

SF-837 の生体内代謝物質 (M₁, M₂) に関する細菌学的研究

河原条勝巳・吉田 隆・渡辺忠洋・宮内慶之輔・野宮文三

明治製菓株式会社中央研究所

多田 庄三・桑原 章吾

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 47 年 4 月 13 日受付)

一般にマクロライド系抗生物質は生体内で代謝されて
:化したのち、尿中および胆汁中に排泄されることが知
:れているが、体内代謝と抗菌活性との関連について
:の報告はあまりない。マクロライド系新抗生物質である
:SF-837 をラットに経口投与すると、速やかに代謝物に
:化することが観察され、血中、および尿中ではほとん
:大部分が M₁ 代謝物であり、胆汁中では M₂ 代謝物が
:成分であることが認められている¹⁾。投与経路を静脈
:1にしても、また、イヌを用いた実験においても同様の
:成績が得られており、代謝経路に関しては Fig. 1 に示
:模式図が推定され、ヒトにおいても、その血中、尿中、
:および胆汁中から M₁ および M₂ が確認される点から
:様の傾向を示すものと推察される。

SF-837 代謝物の構造は Fig. 2 に示すように、マイ
:ロースの 4" 位のプロピオン酸が外れたものが M₁ で
:ることを確認し、また、M₁ のラクトン環の 14 位に
:酸基がついたものが M₂ であると推定されている²⁾。
:このように、SF-837 は生体内において速やかに代謝
:れて M₁ 代謝物が大部分を占め、M₂ は胆汁中に僅か
:か認められないことから主として M₁ の抗菌活性につ
:いて *in vitro* ならびに *in vivo* での実験を試みたので、
:の成績を報告する。

実験材料および実験方法

(1) 使用抗生物質

抗生物質はつぎのものを使用した。SF-837 代謝物 M₁
および M₂ (以下、M₁, M₂ : 明治製菓中央研究所で単離
精製した粉末)、ならびに SF-837 (力価 953 mcg/mg の
粉末)。

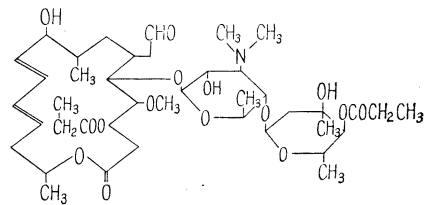
(2) 使用培地

感受性測定法では Heart infusion 寒天培地 (Difco :
以下、HI 寒天培地) および Trypticase soy 培地 (BBL)、
一部の菌株には血液または血清を 10% 添加した培地を
用いた。

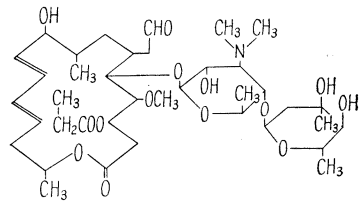
マウスの実験的感染症に対する治療実験における各臓

Fig. 2 Chemical structure of SF-837, M₁ and M₂.

SF-837



SF-837 M₁



SF-837 M₂

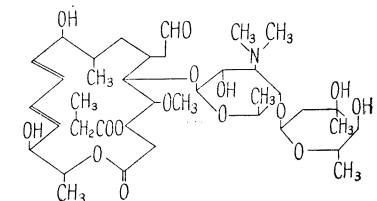
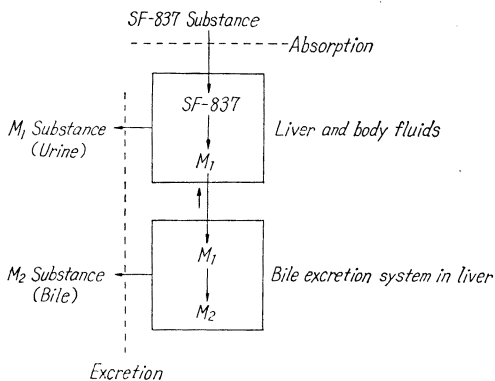


Fig. 1 Metabolic pathway of SF-837 *in vivo*



器からの還元培養において、ブドウ球菌感染症では *Staphylococcus medium* No. 110(栄研)、連鎖球菌感染症では血液加 Brain heart infusion 寒天培地 (Difco: 以下、BHI 寒天培地)、サルモネラ菌感染症では BTB 乳糖加寒天培地(栄研)を用いた。

