

Nalidixic acid, Pipemic acid および Miloxacin

高濃度作用時の殺菌性の減弱について

尾花 芳樹・真屋 幸弘・西野 武志

京都薬大微生物

(昭和 55 年 3 月 17 日受付)

合成化学療法剤 Nalidixic acid, Pipemic acid および Miloxacin を肺炎桿菌に高濃度作用させた時の抗菌作用について検討を加え、次のような結果が得られた。

1) 殺菌作用について検討したところ、各薬剤の 16 MIC 作用で殺菌性が最大となり、これよりも高濃度作用では殺菌性の低下(殺菌性の逆転)が認められた。また高濃度作用でも 6 時間以上作用させると dose response が認められた。

2) EDTA 処理により osmotic shock をかけた菌では高濃度作用でも殺菌性の逆転は認められなかった。

3) 殺菌性の逆転に及ぼす Chloramphenicol, Mitomycin C および Rifampicin 添加の影響ではこれらの薬剤添加により殺菌性の逆転が認められなくなった。

4) 菌体高分子合成に及ぼす影響では、RNA 含量、Protein 含量では dose response のある合成阻害が認められた。DNA 含量では他の成分より強い阻害が認められたが、あまり dose response がなかった。

序 文

合成化学療法剤 Nalidixic acid は主にグラム陰性菌に抗菌活性を有する物質であり¹⁾、その第 1 次作用点は数多くの研究結果から、DNA 合成阻害であると言われてきたが²⁻⁴⁾、DNA replication のどの部位に作用するかは不明であった。しかしながら、ごく最近 SUGINO ら⁵⁾は、DNA gyrase 作用による DNA 合成阻害であるとの報告を行い、その作用機序が注目されている。

一方、英国の CRUMPLIN⁶⁾あるいは米国の WINSHELL ら⁷⁾は、この薬剤を大腸菌、エンテロバクター、変形菌などに高濃度作用させた時に殺菌作用が減弱するという事実を報告しており、また殺菌性発現において、dose response がないことも良く知られており、これらの面のメカニズムについても興味の持たれる薬剤である。

そこで今回、Nalidixic acid および構造類似化学療法剤 Pipemic acid⁸⁾、Miloxacin⁹⁾ を供試薬剤 (Fig. 1) として肺炎桿菌に高濃度作用させた時の抗菌作用について検討を行い、また殺菌作用減弱のメカニズムについて若干の検討を加え、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1) 使用薬剤および菌株

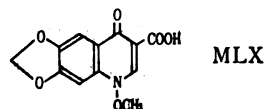
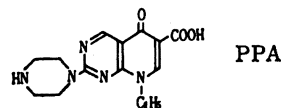
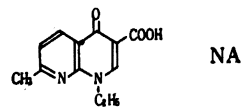
薬剤は Nalidixic acid (NA: 第一製薬 K.K.), Pipemic acid (PPA: 大日本製薬 K.K.), Miloxacin

(MLX=AB-206: 住友化学工業 K.K.), Chloramphenicol (CP: 三共 K.K.), Mitomycin C (MMC: 協和醗酵工業 K.K.), Rifampicin (RFP: 第一製薬 K.K.) のそれぞれ標準品を用いた。また菌株は臨床分離の肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を供試した。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

Tryptosoya broth (TSB: Nissui) で前培養した菌液を Heart infusion broth (HIB: Nissui) に接種し、37°C で振とう培養を行い、対数増殖期まで増菌させる

Fig. 1 Structure



(約 5×10^7 cells/ml)。この菌液にそれぞれ薬剤を添加し、薬剤作用 3 時間後の生菌数を混濁法により測定した。なお使用菌株の各薬剤に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は、NA および PPA が $3.12 \mu\text{g/ml}$ 、MLX は $0.78 \mu\text{g/ml}$ であり、薬剤濃度は MIC の 8, 16, 32, 64 倍とした。次に薬剤作用時間の影響については、薬剤濃度を 16, 64 MIC とし、前記と同様の方法で作用させ、薬剤作用 2, 4, 6, 8 時間後の生菌数を測定した。

