2

a. Combination of oxolinic acid with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

O A	N A				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.00625	##	##	##	##	—
0.0125	##	##	##	++	—
0.025	##	##	—	—	—
0.05	—	—	—	—	—

いで作った。指示菌は、接種菌量による効果を除くために単個菌を接種することにした。すなわち、菌株の前培養をさらに同じ培地で100倍に希釈して振盪培養して対数増殖期にし、それを滅菌生理的食塩水で約 $10^4/\text{ml}$ に希釈し、その 0.1 ml をそれぞれの寒天平板の表面に塗抹した。これらの平板を 37°C で18時間培養し、出現した集落の数を薬剤を含まない培地上的集落数と比較し

b. Combination of oxolinic acid with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

O A	PPA				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.00625	##	##	##	++	—
0.0125	##	##	##	—	—
0.025	++	++	—	—	—
0.05	—	—	—	—	—

Fig. 4 Antibacterial activity of the combination of methyl piperazinoyl nalidixic acid with nalidixic acid or pipemidic acid against *E. coli* NIHJ : JC 2

a. Combination of methyl piperazinoyl nalidixic acid with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

MPNA	N A				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.4	##	##	##	±	—
0.8	##	##	##	±	—
1.6	##	##	##	—	—
3.1	—	—	—	—	—
6.25	+	—	—	—	—
12.5	++	—	—	—	—

b. Combination of methyl piperazinoyl nalidixic acid with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

MPNA	PPA				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.4	##	##	##	++	—
0.8	##	##	##	±	—
1.6	##	##	±	—	—
3.1	—	—	—	—	—
6.25	+	±	—	—	—
12.5	++	+	—	—	—

た。

成 績

PA, OA, MPNA, MONA, AM, および TQA を NA および PPA と併用した場合の大腸菌 NIHJ JC 2 株に

Fig. 5 Antibacterial activity of the combination of morpholinoyl nalidixic acid with nalidixic acid or pipemidic acid against *E. coli* NIHJ: JC 2

a. Combination of morpholinoyl nalidixic acid with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

MONA \ NA	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	++	—
0.1	##	##	##	+	—
0.2	##	##	##	—	—
0.4	##	##	++	—	—
0.8	—	—	—	—	—

b. Combination of morpholinoyl nalidixic acid with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

MONA \ PPA	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.1	##	##	##	≠	—
0.2	##	##	##	++	—
0.4	##	##	##	—	—
0.8	±	—	—	—	—
1.6	—	—	—	—	—

Fig. 6 Antibacterial activity of the combination of AM 715 with nalidixic acid or pipemidic acid against *E. coli* NIHJ: JC 2

a. Combination of AM 715 with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

AM \ NA	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	±
0.0016	##	##	##	##	—
0.0032	##	##	##	##	—
0.00625	##	##	##	±	—
0.0125	##	##	±	—	—
0.025	—	—	—	—	—

対する抗菌活性を Fig. 2, 3, 4, 5, 6 および 7 の a および b に示した。PA は NA, PPA いずれとの組合せでも相乗的に働き、OA と MPNA とは NA との組合せでは相加的に、PPA との組合せでは相乗的に働き、MONA

b. Combination of AM 715 with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

AM \ PPA	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.0016	##	##	##	##	—
0.0032	##	##	##	##	—
0.00625	##	##	##	##	—
0.0125	##	##	##	±	—
0.025	—	—	—	—	—

Fig. 7 Antibacterial activity of the combination of ethyl-(methyl-dioxothiazolo)quinoline carboxylic acid with nalidixic acid or pipemidic acid against *E. coli* NIHJ: JC 2

a. Combination of ethyl-(methyl-dioxothiazolo)quinoline carboxylic acid with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

TQA \ NA	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.0125	##	##	##	##	—
0.025	##	##	##	##	—
0.05	##	##	##	++	—
0.1	—	—	—	—	—

b. Combination of ethyl-(methyl-dioxothiazolo)quinoline carboxylic acid with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