(3) 実験方法

a) 抗菌スペクトラム

抗生物質を少量の Methanol で溶解後、HI 培地で所要濃度に調製し、常法の日本化学療法学会感受性測定法に従がい、当研究所保存の細菌群 15 種 30 菌株について、その感受性(MIC: mcg/ml) 測定を行なった。

b) 臨床分離菌株の感受性分布

臨床分離ブドウ球菌 120 株(90 株は各機関からの二重盲検試験資料、30 株は東邦大学医学部微生物学教室で分離された)、および大腸菌 31 株(二重盲検試験資料)について前記同様、その MIC を測定し、その感受性分布を調べた。

c) タンパク結合

抗生物質は 1,000 mcg/ml, 500 mcg/ml, 250 mcg/ml および 125 mcg/ml とコウシの非働化血清(56°C, 30 分間加熱)にて各所要濃度に調製し、室温に 1 時間放置後、各反応液を Visking tube (Size: 20/32) に入れ、1,000×g, 90 分遠心して得られた限外濾液中の遊離抗生物質を、検定菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いディスク法で測定した。

抗生物質の血清タンパクとの結合率は、Langmuir 型吸着式 $1/r=1/nK \cdot 1/C+1/n$ (ただし、 C は遊離低分子化合物濃度、 r はタンパク質 1 分子当たりの結合量、 K は結合の強さを示す定数、 n は飽和結合量) を適用し、求めて得られた K および n から算出した。

d) マウス実験的感染症に対する治療実験

マウスは、ICR-JCL, ♂, 18~21 g, 1 群 10 匹を使用した。感染菌は *Staphylococcus aureus* Smith S-424, *Staphylococcus aureus* No.

26(PC, SM, TC, EM 耐性), *Streptococcus pyogenes* Ti-125 Gr-A Type I, および *Salmonella enteritidis* No. 11 の 4 菌株で、各々 BHI 培地で 37°C, 18 時間培養の菌液を用いた。

Staphylococcus aureus Smith S-424 および *Staphylococcus aureus* No. 26 は上記培養菌液を同培地にて、各々 1,000 倍、5 倍に希釈し、各々に等量の 6%, 10% 滅菌 Gastric mucin 溶液を混合して接種菌液とした。*Streptococcus pyogenes* Ti-125 Gr-A Type I および *Salmonella enteritidis* No. 11 は上記培養菌液を同培地

Table 1. Antimicrobial spectrum of M₁, M₂ and SF-837.

Test organisms	MIC (mcg/ml)		
	M ₁	M ₂	SF-837
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	12.5	50	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> Terashima	25	50	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 26	3.13	12.5	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	1.56	3.13	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith S 424	3.13	12.5	1.56
<i>Staphylococcus albus</i> PCI 1200 A	25	25	3.13
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043*	6.25	25	1.56
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook*	3.13	3.13	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> D-58*	1.56	6.25	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> Ti-125 Gr-A Type I*	1.56	6.25	0.39
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Type I*	0.78	0.39	0.39
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25	25	0.39
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6.25	25	0.39
<i>Bacillus anthracis</i> No. 119	6.25	12.5	0.78
<i>Salmonella typhi</i> O-901-W	>100	>100	>100
<i>Salmonella paratyphi</i> A Minami	100	50	25
<i>Salmonella enteritidis</i> No. 11	50	50	50
<i>Sarcina lutea</i>	0.78	1.56	0.09
<i>Shigella flexneri</i> 2 a	>100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX ₁₉	>100	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 602	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1007	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> K-12 IAM 1264	>100	>100	>100
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Megurita**	>100	>100	100
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Type Gravis*	3.13	25	0.20
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Type Intermedius*	3.13	50	0.39
<i>Mycobacterium phlei</i> No. 56 ^{a)}	>100	>100	>100
<i>Lactobacillus casei</i> 8138 ^{b)}	25	6.25	0.78
<i>Lactobacillus fermenti</i> 8139 ^{b)}	1.56	0.78	0.20
<i>Lactobacillus fermenti</i> 8137 ^{b)}	1.56	0.78	0.20

* Heart infusion agar with 10% of horse blood.

