

# Aminodeoxykanamycin の抗菌作用について

藤井敏男 池 康嘉 森 弘道・橋本 一三 橋 進  
群馬大学医学部微生物学教室

アミノ配糖体抗生物質アミノデオキシカナマイシン (AKM) は *Str. kanamyceticus* の変異株によつて産生される。アミノ配糖体抗生物質にはフラジオマイシン (FRM), パロモマイシン (PRM), ストレプトマイシン (SM) などがある。

KM は広範囲の抗菌スペクトルをもち、多剤耐性ブドウ球菌、結核菌、赤痢菌などに有効であるが、レンサ球菌、嫌気性菌、緑膿菌などには無効であることが知られている<sup>1,2</sup>。AKM は各種病原菌に対して KM の 2~4 倍の抗菌力を示すといわれている<sup>3</sup>。また、KM と SM との間にはいつぼう的交叉耐性が成立する。すなわち SM 耐性菌には KM が効くのに対し、KM 耐性菌のあるものには SM が効かない<sup>4</sup>。アミノ配糖体抗生物質の作用機序は蛋白合成阻害と考えられている<sup>5</sup>。また、腸内細菌における、多剤耐性を伝達する R 因子の KM 耐性は R<sup>+</sup> 菌がアセチル化酵素あるいはリン酸化酵素を産生するために、KM の 6-amino-6-deoxy-glucose 部分のアミノ基がアセチル化をうけ、あるいは 3-OH がリン酸化をうける結果、抗菌作用を失なうと考えられている<sup>6,7</sup>。

AKM の抗菌力を黄色ブドウ球菌およびグラム陰性桿菌 (GNB) を用い、特に KM を中心に FRM, PRM, SM と比較した結果、およびこれらの間の交叉耐性の有無について報告する。

## I. 材料および方法

使用菌株：当教室に保存されているグラム陰性桿菌 (GNB) 117 株、レンサ球菌 3 株、黄色ブドウ球菌 75 株を用いた。

使用薬剤：AKM, KM, FRM, PRM, SM。

培地：ペプトン水、Heart infusion 寒天、BHI ブロース、Drigalski 寒天を使用した。

耐性値の測定：1 夜培養液 (1 ml ペプトン水) の原液 (黄色ブドウ球菌) および 100 倍稀釈液 (GNB) から 1 白金耳ずつを接種した HI 寒天による平板希釈法で、薬剤を加えない対照平板と同等に発育をみた最大濃度を耐性値とした。レンサ球菌のみ、1 夜培養液 (BHI ブロース) の原液から 1 白金耳ずつを接種した BHI ブロースによる液体希釈法で同様に耐性値を求めた。

第 2 次宿主への耐性伝達：GNB と *E. coli* K 12 株、

ML 1410 (Nalidixic acid 耐性、メチオニン要求性) の 1 夜培養液 (BHI ブロース) を 1 ml ずつ混合し、1 夜 37°C で培養後、Nalidixic acid (NA) 50 mcg/ml, KM 12.5 mcg/ml を含む Dirgalski 平板に塗抹した。1 夜 37°C で培養後、平板上に生じた NA 耐性・KM 耐性コロニーを耐性伝達菌 (R<sup>+</sup> 菌) として分離した。

感性菌から耐性菌への変異：1 夜培養液 (10 ml ペプトン水) を 3,000 r.p.m. 10 分遠心分離し、10<sup>9</sup> cells の菌量にした。これを AKM または KM を含む HI 寒天に塗抹した。37°C で 2 日間培養後、平板上に生じたコロニーを耐性菌として数えた。平板上で変異した耐性菌の AKM または KM 耐性値をレプリカ法により調べた。

## II. 結 果

各種病原菌に対する抗菌力：当教室に標準株として保存されている各種病原菌 33 株に対する AKM および KM 耐性値を表 1 に示した。

GNB, レンサ球菌, 黄色ブドウ球菌に対する AKM および KM 耐性値は  $\leq 0.05 \sim 1.6$  mcg/ml および  $0.2 \sim 6.3$  mcg/ml であり、AKM の抗菌力は KM より約 4 倍高かった。KM 耐性大腸菌および黄色ブドウ球菌は AKM にも耐性であつた。すなわち、AKM は KM と交叉耐性を示した。

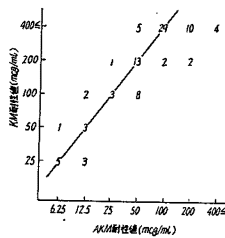
黄色ブドウ球菌に対する抗菌力：1967 年に病巣から分離された黄色ブドウ球菌における KM 耐性菌の分離頻度は 7.3% (331 株中 24 株) であつた。これらの菌株から KM 耐性菌 20 株を含む 75 株を選び、AKM および KM 耐性値の分布曲線を描き、両者の連関をみた (図 1)。

