OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Pyridopyrimidine系合成抗菌剤piromidic acidおよびpiromidic acidの抗菌作用機序
Author(s)	中村, 信一
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31687
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【11】

氏名・(本籍)	中村信一
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第3846号
学位授与の日付	昭和52年3月18日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Pyridopyrimidine系合成抗菌剤piromidic acidおよびpipemidic acidの抗菌作用機序
論文審査委員	(主査) 教授 青沼繁 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 岩田平太郎 教授 三浦喜温

論文内容の要旨

緒論

Piromidic acid[1] (以下PAと略) は1971年南らにより，またPipemidic acid[2] (以下PPAと略) は1975年松本らにより合成されたpyridopyrimidine系抗菌剤でFig. 1に示すような化学構造を有している。それらの化学構造は1962年Lesherらにより報告された主としてグラム陰性菌に有効なnaphthylidine系化合物nalidixic acid[3] (以下NAと略) と類似している。PAおよびPPAの抗菌

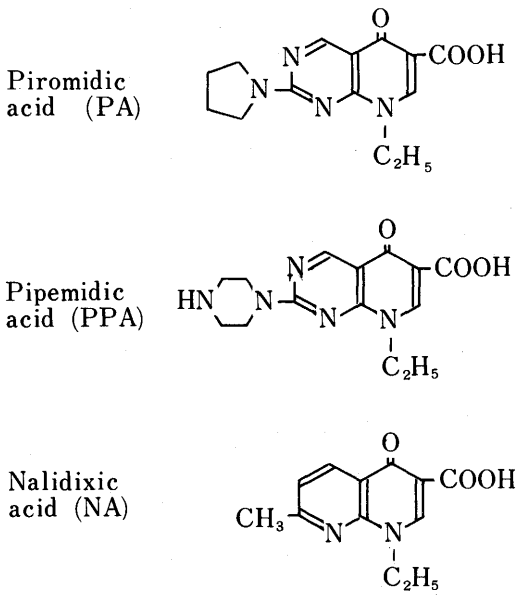

Fig. 1. Chemical structures of piromidic, pipemidic and nalidixic acids.

作用は多くの点でＮＡと類似しているが，前者はブドウ球菌に，後者は緑膿菌にもある程度の抗菌作用を示す点[4,5]でＮＡとは異なる性質を有している。またＰＡとＮＡとの間にはほぼ完全な交差耐性が認められるが，ＰＰＡとＮＡ間の交差耐性は不完全である[5]。

ＮＡの抗菌作用機序に関してはこれ迄にかなりの研究が行なわれており，ＮＡが細菌ＤＮＡの合成を特異的に阻害すること[6,7,8]が明らかにされているが，その分子レベルでの阻害機構は未だに明らかではない。

ＰＡおよびＰＰＡがＮＡと同様の作用機序を示すか否か，またＰＰＡとＰＡまたはＮＡ間に何故不完全交差耐性が認められるのかを明らかにする為，主として大腸菌を用いて作用機序ならびに耐性機序の検討を行なった。

本　論

1．Piromididic acid とpipemidic acidの抗菌作用

ＰＡおよびＰＰＡの抗菌作用を類縁化合物ＮＡと比較して調べたところ，これらの抗菌スペクトルは互に類似しており，主としてグラム陰性菌に強い抗菌作用を示した(Table 1)。しかしＰＡが黄色ブドウ球菌に，ＰＰＡが緑膿菌に比較的強い抗菌作用を示す点ＮＡとは異なる性質であった。

Table 1. Antibacterial spectrum of piromidic, pipemidic and nalidixic acids.