TQA \ PPA	0	0.1	0.2	0.4	0.8
0	##	##	##	##	—
0.0125	##	##	##	##	—
0.025	##	##	≠	##	—
0.05	##	##	##	++	—
0.1	—	—	—	—	—

は NA, PPA のいずれとも相加的に働き、AM は NA との組合せで相乗的に、PPA との組合せでは相乗的に働き、TQA は NA, PPA のいずれと組合せでも抗菌活性が変らないことがわかった。

次に、これらの大腸菌を指標菌として見た現象が他の細菌に対しても成り立つかどうかをしらべた。AM の

Fig. 8 Antibacterial activity of the combination of AM 715 with nalidixic acid or pipemidic acid against *Pseudomonas aeruginosa*

a. Combination of AM 715 with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

NA							
AM \ NA	0	3.1	6.25	12.5	25	50	
0	##	##	##	##	+	-	
0.025	##	##	##	##	+	-	
0.05	##	##	##	##	+	-	
0.1	##	##	##	+	-	-	
0.2	##	##	##	-	-	-	
0.4	-	-	-	-	-	-	

b. Combination of AM 715 with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

PPA							
AM \ PPA	0	0.4	0.8	1.6	3.1	6.25	
0	##	##	##	##	##	-	
0.025	##	##	##	##	##	-	
0.05	##	##	##	##	##	-	
0.1	##	##	##	##	##	-	
0.2	##	##	##	##	-	-	
0.4	-	-	-	-	-	-	

Fig. 9 Antibacterial activity of the combination of AM715 with nalidixic acid or pipemidic acid against *Serratia marcescens*

a. Combination of AM 715 with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

NA							
AM \ NA	0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	
0	##	##	##	##	##	-	
0.0125	##	##	##	##	+	-	
0.025	##	##	##	##	+	-	
0.05	##	##	##	##	±	-	
0.1	##	##	##	±	-	-	
0.2	±	-	-	-	-	-	

b. Combination of AM 715 with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

PPA							
AM \ PPA	0	0.4	0.8	1.6	3.1	6.25	
0	##	##	##	##	##	±	
0.0125	##	##	##	##	##	±	
0.025	##	##	##	##	##	-	
0.05	##	##	##	##	##	-	
0.1	##	##	##	±	±	-	
0.2	±	±	-	-	-	-	

Fig. 10 Antibacterial activity of the combination of AM 715 with nalidixic acid or pipemidic acid against *Klebsiella pneumoniae*

a. Combination of AM 715 with nalidixic acid ($\mu\text{g/ml}$)

NA							
AM \ NA	0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	
0	##	##	##	##	##	-	
0.025	##	##	##	##	##	-	
0.05	##	##	##	##	##	-	
0.1	##	##	##	##	±	-	
0.2	##	+	±	-	-	-	
0.4	±	-	-	-	-	-	

b. Combination of AM 715 with pipemidic acid ($\mu\text{g/ml}$)

PPA							
AM \ PPA	0	0.4	0.8	1.6	3.1	6.25	
0	##	##	##	##	##	-	
0.025	##	##	##	##	##	-	
0.05	##	##	##	##	±	-	
0.1	##	##	##	##	±	-	
0.2	##	##	±	±	-	-	
0.4	-	-	-	-	-	-	

よび 10 の a および b に示した。 *Pseudomonas* と *Serratia* に対して、AM は NA とは相乗的に、PPA とは相加的に働くことが確認された。しかし、 *Klebsiella* に対しては、AM は NA, PPA のいずれとも相乗的に働くことがわかった。

NA および PPA と併用した場合の *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* および *Klebsiella pneumoniae* に対する抗菌活性をそれぞれ Fig. 8, 9 お