3) 殺菌作用に及ぼす pH の影響

各 pH の M/15 Phosphate buffer (PBS) に HIB を溶解させ、培地 pH をそれぞれ 6.0, 7.0, 8.0 に調整し、この培地に前培養菌を接種し、対数増殖期まで増殖させた。この菌液に薬剤を添加し、経時的に生菌数測定を行った。

4) Osmotic shocked cells に対する影響

対数増殖期に達した菌を遠心集菌し、M/20 Tris-HCl buffer (pH 8.0) で洗浄後、同 buffer に約 1×10^8 cells/ml になるように懸濁した。この菌液に最終濃度 1 mM EDTA を加え、15 分間 37°C で処理する。その後、過剰の HIB を加え、EDTA 除去のため、低温下で遠心洗浄を行った。このようにして得られた EDTA 前処理菌を HIB に懸濁 (約 5×10^7 cells/ml) し、各薬剤を加え、経時的に生菌数測定を行った。

5) 殺菌作用に及ぼす Chloramphenicol, Mitomycin C および Rifampicin 添加の影響

対数増殖期に達した菌に CP, MMC あるいは RFP を先に添加し、作用 30 分後に NA, PPA あるいは MLX を加え培養を続け、経時的に生菌数測定を行った。

6) 菌体高分子合成に及ぼす影響

各 pH の培地で培養した菌あるいは osmotic shocked cells に薬剤を作用させ、菌をサンプリングし、PARK-HANCOCK ら¹⁰⁾の方法で細胞分画を行い、TCA 可溶性分画および TCA 不溶性分画を得た。これらの各分画を Orcinol 法, Diphenylamine 法および LOWRY-FOLIN 法で比色定量し、それぞれ RNA, DNA および Protein 含量を測定した。

実験結果

1) 増殖曲線に及ぼす影響

各薬剤作用 3 時間後の生菌数を測定した結果を Fig. 2 に示した。各薬剤とも殺菌作用が認められるが、生菌数の減少率は 16 MIC 作用で最大となり、これよりも高濃度作用になると減少率は低下してくること (殺菌性の逆転) が認められた。また薬剤作用時間の影響の結果を Fig. 3~5 に示した。各薬剤とも作用時間が 2~4 時間で殺菌性の逆転が起り、6 時間でもわずかに、この傾向