Organism	MIC(μg/mℓ)		
	PPA	PA	NA
Staphylococcus aureus Terajima	25	12.5	100
Staphylococcus aureus 209P, JC-1	12.5	12.5	100
Staphylococcus aureus No. 50774	25	12.5	50
Bacillus subtilis PCI 219	6.25	3.13	6.25
Corynebacterium pyogenes C-21	25	50	400
Erysipelothrix rhusiopathiae Agata	100	200	400
Streptococcus hemolyticus A65	200	400	400
Diplococcus pneumoniae I Neufeld	200	>400	>400
Listeria monocytogenes LI-2402	200	>400	>400
Escherichia coli K-12	1.56	3.13	3.13
Escherichia coli NIHJ, JC-2	1.56	25	12.5
Escherichia coli var. communis	3.13	12.5	3.13
Shigella flexneria 2a FW10	3.13	25	6.25
Shigella sonnei EW33	1.56	6.25	3.13
Salmonella enteritidis No. 1891	1.56	6.25	3.13
Salmonella typhimurium S-9	3.13	12.5	3.13
Klebsiella pkeumoniae No. 13	6.25	50	12.5
Proteus vulgaris OX_{19}	6.25	6.25	6.25
Proteus morganii Kono	3.13	25	6.25
Vibrio parahaemolyticus S-1	3.13	3.13	1.56
Serratia marcescens X100	6.25	50	12.5
Pseudomonas aeruginosa Tsuchijima	12.5	100	100
Pseudomonas aeruginosa No. 12	25	200	100
Neisseria meningitidis Osa	1.56	1.56	3.13
Haemophilus influenzae Shiga	1.56	1.56	1.56
Yersinia enterocolitica MY-79	1.56	6.25	1.56
Pasteurella multocida M-17	1.56	0.78	1.56
Brucella abortus Kusayanagi	200	>400	>400

ＰＡ，ＰＰＡおよびＮＡと抗生物質との間には交差耐性は見られなかったが，前三者間には交差耐性が認められた。しかしＰＰＡとＰＡまたはＮＡとの交差耐性は不完全であり，ＰＰＡはＰＡおよびＮＡ高度耐性菌にもある程度の抗菌作用を示した(Table 2)。

Table 2. Antibacterial activity of piromidic and pipemidic acids against bacteria resistant to nalidixic acid.

Organism	MIC(μg/mℓ)		
	PPA	PA	NA
E. coli			
P-84	25	>400	>400
P-174	25	>400	>400
P-184	25	>400	>400
P-233	25	>400	>400
P-244	25	>400	>400
P-307	25	>400	>400
P-447	25	>400	400
P-509	50	>400	>400
P-1196b	25	>400	400
P-1297	25	>400	400
P-1324	50	>400	>400
P-1344	12.5	>400	100
P-1350	12.5	>200	100
P-1352	12.5	>400	100
P-1369	25	>400	400
P-1589	25	>400	400
P-1599	25	>400	400
P-1767a	25	>400	200
P-2049	50	>400	>400
P-2050	12.5	>400	200
K. pneumoniae		>	
P-256	100	>400	>400
P-1280	25	>400	100
P-1299	50	>400	>400
P-1301	100	>400	>400
P-1312	50	>400	400
P-1851b	25	>400	200
P. mirabilis			
P-287	12.5	>400	>400
P-334	12.5	>400	>400
P. morganii			
P-114	25	>400	>400
P-1334	6.25	>400	100
P. rettgeri			
P-438	12.5	>400	400
P-1335	100	>400	400
P-1545	50	>400	200
P. vulgaris			
P-1108b	200	>400	>400
S. sonnei			
P-1167	25	>400	400
P-1168	25	>400	400
P-1169	25	>400	400
P-1170	25	>400	400
P-1171	25	>400	400
P-1179	100	>400	>400