両者は感性菌と耐性菌の 2 峯性の分布を示し、感性菌の分布の頂は AKM 0.1 mcg/ml および KM 0.4 mcg/ml, 耐性菌のそれは AKM 50 mcg/ml および KM 100 mcg/ml であつた。AKM 0.1 mcg/ml および KM 0.4 mcg/ml を示す菌株は半数以上を占め、AKM の抗菌力は KM より約 4 倍高かった。KM 耐性菌 20 株はいずれも AKM 耐性であつた (図 2)。すなわち、KM は AKM と交叉耐性を示した。

1968 年中に細菌検査室に集まつた黄色ブドウ球菌の中、475 株を選び、これの KM および AKM 耐性値の



図3 AKM と KM の交叉耐性  
(GNB 研究会分離の 91 株)



の KM・AKM 耐性菌 (R 因子によるもの) 11 株とを選び、これらの KM・AKM 耐性 (R 因子) を伝達した第 2 次宿主 (大腸菌 K 12 株 ML 1410) に対する KM, AKM, FRM, PRM および SM の耐性値を調べた (表 3, 4)。

これらの耐性菌はいずれも FRM, PRM にも耐性であり、多くは SM 耐性でもあつた。これは KM-AKM-FRM-PRM の 4 剤間には交叉耐性があるが、これらと SM 耐性とは必ずしも交叉耐性のないことを示している。

5 剤間における耐性値を非伝達性および伝達性の KM, AKM 耐性 GNB (原株) において比較すると、 $KM > SM > PRM > AKM > FRM$  の順に低い。FRM の耐性値は最も低く、6.3 mcg/ml のもの (9 株) もあつたが、R 因子による FRM 耐性値は第 2 次宿主 (大腸菌 K 12 株 ML 1410) に伝達された時、12.5 および 25 mcg/ml になつた。非伝達性の KM, AKM 耐性 GNB の AKM 耐性値は KM の約 1/4 であつた。伝達性の耐性因子 R (KM, AKM) を同一宿主 (大腸菌 K 12 株 ML 1410) に伝達した時の耐性値は  $KM > PRM > AKM > FRM > SM$  の順に低い。R 因子をもつ原株における AKM 耐性値は KM の約 1/2 であつたが、これらの R を同一宿主に伝達した時、AKM 耐性値は KM の約 1/4 になつた。

KM, AKM 耐性の R をもつ *P. rettgeri* 3 株の耐性値を、これらの R を第 2 次宿主に伝達した時の耐性値と比較すると、いずれも KM 2 倍、FRM 2~4 倍、PRM 4 倍に上昇し、AKM は変わらず、SM は 1/100 感性になつた。逆に、KM, AKM 耐性の R をもつ *E. freundii* 2 株の場合には原株と第 2 次宿主における耐性値を比較すると、いずれも KM は 1/2、FRM は 1/4~1/8、PRM および AKM は 1/4、SM は 1/32 に下がつた。R 因子による耐性値は宿主を同一にするとほとんど同じであつた。

感性から耐性への突然変異菌：黄色ブドウ球菌 209P 株と大腸菌 NIHJ 株について AKM または KM 平板上

で変異した耐性菌の出現頻度をみた (表 5)。黄色ブドウ球菌 209P 株において AKM または KM 3.1 mcg/ml を含む平板上で変異した耐性菌の出現頻度はそれぞれ  $>10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  であつた。大腸菌 NIHJ 株においても AKM または KM 12.5 mcg/ml を含む平板上で変異した耐性菌の出現頻度はそれぞれ  $<10^{-9}$ ,  $10^{-9}$  であつた。すなわち AKM は KM より平板上で変異した耐性菌の出現頻度は低かつた。

AKM または KM 平板上で変異した耐性菌のおおの 3~10 コロニー計 61 株の AKM または KM 耐性値をみると、AKM または KM 平板上で変異したすべての耐性菌は AKM, KM ともに耐性であつた (図 4)。す