考 察

2つの薬剤を併用した場合、相乗効果がおこる機序は必ずしも全て明らかにされているわけではない。しかし、*in vitro* で単一の細菌株を用いたときにみられる相乗効果の原因としては、a) 1剤による細胞壁または膜の障害によって他剤の菌体内への transport が促進される場合、b) 一連の代謝系の異なる段階を阻害する組合せの場合、および c) 1剤が他剤の不活化を阻止する場合が主に考えられている。NA や PPA などの作用機序については、必ずしも全てが明らかでないが、いずれも主作用は同じで、DNA 鎖の伸長をさまたげる⁹⁾、ことが明らかにされており、その構造の類似性からも同一の主作用点をもつものと考えられている⁹⁾。しかし、このような場合、併用は相加効果しかもたないはずである。しかるに、NA と PPA の併用が相乗効果をもたらしたことは、この両剤が、DNA 鎖伸長に参与する1つの酵素の異なる部位に結合して同一の機構で働いているのか、あるいは相互にごく近い関係にある異なる酵素あるいは段階(副作用点)に働いている可能性を示唆する。したがって、NA および PPA に類似する構造をもつ他剤を多くとり上げ、*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* および *K. pneumoniae* を指示菌として、NA および PPA とそれぞれの薬剤の併用による抗菌活性の変化をしらべれば、これらの薬剤の作用点の相違と、作用点を決定している構造を推測することができる。

まず、PAは NA, PPA のいずれとも相乗的に働くから、PA は NA および PPA のいずれとも別々に同時に標的に結合できるものと考えられる。そして、この場合 NA では7位の methyl 基が、PPA と PA では NA の7位に相当する位置の piperazinyl 基および pyrrolidinyl 基がそれぞれ異なる標的への結合特異性を示していると考えなければならない。また、OA と MPNA とは、NA との併用では相加的にしか働かず、PPA とは相乗的に働くことから、NA と同じ標的あるいは、少なくとも NA と同時に標的に結合することはできず、PPA とは同じ標的あるいは同時に結合できることになる。ここでこれらを構造と結び付けて考えると、MPNA では7位の methyl piperazinoyl 基全体ではなく、先端の4位の位置にある methyl 基が結合特異性を決めており、OA では NA と同じ構造はないが、6, 7位の methylenedioxy 構造の methylene 部分が結合に参与していると考えることができよう。また、MONA は、NA, PPA のいずれとも相加的にしか働かないから、MONA の結合は NA, PPA のいずれの結合とも競合して、どちらか一方しか結合できないことになる。こう考えると、 γ -pyridone- β -carboxylic acid を含む化合物の標的が

DNA 複製に参与する異なる段階にあると考えるより、同じ段階に参与する酵素の近接しているが異なる位置に結合して、 γ -pyridone- β -carboxylic acid 構造によって同じ作用を現わすと考えることで全てをよく説明できる。すなわち、相乗的な組合せでは、一方の結合が他方の結合に無関係で、しかもいずれの結合も同時に阻害的に働き、相加的な組合せでは、一方が結合すれば他方は結合できない関係にあることを示唆する。これはまた、MONA の7位の morpholinoyl 基が NA の7位の methyl 基および PPA の2位の piperazinyl 基のいずれとも異なる両者の結合位置の中間的位置に結合することを示唆する。さらに、AM は NA と相乗的で、PPA と相加的に働くから、PPA と同じ結合位置をとり、NA の位置と異なることになる。これは、PPA と AM に共通の piperazinyl 基が結合特異性を決めて示している。最後に、TQA は、NA, PPA のいずれとの組合せでも独立に作用している。これは共通の γ -pyridone- β -carboxylic acid 構造にもかかわらず、TQA が NA, PPA とはまったく異なる機構に働いているか、あるいはこれが結合することが NA および PPA の結合を積極的に排除する可能性を示唆している。TQA も DNA 複製を阻止するのであれば、おそらく後者の可能性のほうが高いであろうし、化学構造からもそのほうが説明し易い。