Fig. 2 Effect of NA, PPA and AB-206 on the viability of *K. pneumoniae*

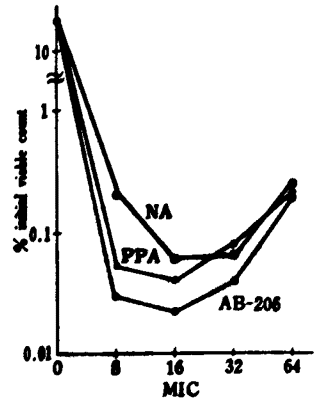


Fig. 3 Effect of NA on the viability of *K. pneumoniae*

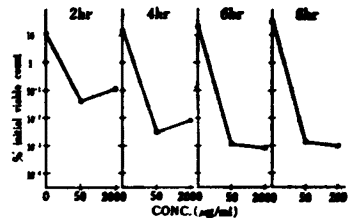


Fig. 4 Effect of PPA on the viability of *K. pneumoniae*

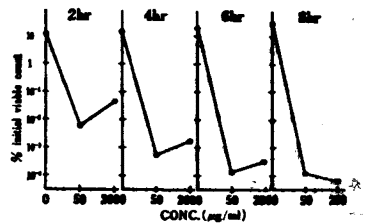


Fig. 5 Effect of AB-206 on the viability of *K. pneumoniae*

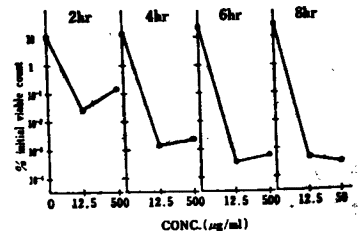


Fig. 6 Effect of NA on the viability of *K. pneumoniae*

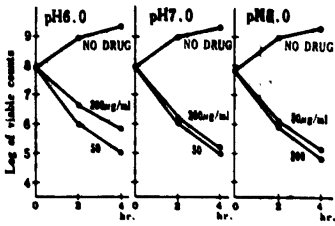


Fig. 7 Effect of PPA on the viability of *K. pneumoniae*

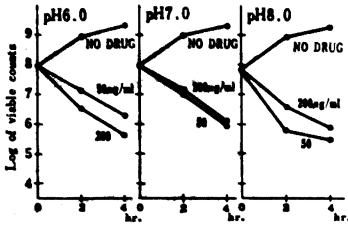


Fig. 8 Effect of AB-206 on the viability of *K. pneumoniae*

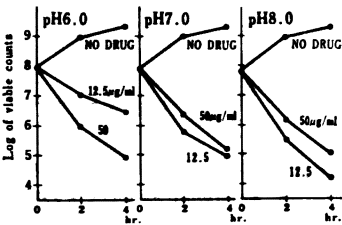


Fig. 9 Effect of NA on the viability of *K. pneumoniae*

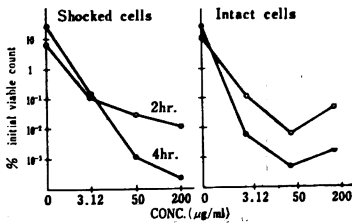


Fig. 10 Effect of PPA on the viability of *K. pneumoniae*

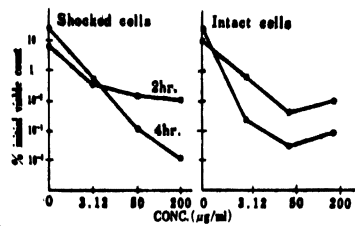


Fig. 11 Effect of AB-206 on the viability of *K. pneumoniae*

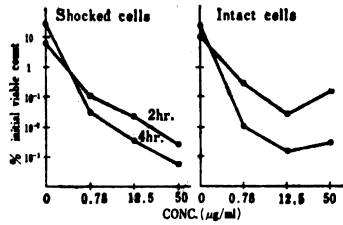


Fig. 12 Combination effect of NA on *K. pneumoniae* with CP

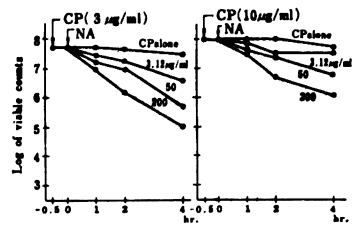
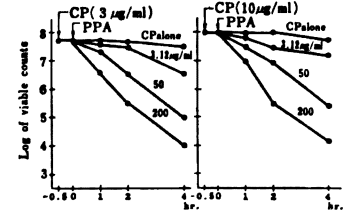


Fig. 13 Combination effect of PPA on *K. pneumoniae* with CP



が認められた。しせしながら薬剤作用 8 時間ではわずかであるが、dose response が認められた。この場合、培地 pH の大きな変動は認められなかった。

2) 殺菌作用に及ぼす培地の pH の影響
各 pH の培地中で殺菌作用を検討した結果を Fig. 6~8 に示した。NA, MLX では pH 7.0~8.0 で殺菌性の

逆転が認められるが、pH 6.0 では dose response のある作用を示した。また PPA では他の 2 薬剤とは逆に pH 7.0~pH 6.0 で殺菌性の逆転が認められるが pH 8.0 では、わずかに dose response のある作用を示した。