2．Piromidic acidとpipemidic acidの抗菌作用機序

ＰＡおよびＰＰＡをＭＩＣ近辺の濃度で大腸菌に作用させると，生菌数は殆んど増加しないかあるいは減少するのに，濁度は増加し続けた(Fig. 2)。

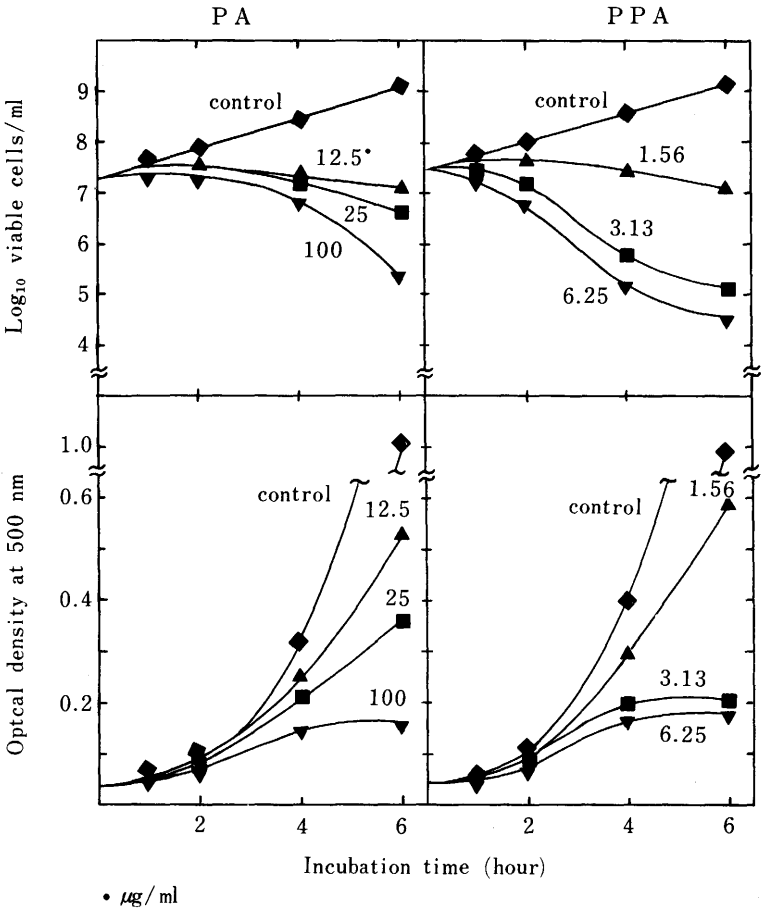

Fig. 2. Effect of piromidic and pipemidic acids on the growth of E. coli JG181-1.

経時的位相差顕微鏡観察ではＰＡおよびＰＰＡの作用により菌の細胞分裂は阻害されたが，伸長は殆んど抑制されず，結果として菌は長くフィラメント状になった(Photo 1, 2)。

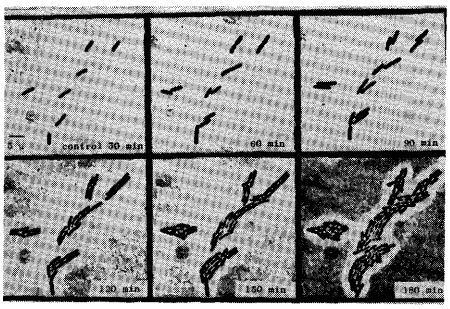

Photo 1. Phase-contrast micrographs of E. coli JG181-1 grown normally.

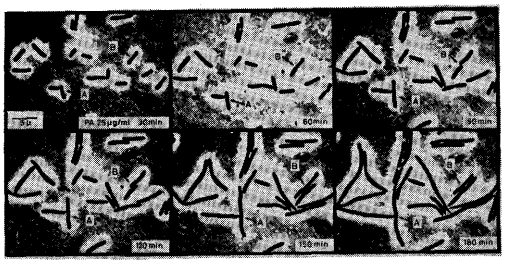

Photo 2. Phase-contrast micrographs of E. coli JG181-1 grown in the presence of 25 μg of piromidic acid per ml.