表 3 グラム陰性桿菌における KM 耐性株

菌種*	耐性値 (mcg/ml)				
	KM	AKM	FRM	PRM	SM
429 <i>E. freundii</i>	400	200	100	400	400
495	400	100	25	200	12.5
517	400	100	50	400	400
723	400	100	25	200	400
1021	400	100	50	200	400
1212	400	400	400	400	400
1216	400	400	400	400	400
1331	25	12.5	1.6	12.5	25
497 <i>Proteus morgani</i>	400	100	50	400	25
753	400	50	25	100	400
1007	400	50	25	200	3.1
1220	400	50	25	200	100
1226	400	100	25	200	100
499 <i>Proteus mirabilis</i>	400	50	6.3	50	400
683 <i>Proteus rettgeri</i>	100	50	12.5	50	400
1341	200	50	6.3	50	100
872 <i>Aerobacter aerogenes</i>	400	100	12.5	100	12.5
1018	400	100	50	400	6.3
1129	400	100	25	200	6.3
1304	200	50	12.5	100	0.8
1312	100	50	6.3	100	6.3
1320	200	200	50	200	0.8
582 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	50	12.5	100	12.5
1012 <i>E. coli</i>	100	25	6.3	100	0.8
1256	400	200	50	400	3.1
1328	200	50	6.3	50	0.8
1330	200	50	6.3	50	0.4

\* GNB 研究会<sup>8)</sup>分離の菌株中 KM 耐性が非伝達の株を使用した

表4 R 因子による KM 耐性菌

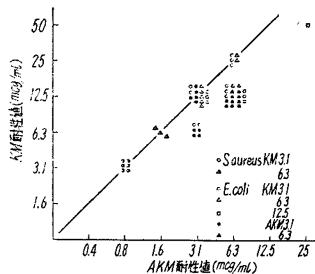
由 来	耐 性 値 (mcg/ml)										
	原 株*					第 2 次 宿 主** ( <i>E. coli</i> K-12)					
	KM	AKM	FRM	PRM	SM	KM	AKM	FRM	PRM	SM	
<i>E. freundii</i>	GN 1213	400	200	100	400	400	200	50	25	100	12.5
	GN 1375	400	200	100	400	400	200	50	12.5	100	12.5
<i>Proteus mirabilis</i>	GN 829	100	50	12.5	100	400	200	50	25	200	12.5
	GN 1133	100	50	12.5	100	400	100	25	12.5	100	25
<i>Proteus rettgeri</i>	GN 590	100	50	6.3	50	12.5	200	50	25	200	0.4
	GN 680	100	50	12.5	50	400	200	50	25	200	0.4
	GN 682	100	50	6.3	50	400	200	50	25	100	0.4
<i>Aerobacter aerogenes</i>	GN 1218	400	200	100	400	200	400	100	50	200	100
<i>E. coli</i>	GN 696	400	400	200	400	400	400	200	400	400	100
	GN 906	400	50	6.3	100	50	200	50	12.5	100	12.5
	GN 1420	400	200	100	400	3.1	200	50	12.5	100	0.4

\* KM 耐性を伝達する R 因子を持つ原株  
 \*\* 原株から R 因子を *E. coli* K 12 株に伝達した

表5 KM, AKM 耐性変異株の出現頻度

薬剤濃度 (mcg/ml)	<i>S. aureus</i> 209P		<i>E. coli</i> NIHJ	
	AKM	KM	AKM	KM
3.1	>10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>
6.3	>10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>
12.5	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>
25	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>
50	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>	>10 <sup>-9</sup>

図4 耐性変異菌の KM, AKM 交叉耐性. (表5の示した耐性変異菌 61 株)



なわち黄色ブドウ球菌 209P 株において KM は AKM と交叉耐性があつた。大腸菌 NIHJ 株においても KM は AKM と交叉耐性があつた。また、これらの耐性菌に対する AKM の抗菌力は KM より約 4 倍高かつた。

III. 考 察

病巣由来の各種細菌に対する AKM の抗菌力は KM の約 4 倍であり、AKM は KM と交叉耐性があつた。

AKM は KM の 6-Amino-6-deoxy-glucose の 2 位の OH 基が NH<sub>2</sub> 基に置換しているのみであり<sup>9,10)</sup>、これは交叉耐性が成立することを支持しうる。また両剤の化学構造の差が蛋白合成阻害の程度、R 因子による不活化酵素の基質の差として抗菌力に反映しているのであろう。

1966 年に病巣から分離された黄色ブドウ球菌の KM 耐性株の分離頻度は 4.7%<sup>11)</sup> (384 株中 18 株)、1967 年のそれは 7.3% (331 株 24 株) であり、わずかに増加していく傾向が見られた。赤痢菌において 4 剤 (CM, TC, SM, SA) 耐性の R 因子の分離頻度は 75.2%<sup>12)</sup> (4,292 株中 3,292 株) と高いのに対して KM 耐性の R が非常に稀なのは興味深い。これの本態は今後の解析に待たねばならない。