** Heart infusion agar with 10% of horse blood (chocolate agar).

a) The MIC was determined after 4 days incubation at 37°C.

b) The MIC was determined after 48 hours incubation at 37°C.

Table 2. Sensitivity distribution of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Test organisms	Drug	MIC (mcg/ml)																	
		0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	600	800	1,000	>1,000
<i>Staphylococcus aureus</i> (120 strains)	M ₁						1	16	11	75				5					12
	SF-837				18	46	39							5					12
	LM					35	66	2						5					12
	JM				11	11	32	45	3	1				5					12
<i>Escherichia coli</i> (31 strains)	M ₁								1										30
	SF-837								1									1	29
	LM										1			2	2	7	6	13	
	JM									1		1		1	3	7	3	15	

にて、各々 10 倍、100 倍に希釈して接種菌液とした、各々の接種菌液は腹腔内注射により接種し、菌液接種直後、1 回所要濃度の M₁ および SF-837 を 0.2% アラビアゴム水溶液に懸濁させて、経口投与し、その生存率を観察し、さらに、LITCHFIELD-WILCOXON法により ED₅₀ を算定した。

なお、観察終了後、生存マウスについては剖検の上、臓器の還元培養を行ない治療効果の検討を行なった。

実験成績ならびに考察

a) 抗菌スペクトラム

Table 1 に示すとおり、M₁ および M₂ は SF-837 と同様にグラム陽性菌に抗菌活性を示したが、SF-837 に比し、M₁ は 1/2 ~ 1/8、M₂ は 1/4 ~ 1/64 程度抗菌活性が弱いことが認められた。しかし、M₁、M₂、および SF-837 は共に、ほとんどのグラム陰性菌に対して見るべき抗菌活性を示さなかつた。

b) 臨床分離菌株の感受性分布

臨床分離ブドウ球菌および大腸菌に対する M₁、SF-837、Kitasamycin (Leucomycin, 以下、LM)、および Josamycin (以下、JM) の MIC 分布は Table 2 に示すとおりで、ブドウ球菌に対して、M₁ は 3.13 ~ 12.5 mcg/ml の濃度範囲でその大部分の発育を阻止したのに対し、SF-837、LM、および JM は 0.78 ~ 3.13 mcg/ml を示し、前述した当研究所保存標準株の示す MIC とはほぼ同様の傾向が認められ、M₁ は SF-837、LM および JM に比してやや弱い感受性分布を示したが、120 株中 17 株に対し各抗生物質は 100 mcg/ml 以上の

MIC を示し、交差耐性が認められた。また、大腸菌に対して各抗生物質はほとんどすべての株に 100 mcg/ml 以下では抗菌活性を示さなかつた。

Fig. 3 Activities of M1 and SF-837 against experimental systemic infection of *Staphylococcus aureus* Smith S 424 in mice.

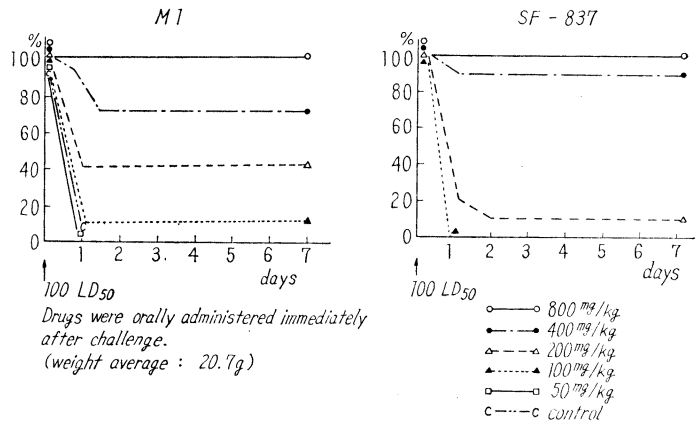


Fig. 4 Activities of M1 and SF-837 against experimental systemic infection of *Staphylococcus aureus* No. 26 in mice.