これらの結合特異性と化学構造の関係は、併用時の相互効果から推測したものであって、決して決定的に証明したものではないが、それにもかかわらず、併用効果によって共通な結合位置をとると考えられるものには矛盾なく同じ化学構造がみられることは、この推測の現実性が高いことを示唆するものであると考える。これらの併用効果は *E. coli* でしらべたものであるが、*Pseudomonas*, *Serratia* および *Klebsiella* についてもほとんど同一の結果が得られている。ただ、AM と PPA の併用試験で、*Klebsiella* を指標菌にしたとき相乗効果がみられたことが唯一の矛盾であった。しかし、これは、それぞれの菌種で DNA 複製機構に参与する酵素にわずかな相違があって、たまたまこの組合せで piperazinyl 基ではなく6位の活性以下が特異な働きをしたと考えれば説明できるであろう。

以上まとめると、 γ -pyridone- β -carboxylic acid 構造を含む化合物は、いずれも DNA 複製の進行を阻害し、この阻害活性そのものはこの構造によると考えられるが、これらの化合物がその機能をもつ酵素と結合する部位は NA は7位の methyl 基、MPNA は7位の piperazinoyl 基の4位の methyl 基、OA は6, 7位の methylenedioxy 基の methylene 部分、PPA と AM

は NA の 7 位に相当する位置の piperazinyl 基, PA は同じ位置の pyrrolidinyl 基, MONA は 7 位の morpholinoyl 基と異なっているものもある。NA, MPNA の methyl 基と OA の methylene 基は同じ標的上の位置と結合して相互に競合し, PPA と AM の piperazinyl 基は NA とは異なる位置に結合して相互には競合するが NA のグループとは同時に結合できる。一方, MONA の結合位置は NA および PPA のいずれの位置とも近接していずれとも競合的に結合するし, PA の結合位置は NA および PPA の位置のいずれとも離れていて競合しない。TQA の結合部位は, NA および PPA のいずれの結合位置とも同じかあるいは近く, その上結合活性が強いのですでに結合している NA や RRA を排除する働きがあると考えられることがわかった。

文 献

- 1) BOURGUIGNON, G. J.; M. LEVITT & R. STERNGLANZ: Studies on the mechanism of action

of nalidixic acid. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 4: 479~486, 1973

- 2) GELLERT, M.; K. MIZUUCHI, M. H. O'DEA, T. ITOH & J. TOMIZAWA: Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 74: 4772~4776, 1977
- 3) 新井俊彦: Pipemidic acid と併用可能な薬剤の検索。 *Chemotherapy* 28(8): 1060~1063, 1980
- 4) DARVAS, F.; Z. MÉSZÁROS, L. KOVÁCS, I. HERMERZ, M. BALOGH & J. KARDOS: Investigation of the common mechanism of action of antibacterial compounds containing γ -pyridone- β -carboxylic acid structure by principal component. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29(11): 1334~1339, 1979
- 5) 田中信男, 中村昭四郎著: 抗生物質大要, 第 2 版, 第 8 章, 抗生物質の併用, p.290~295, 東大出版会, 1977

CHEMICAL STRUCTURES OF THE CHEMOTHERAPEUTICS CONTAINING γ -PYRIDONE- β -CARBOXYLIC ACID AND THEIR ANTIBACTERIAL TARGET SPECIFICITIES

TOSHIHIKO ARAI

Department of Microbiology, Keio University School of Medicine

Target specificities of various chemotherapeutics containing γ -pyridone- β -carboxylic acid were examined by their antibacterial effects in combination with nalidixic acid and pipemidic acid. It was known that all of these compounds inhibit DNA replication by blocking the elongation of DNA chains. But these drugs were found to be classified into five groups by their synergic, additive, or independent relations in combinational uses with nalidixic acid and pipemidic acid. And this result indicated that each group had always the common side structure, suggesting the relations among chemical structures and target specificities of these compounds.