このようなフィラメント状の菌に浸透圧ショックを与えても菌は死滅しなかった。菌体高分子の化学的定量では，ＰＡおよびＰＰＡはＭＩＣ前後の濃度で，ＤＮＡ量の増加を特異的に抑制した。また ^{14}C-thymidine, ^{14}C-uridineおよび^{14}C-L-histidineのトリクロール酢酸不溶分画への取り込み実験では，ＰＡおよびＰＰＡはＭＩＣの近辺で^{14}C-thymidineの取り込みのみを阻害した(Fig. 3)。あらかじめ^{3}H-thymineでＤＮＡを標識した大腸菌にＰＡまたはＰＰＡを作用させると，１～２時間のlagの後，ＤＮＡの分解が誘導されたが，少くとも１時間以内はそのような分解は認められなかったので，^{14}C-thymidineの取り込み阻害はＤＮＡの分解促進によるのではなく合成阻害によると考えられる。

ＰＡおよびＰＰＡによるＤＮＡ合成阻害作用はpolA1変異株においても認められたことから，ＤＮＡポリメラーゼ１以外の酵素によるＤＮＡ合成がこれらの薬剤により阻害されると考えられる。またセロファン膜法によるin vitro DNA合成系においてdXTPからＤＮＡへの反応が阻害されたことから，これらの薬剤はＤＮＡの前駆体合成を阻害するのではなく，ＤＮＡポリメリゼーション過程を阻害すると考えられる。Chloramphenicol処理またはL-histidine飢餓により作製した同調ＤＮＡ合成系において，ＰＡはＤＮＡ合成の開始を阻害しなかったが，開始後の複製反応を速やかに阻害した(Fig. 4)。

またＰＡおよびＰＰＡによるＤＮＡ合成阻害作用は可逆的で，薬剤を除去するとＤＮＡ合成は速やかに回復した（Fig. 5, ＰＰＡの図は省略)。

このようなＰＡおよびＰＰＡによるＤＮＡ合成阻害作用の性質はＮＡで既に明らかにされている性

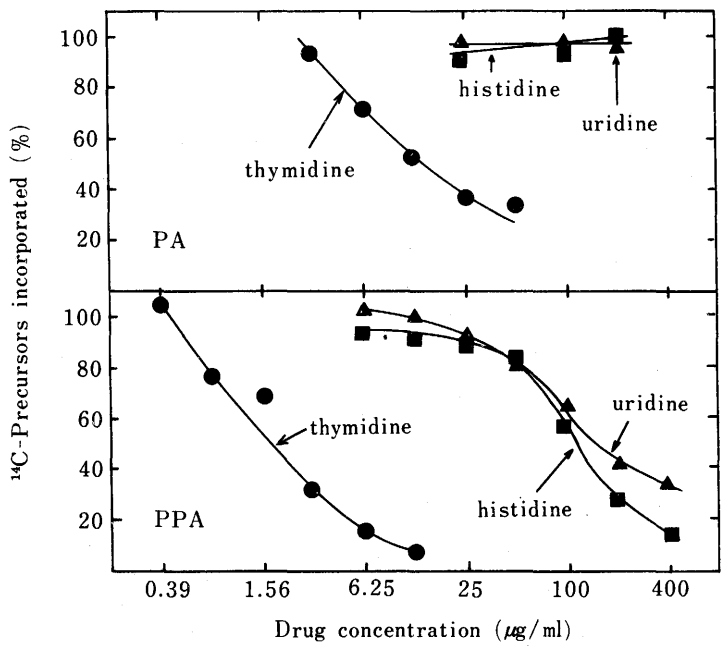

Fig. 3. Effect of piromidic and pipemidic acids on the incorporation of ^{14}C-thymidine, ^{14}C-uridine and ^{14}C-L-histidine into an acid-insoluble fraction in E. coli JG181 -1.