3) Osmotic shocked cells に対する影響

Fig. 14 Combination effect of AB-206 on *K. pneumoniae* with CP

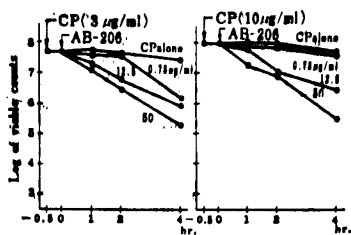


Fig. 15 Combination effect of NA on *K. pneumoniae* with MMC

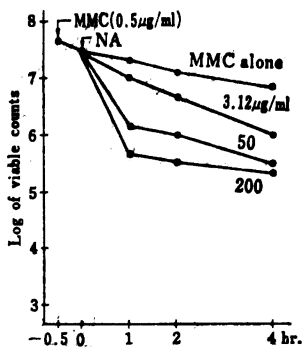


Fig. 16 Combination effect of PPA on *K. pneumoniae* with MMC

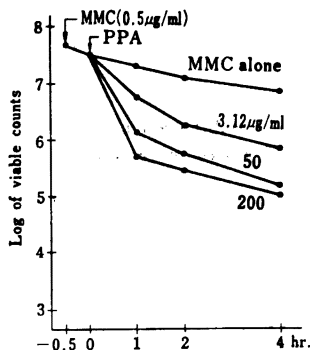


Fig. 17 Combination effect of AB-206 on *K. pneumoniae* with MMC

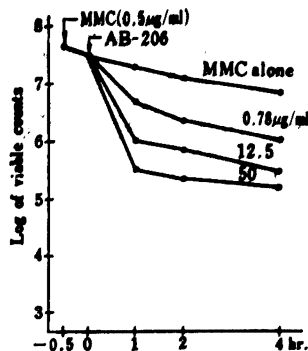


Fig. 18 Combination effect of NA on *K. pneumoniae* with RFP

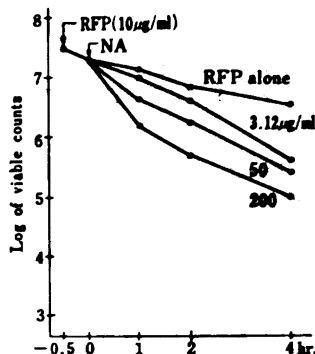
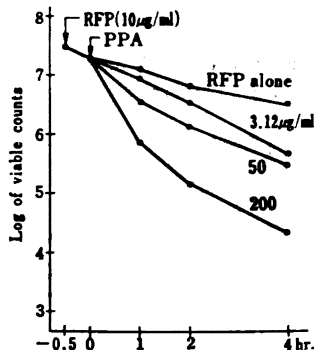


Fig. 19 Combination effect of PPA on *K. pneumoniae* with RFP



EDTA 処理により osmotic shock をかけた菌に対する殺菌作用を検討した結果を Fig. 9~11 に示した。いずれの薬剤においても, intact cells では, 明らかな殺菌性の逆転が認められた。しかしながら osmotic shocked cells では, もはや殺菌性の逆転は認められず, dose response のある作用を示した。

4) 殺菌作用に及ぼす Chloramphenicol, Mitomycin C および Rifampicin 添加の影響

殺菌作用に及ぼす CP 添加の影響を検討した結果を Fig. 12~14 に示した。いずれの薬剤もその殺菌作用発現に CP の添加の影響をほとんど受けず,むしろ CP 無添加で認められたような殺菌性の逆転はなく, dose response のある作用を示した。MMC, RFP の影響の結果を Fig. 15~20 に示した。いずれの場合も, 3薬剤