非伝達性の KM 耐性 GNB 27 株中 7 株は SM 感性であり、KM 耐性菌のあるものには SM が効かないという報告<sup>4)</sup>と一致した。KM, AKM, PRM および FRM の 4 剤間には交叉耐性があつたが、これらと SM とは必ずしも交叉耐性がなかつた。これはこれら薬剤の化学構造の類似性<sup>13)</sup>とも一致する。

R 因子による耐性値は宿主を同一にするとほとんど同じであり、これらの耐性機構が、いずれも不活化酵素によることを示唆する。伝達性の KM 耐性をもつ *P. rettgeri* 3 株および *E. freundii* 2 株とこれらの R を伝達した大腸菌 K 12 株 ML 1410 (第 2 次宿主) に対するアミノ配糖体抗生物質の耐性値の変化は同一宿主におけるこれらの耐性値がほとんど同じになることから、第 1 次宿主 (原株) に起因すると考えられる。その機作として *P. rettgeri*

の場合、宿主がRの増殖を抑える、言いかえればRの複製障害を起こさせるのか、宿主による不活性化酵素の量的または質的な抑制などが推定される。また、これらのRはKM耐性をもつがSM耐性はもたないのであろう。逆に *E. freundii* の場合、宿主自身の何らかの耐性機構(例えば薬剤透過性の低下など)があるものと思われる。Rをもつ原株とこれらのRを伝達した第2次宿主における耐性値の比は、KM, AKM, FRM および PRM がほぼ1/2~1/4に対し、SMは1/32であつた。R因子による前4剤の不活性化酵素としてリン酸化酵素<sup>7)</sup>が共通であり、SMのそれはアデニル化酵素<sup>14)</sup>である、この違いによるのかも知れない。FRM, KMは薬剤濃度を $10^{-6}$ から $10^{-4}$ Mにした時、合成RNA messengerのmisreadingの程度が3~5倍に増加するのに対し、SM, PRMは少ししか増加しなかつた。これは前2剤が複数の部位に作用するのに対し、後2剤は1つの部位のみに作用すると思われる。これは前2剤の高度耐性のone step mutantがないのに対し、後2剤のそれが存在することと一致する<sup>15)</sup>。この事実は病巣由来のRによる耐性株の耐性機構と異なる。

KM耐性GNB 38株に対する抗菌力はFRM>AKM>PRM>SM>KMの順に高かつた。化学構造からみるとSMはGlucosamine, Streptidine (Streptomine), Streptoseそれぞれ1つずつからなり、KMおよびAKMはDeoxystreptomine 1つと2つのGlucosamine, FRMおよびPRMは、Deoxystreptomine, Ribose, Neosamineそれぞれ1つずつが共通であり、FRMはPRMのGlucosamine 1つの代りにNeosamine 1つになつている<sup>13)</sup>。これらFRMまたはPRMにさらに6炭糖(Neosamine, Glucosamineなど)または5炭糖(Ribose, Streptaseなど)をつければ抗菌力も高くなるかも知れない。

KM (KM-A)の6-Amino-6-deoxy-glucose部分のアミノ基の代りにOH基あるいはphenylalkyl基のKanamycin C<sup>16)</sup>あるいは6種のtetra-N-phenylalkyl-kanamycin<sup>17)</sup> (TNP-KM)は大腸菌K 12株R 5<sup>6)</sup> (KMの前記のアミノ基をアセチル化する酵素による不活化)に抗菌作用があつたが、大腸菌K 12株ML 1629<sup>7)</sup> (KMの前記の3位のOH基をリン酸化する酵素による不活化)には無効であつた。またTNP-KMは病巣由来のKM耐性ブドウ球菌(アセチル化酵素によるのかも知れない)に有効であつた。KMの6-Amino-6-deoxy-glucoseの3位のOH基をリン酸化する酵素により不活化されるKM耐性の大腸菌K 12株ML 1629, 黄色ブドウ球菌<sup>18)</sup>および緑膿菌<sup>19)</sup>にはKMの前記のOH基を他の基(アミノ基など)に置換すれば有効と思われる。

#### IV. 結 論

アミノデオキシカナマイシン (AKM) の病巣由来の各種細菌に対する抗菌力はカナマイシン (KM) のその約4倍であり、AKMはそれらの菌においてKMと交叉耐性があつた。