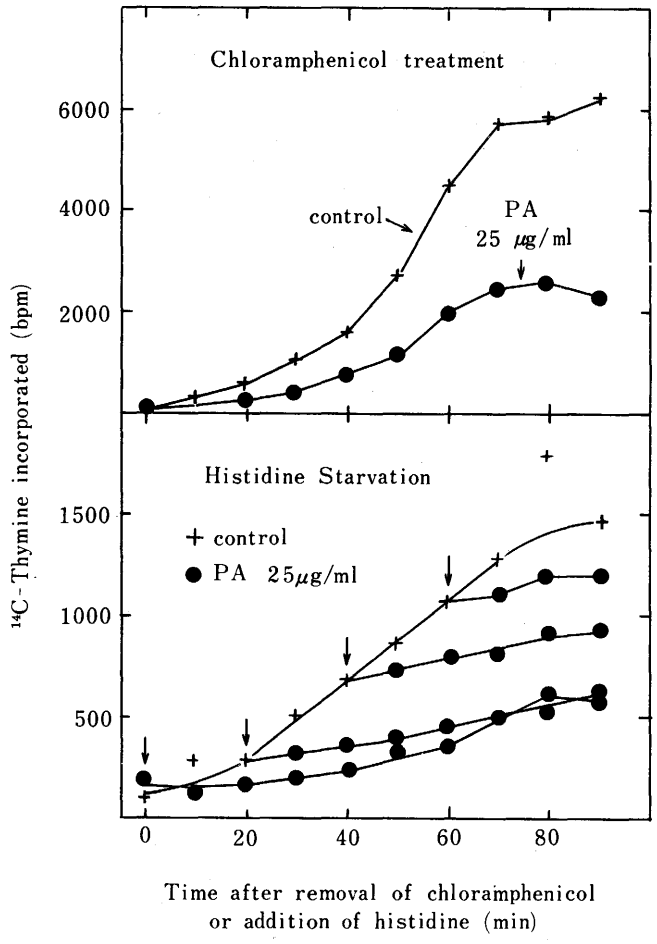

Fig. 4. Effect of piromidic acid on the initiation-aligned DNA synthesis in E. coli JG181-1.

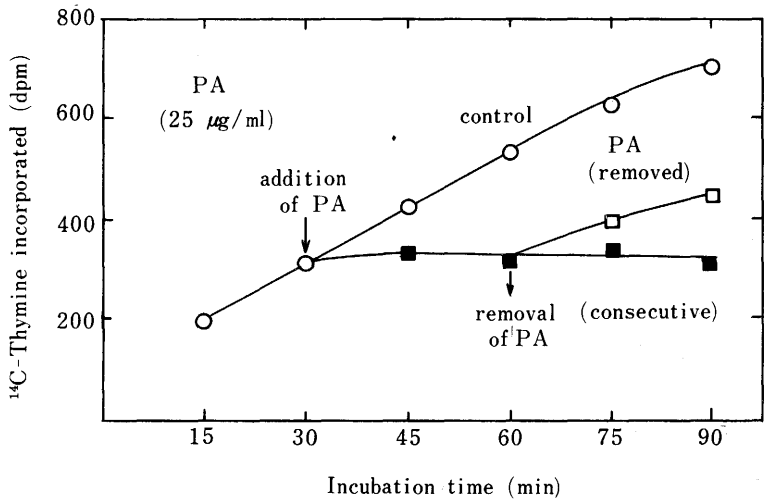

Fig. 5. Recovery from the inhibition of DNA synthesis upon removal of piromidic acid.