Fig. 20 Combination effect of AB-206 on *K. pneumoniae* with RFP

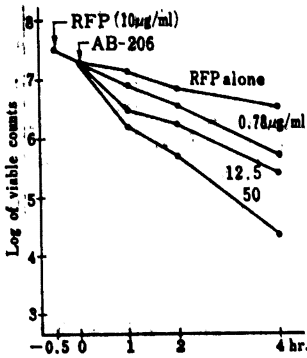


Fig. 21 Effect of NA on the synthesis of macromolecules

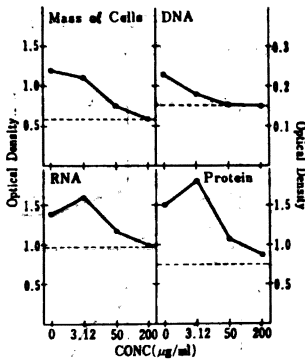


Fig. 22 Effect of PPA on the synthesis of macromolecules

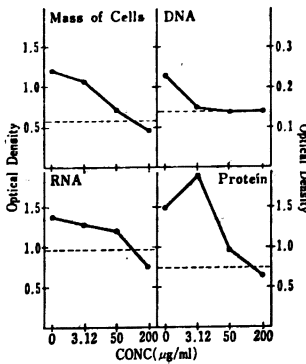


Fig. 23 Effect of AB-206 on the synthesis of macromolecules

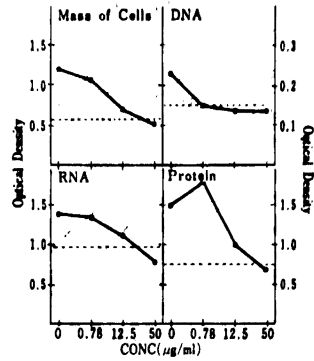


Fig. 24 Effect of NA on the synthesis of macromolecules

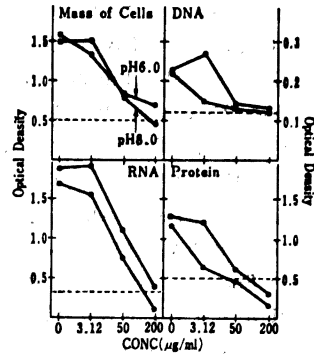


Fig. 25 Effect of PPA on the synthesis of macromolecules

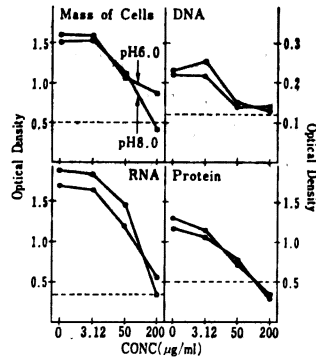


Fig. 26 Effect of AB-206 on the synthesis of macromolecules

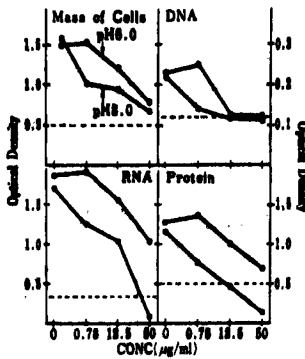
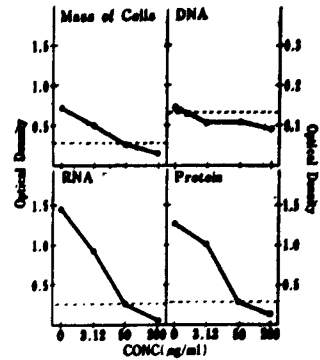


Fig. 27 Effect of NA on the synthesis of macromolecules



ともに殺菌作用発現に MMC あるいは RFP の添加の影響をほとんど受けず, dose response のある殺菌作用が認められた。

5) 菌体高分子合成に及ぼす影響

Intact cells に pH 7.2 の HIB 中で薬剤作用を行った時の各分画含量測定の結果を Fig. 21~23 に示した。いずれの薬剤ともに RNA 含量, Protein 含量では dose response のある合成阻害が認められたが, DNA 含量では, MIC 以上の高濃度作用においても阻害度はあまり差が認められなかった。Intact cells に pH 6.0 あるいは pH 8.0 の HIB 中で薬剤作用を行った時の各分画含量測定の結果を Fig. 24~26 に示した。NA, MLX 作用では, 培地 pH が 6.0 および 8.0 で RNA 含量, Protein 含量ともに dose response が認められた。しかしながら DNA 含量では pH 6.0 で, MIC 作用と 16~64 MIC 作用に dose response は認められるが, 16 MIC と 64 MIC にはほとんど dose response は認められなかった。また pH 8.0 では MIC~64 MIC では dose response は認められなかった。PPA 作用では培地 pH が 6.0 と 8.0 ではほとんど同様な傾向を示した。すなわち RNA 含量, Protein 含量では dose response が認められたが, DNA 含量では高濃度作用において dose response のある合成阻害が認められなかった。次に EDTA 処理により得られた osmotic shocked cells に薬剤作用を行った時の各分画含量測定の結果を, Fig. 27~29 に示した。この場合, 3 薬剤ともに intact cells (pH 7.2) の時と同様な傾向が認められ, RNA 含量, Protein 含量では dose response が認められたが, DNA 含量では, やはり dose response のある合成阻害は認められなかった。また EDTA 処理を受けた菌は, intact な菌よりも薬剤による合成阻害を強く受ける傾向にあった。