#### 文 献

- 1) TAKEUCHI T., T. HIKIJI, K. NITTA, S. YAMAZAKI, S. ABE, T. TAKAGAWA & H. UMEZAWA: Biological studies on kanamycin. J. Antibiotics, Ser. A 10:107~114, 1957
- 2) GOUREVITCH A., G.A. HUNT & J. LEIN: Antibacterial activity of kanamycin. Antibiot. Chemoth. 8: 149~159, 1958
- 3) WAKAZAWA T., Y. SUGANO, M. ABE, S. FUKATSU & S. KAWAJI: Studies on kanamycin B. I. Isolation of kanamycin B and its chemical and biological properties. J. Antibiotics, Ser. A 14:180~186, 1961
- 4) MORIKUBO T.: Bacteriological studies on kanamycin. 1. Antibacterial spectrum and one way cross resistance of *E. coli* with streptomycin. J. Antibiotics, Ser. A 11:171~180, 1958
- 5) DAVIES J.E., L. GORINI & B.D. DAVIS: Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. Mol. Pharmacol. 1: 93~106, 1965
- 6) OKAMOTO S. & Y. SUZUKI: Chloramphenicol-, dihydrostreptomycin-, and kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome 'R'. Nature 208: 1301~1303, 1965
- 7) UMEZAWA H., M. OKANISHI, S. KONDO, K. HAMANA, R. UTAHARA, K. MAEDA & S. MITSUHASHI: Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. Science 157: 1559~1561, 1967
- 8) グラム陰性桿菌研究会 (班長: 石山俊次) グラム陰性桿菌の薬剤耐性の研究 (2) 1966年に分離されたグラム陰性桿菌の同定と薬剤耐性の動向について。Chemotherapy 17: 42~46, 1969
- 9) OGAWA H., T. ITO, S. KONDO & S. INOUE: Chemistry of kanamycin. V. The structure of kanamycin. J. Antibiotics, Ser. A 11: 169~170, 1958
- 10) ITO, T., M. NISHIO & H. OGAWA: The structure of kanamycin B. J. Antibiotics, Ser. A 17: 189~193, 1964
- 11) 耐性ブドウ球菌研究班 (班長: 市川篤二): ブドウ球菌の薬剤耐性 (5) 1966年度分離株の薬剤耐性とフェージ型について。Chemotherapy 16: 843~846, 1968

- 12) 薬剤耐性赤痢研究会 (会長・江崎唯人) 1966年  
分離赤痢菌の薬剤耐性。Chemotherapy 16: 48  
~49, 1968
- 13) HICHENS M. & K.L. RINEHART: Chemistry of  
the neomycins. XII. The absolute configuration  
of deoxystreptomine in the neomycins, paromomycins and kanamycins. J. Amer. Chem. Soc. 85: 1547~1548, 1963
- 14) UMEZAWA H., S. TAKASAWA, M. OKANISHI &  
R. UTAHARA: Adenylylstreptomycin, a product  
of streptomycin inactivated by *E. coli* carrying  
R factor. J. Antibiotics, Ser. A 21: 81~82, 1968
- 15) DAVIES J. & B.D. DAVIS: Misreading of ribo-  
nucleic acid code words induced by amino-  
glycoside antibiotics. The effect of drug con-  
centration. J. Biol. Chem. 234: 3312~3316,  
1968
- 16) MURASE M., T. WAKAZAWA, M. ABE & S.  
KAWAJI: Studies on kanamycin C. J. Antibiotics,  
Ser. A 14: 156~157, 1961
- 17) FUJII A., K. MAEDA & H. UMEZAWA: Synthesis  
of tetra-N-phenylalkyl-kanamycins. J. Anti-  
biotics, Ser. A 21: 458~459, 1968
- 18) DOI O., M. MIYAMOTO, N. TANAKA & H.  
UMEZAWA: Inactivation and phosphorylation of  
kanamycin by drug-resistant *Staphylococcus aureus*.  
Applied Microbiol. (in press)
- 19) UMEZAWA H., O. DOI, M. OGURA, S. KONDO  
& N. TANAKA: Phosphorylation and inactivation  
of kanamycin by *Pseudomonas aeruginosa*. J.  
Antibiotics, Ser. A 21: 154~155, 1968

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AMINODEOXYKANAMYCIN

TOSHIO FUJII, YASUYOSHI IKE, HIROMICHI MORI,  
HAJIME HASHIMOTO & SUSUMU MITSUHASHI  
Department of Microbiology, Gunma University, Maebashi, Japan

Antibacterial activity of aminodeoxykanamycin (AKM) was higher about four times than that of kanamycin (KM) against various strains of bacteria isolated from clinical sources, and AKM was cross resistant with KM in those bacterial strains tested.