質[9,10]と殆んど同じである。

PAおよびPPAによるDNA合成阻害の程度を見ると，MIC近くの濃度ではDNA合成は完全には停止していない。その条件下で菌の細胞分裂はかなり長時間にわたり，ほぼ完全に阻害される。従ってこれらの薬剤による細胞分裂の阻害はDNAが合成されない為に起るのではなく，合成されるDNAが異常な為，量的に十分なDNAが合成されても細胞分裂が起らないものと思われる。PAおよびPPAを作用させた菌の核を電子顕微鏡で観察すると，細胞分裂が阻止され，フィラメント状になった菌体の中央部に異常に大きな核が通常1個認められた。また核は薬剤の作用時間が長くなるにつれ次第に大きくなる傾向を示した(Photo 3, 4)。このような結果はPAおよびPPAの作用下においても核物質の合成がある程度進行していることおよび合成された核物質は正常に分裂することができないことを示している。

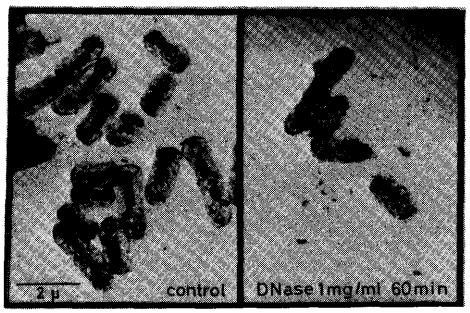

Photo 3. Electron micrographs of E. coli JG181-1 (left; normal cells, right: normal cells treated with deoxyribonuclease, whose nuclei disappear).

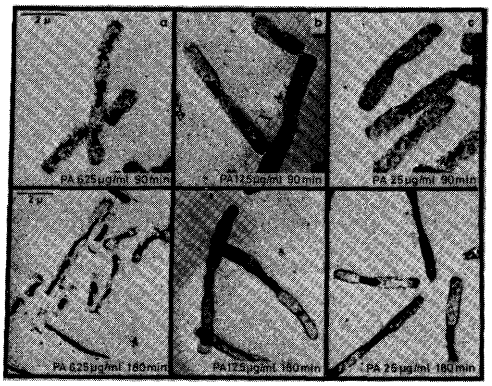

Photo 4. Electron micrographs of E. coli JG181-1 grown in the presence of piromidic acid.

以上の実験結果よりPAおよびPPAは細菌の核の複製を阻害すると共に核に異常をひき起し，その為核分裂ならびに細胞分裂を阻害すると考えられる。

3．Piromidic acid と pipemidic acid の耐性機序

PAおよびPPA耐性菌は低頻度ではあるが臨床分離株中より見出されている[5]。これら耐性菌のPPA耐性の伝達を混合培養により調べたが伝達の認められる菌株を見出すことは出来なかった。薬剤不活性化酵素の有無についても生物学的定量法ならびにラジオクロマトグラフィーで調べたが，PAまたはPPAを明らかに不活化する菌株は見出せなかった。菌体と結合する ^{14}C-PAまたは ^{14}C-PPAの量は感受性菌と耐性菌でほぼ同程度で，その大部分は洗滌により容易に除去された。しかし耐性菌ではDNA合成系のPAおよびPPAに対する感受性が低下していた(Table 3)。このようなDNA合成系の感受性低下は intact cell のみならず cell lysate の場合にも認められたので，DNA合成系自体の変化によると考えられる。PAのDNA合成阻害濃度は cell lysate に比し intact cell ではかなり高かったので，この薬剤の作用部位への移行性は不良と考えられる。従ってPA耐性はDNA合成系の感受性低下と薬剤の作用部位への移行性不良によりひき起されていると思われる。これ

に対しＰＰＡのＤＮＡ合成阻害濃度はcell lysateとintact cellでほぼ等しかったので，この薬剤の作用部位への移行性は良好と考えられる。従ってＰＰＡ耐性はＤＮＡ合成系の感受性低下によってのみ支配されていると推定される。このような作用部位への移行性の差が両剤間の抗菌力の差ならびに不完全交差耐性発現の機序と思われる。

Table 3. Comparison of the inhibition of DNA synthesis in the intact cell and lysate systems of piromidic acid-sensitive and -resistant bacteria.