Fig. 28 Effect of PPA on the synthesis of macromolecules

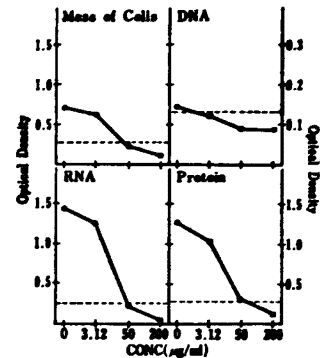
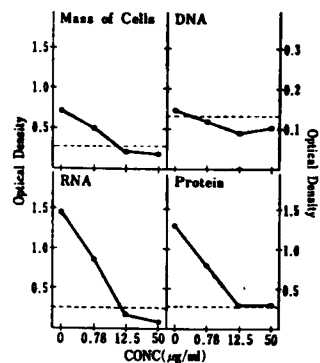


Fig. 29 Effect of AB-206 on the synthesis of macromolecules



総括および考察

合成化学療法剤 Nalidixic acid (NA), Pipemidic acid (PPA) および Miloxacin (MLX) を肺炎桿菌に高濃度作用させた時の抗菌作用について検討を加え、次のような結果が得られた。まず殺菌作用では、薬剤作用 3 時間の場合、各薬剤の 16 MIC (12.5 あるいは 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作用で殺菌性は最大となり、これよりも高濃度作用では殺菌性が低下することが認められた。これらの現象は既に CRUMPLIN⁹⁾ や WINSHELL⁷⁾ が、他の菌種について報告しているが、今回得られた結果とはほぼ一致していた。しかし CRUMPLIN⁹⁾ はこれらの現象を大腸菌、エンテロバクター、変形菌、赤痢菌、サルモネラなどで認めており、菌種菌株に特別な現象ではないと述べている。我々は肺炎桿菌、大腸菌、緑膿菌、セラチアなどを使用して検討を行ったが、緑膿菌、セラチアなどでは特徴的な殺菌性の逆転を認めなかった。また薬剤作用時間の検討では、作用 2~4 時間では殺菌性の逆転が起るが、6 時間以上になると次第に dose response が認められるようになった。EDTA 処理により osmotic shock をかけた菌に対する殺菌性では殺菌性の逆転は認められなかった。1965 年 LEIVE¹¹⁾ は EDTA 処理をした Actinomycin D 非感受性大腸菌は Actinomycin D に感受性となることから、EDTA 処理により透過性の亢進が起り、薬剤が作用しやすくなったものと報告している。今回我々の実験では、EDTA 処理により肺炎桿菌の外膜透過性が亢進し、dose response のある NA, PPA, MLX の作用が出たものと考えられる。しかしながら、この現象だけでは、殺菌性の逆転を説明することは困難であり、DNA 合成系への親和性などの面からも考慮する必要があると思われる。殺菌性に及ぼす Chloramphenicol, Mitomycin C および Rifampicin 添加の影響では、これらの薬剤は NA, PPA, MLX の殺菌作用発現には影響しないが、殺菌性の逆転は、これらの薬剤を併用することにより認められなくなり dose response が認められた。これは、NA, PPA, MLX の殺菌性の逆転に関与する反応系に Chloramphenicol, Mitomycin C, Rifampicin が関係するものと考えられる。菌体高分子合成に及ぼす影響では、RNA 含量、Protein 含量では dose response のある合成阻害が認められたが、DNA 含量では他の成分より阻害度が強いものの、あまり dose response がなかった。