Drug	Organism	MIC (μg/mℓ)	ID_{50}(μg/mℓ)		Intact cell / Lysate
			Intact cell	Lysate	
PPA	E. coli JG 181-1 PA-s	1.56	1.99	1.73	1.15
	E. coli JG 181-1 PA-r (made in vitro)	25	37.9	15.4	2.46
	E. coli P-174 PA-r (clinical isolate)	25	45.1	50.0	0.90
PA	E. coli JG 181-1 PA-s	25	13.4	0.84	16.0
	E. coli JG 181-1 PA-r (made in vitro)	>400	93.3	5.24	17.8
	E. coli P-174 PA-r (clinical isolate)	>400	>400	137	> 2.9

ID_{50} : 50% inhibitory dose of DNA synthesis

結　論

Pyridopyrimidine系合成抗菌剤ＰＡおよびＰＰＡは類縁化合物ＮＡと同様，主としてグラム陰性菌に抗菌作用を示したが，ＮＡとは異なり，ＰＡはブドウ球菌に，ＰＰＡは緑膿菌に比較民強い抗菌作用を示した。これら三剤間には交差耐性が認められたが，ＰＰＡと他の二剤間の交差耐性は不完全であった。

ＰＡおよびＰＰＡはＭＩＣ近辺の濃度において大腸菌の細胞分裂を阻害したが，伸長は阻害せず，その条件下でＤＮＡ合成のみが特異的に抑制された。阻害されるのはＤＮＡの複製過程で，その阻害は可逆的でかつ不完全であった。電子顕微鏡観察ではＰＡおよびＰＰＡは核の複製異常をひき起し核分裂を阻害した。

臨床分離のＰＡおよびＰＰＡ耐性菌の中にはＰＰＡ耐性を伝達する菌株やこれらの薬剤を不活化する菌株は認められなかった。しかし耐性菌ではＤＮＡ合成系の両剤に対する感受性が低下していた。薬剤の作用部位への移行性はＰＡでは不良で，ＰＰＡでは良好であった。

参考文献

1) S. Minami, T. Shono, and J. Matsumoto, Chem. Pharm. Bull., 19, 1426 (1971).
2) J. Matsumoto, and S. Minami, J. Med. Chem., 18, 74 (1975).
3) G. Y. Lesher, E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage, J. Med. Pharm. Chem., 5, 1063 (1962).

4) M. Shimizu, S. Nakamura, and Y. Takase, Antimicrob. Agents Chemother., 1970, 117 (1971).
5) M. Shimizu, Y. Takase, S. Nakamura, H. Katae, A. Minami, K. Nakata, S. Inoue, M. Ishiyama and Y. Kubo, Antimicrob. Agents Chemother., 8, 132 (1975).
6) W. A. Goss, W. H. Deitz, and T. M. Cook, J. Bacteriol., 88, 1112 (1964).
7) W. A. Goss, T. M. Cook, and W. H. Deitz, J. Bacteriol., 89, 1068 (1965).
8) T. M. Cook, K. G. Broun, J. V. Boyle, and W. A. Goss, J. Bacteriol., 92, 1510 (1966).
9) A. M. Pedrini, G. C. F. Pedrali-noy, and A. Falaschi, Progress in Chemotherapy, Proceeding of 8th International Congress of Chemotherapy, ed. by G. K. Daikos, Vol. 1, p. 432-435 (1974). Hellenic Society of Chemotherapy Athens, Hellas.
10) W. H. Deitz, T. M. Cook, and W. A. Goss, J. Bacteriol., 91, 768 (1966).

論文の審査結果の要旨

Pyridopyrimidine系合成抗菌剤としてグラム陰性菌に有効なpipemidic acidを合成し，その作用機序ならびに耐性機序を解明した。すなわち大腸菌の細胞分裂を阻害し，伸長は阻害せず，ＤＮＡ合成のみが特異的に抑制された。$-N-C_2H_5$及び-COOHが必要で，それらの誘導体はすべてpipemidic acidにおよばないことも認めた。

よって学位論文に価するものと信ずる。