以上のようなことから、薬剤高濃度作用により殺菌性の逆転が起るのは、種々な要因が総合的に働くものと思われる。例えば、薬剤自身の物理化学的变化、膜透過性の変化、他の作用点の出現、DNA 合成系の変異などが考えられる。しかし今回の若干の検討結果から考察する

と、最も大きな要因となりうるのは透過性の変化によるものと考えられ、さらに詳細な検討を加えていくつもりである。

文 献

- 1) 中沢昭三, 中村敦子, 丹羽能子, 余公元子: 新化学療法剤 Nalidixic acid に関する基礎的研究。Chemotherapy 13: 139~145, 1965
- 2) GOSS, W. A.; W. H. DEITZ & T. M. COOK: Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. J. Bact. 88: 1112~1118, 1964
- 3) GOSS, W. A.; T. M. COOK & W. H. DEITZ: Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Bact. 89: 1068~1074, 1965
- 4) COOK, T. M.; K. G. BROWN, J. V. BOYLE & W. A. GOSS: Bactericidal action of nalidixic acid on *Bacillus subtilis*. J. Bact. 92: 1510~1514, 1966
- 5) SUGINO, A.; C. L. PEEBLES, K. N. KREUZER & N. R. COZZARELLI: Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74(11): 4767~4771, 1977
- 6) CRUMPLIN, G. C. & J. T. SMITH: Nalidixic acid: an antibacterial paradox. Antimicrob. Agents & Chemoth. 8: 251~261, 1975
- 7) WINSHELL, E. B. & H. S. ROSENKRANZ: Nalidixic acid and the metabolism of *Escherichia coli*. J. Bact. 104: 1168~1175, 1970
- 8) 中沢昭三, 西野武志, 浜野泰久, 石山正光: 合成化学療法剤 Pipemidic acid に関する細菌学的研究。Chemotherapy 23: 2647~2657, 1975
- 9) 西野武志, 尾花芳樹, 和田美智, 中沢昭三: 新合成化学療法剤 AB-206 に関する細菌学的評価。Chemotherapy 26: 27~40, 1978
- 10) PARK, J. T. & R. HANCOCK: A fractionation of procedure for studies of the synthesis of cell wall mucopeptide and of other polymers in cells of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 22: 249~258, 1960
- 11) LEIVE, L.: A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. Proc. Nat. Acad. Sci. 53: 745~750, 1965

LOWERING OF THE BACTERICIDAL ACTION BY EXPOSURE TO HIGH CONCENTRATIONS OF NALIDIXIC ACID, PIPEMIDIC ACID AND MILOXACIN

YOSHIKI OBANA, YUKIHIRO MATA and TAKESHI NISHINO
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The antibacterial action of three chemotherapeutic agents, nalidixic acid, pipemidic acid and miloxacin, was studied by observing how these three agents, when used in high concentrations, act on *Klebsiella pneumoniae*, and the following results were obtained.

1. The bactericidal action of each of these agents was the most potent when used in the concentration which was 16 times the MIC, and lowering of the bactericidal action (reversion of the bactericidal action) was detected when the concentrations were higher than the 16 MIC. Dose response was noted when the test organism was acted on for 6 hours or longer by high concentrations of the test agents.
2. When the test organism was given osmotic shock by EDTA treatment, no reversion of the bactericidal action occurred even when the test organism was acted on by high concentrations of the test agents.
3. Possible influence of addition of chloramphenicol, mitomycin C or rifampicin on reversion of the bactericidal action of the test agents was studied, and it was found that no such reversion was caused by addition of these drugs.
4. Influence of the test agents on synthesis of the macromolecular constituents in the cell was studied, and it was found that synthesis of RNA and protein was inhibited, and this inhibition showed dose response relation. Synthesis of DNA was inhibited more markedly as compared with other macromolecular constituents but dose response was less pronounced.