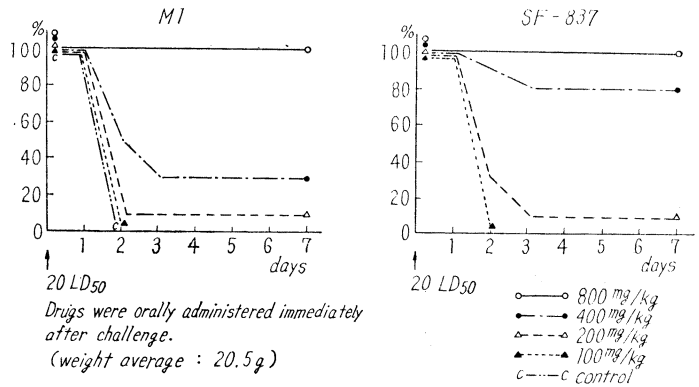


Table 3. Extent of binding of M₁ and SF-837 to serum-protein of calf.

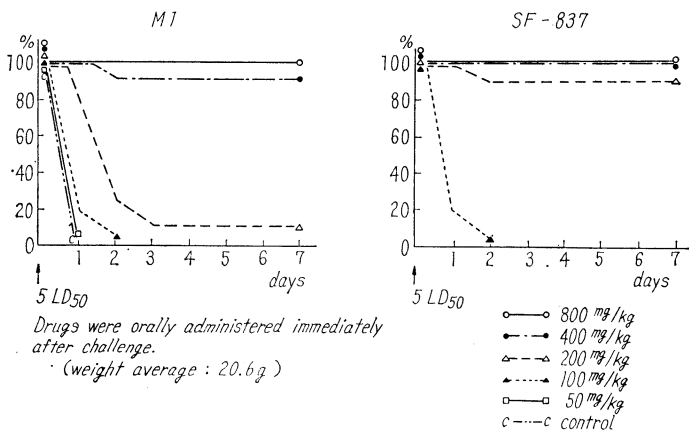
Concentration (mcg/ml)	Drug	M ₁	SF-837
100		14.1%	28.6%
200		12.8	25.5
400		10.9	20.9
600		9.5	17.7
800		8.4	15.4
1,000		7.5	13.6

c) タンパク結合

SF-837 はラット生体内代謝により M₁, M₂ に変化する事、また、試験管内において血清、とくにラットの新鮮血清により SF-837 から M₁ へ容易に変化し、抗菌活性に影響があることはすでに知られている。このため本実験ではコウシ、ウマおよびウサギの各非働化血清が M₁、および SF-837 の抗菌活性に影響をおよぼさないことを前もって知り、M₁ および SF-837 のコウシ血清タンパクとの結合試験を行なつたところ、Table 3 に示すとおり、血清 1 ml 当りの抗生物質 100~1,000 mcg/ml の濃度範囲で、M₁ の結合率は 14.1~7.5%、SF-837 は 28.4~13.6% で、M₁ は SF-837 に比して 1/2 程度結合率が低い傾向を示した。

d) マウス実験の感染症における治療効果

(1) *Staphylococcus aureus* Smith S-424 に対する M₁ および SF-837 の治療効果を生存率でみると、Fig. 3 に示すとおりで、両試料の ED₅₀ は、M₁ が 270 mg/kg、SF-837 が 230 mg/kg であり、5% の危険率において有意差が認められず、M₁ および SF-837 はともに

Fig. 5 Activities of M₁ and SF-837 against experimental systemic infection of *Streptococcus pyogenes* Ti-125 Gr A Type I in mice.Table 4. *In vivo* activities of M₁ and SF-837 against experimental infections in mice. (ED₅₀ mg/kg)

Challenge strain	M ₁	SF-837
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith S-424	270	230
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 26 (PC, SM, TC, EM-R)	390	240
<i>Streptococcus pyogenes</i> Ti-125 Gr-A Type I	260	145
<i>Salmonella enteritidis</i> No. 11	>1,400	1,060

同等の治療効果として認められた。臓器還元培養では、M₁ および SF-837 の各所要濃度投与群における生存マウスには接種菌の消失が認められた。

(2) *Staphylococcus aureus* No. 26 に対する M₁ および SF-837 の治療効果を生存率でみると、Fig. 4 に示すとおりで、両試料の ED₅₀ は、M₁ が 390 mg/kg、SF-837 が 240 mg/kg であり、5% の危険率において有意差が認められず、M₁ および SF-837 はともに同等の治療効果を認めた。臓器還元培養では、M₁ および SF-837 の 400 mg/kg 投与群において 1~2 例の生存マウスの肝臓、脾臓、および腎臓に接種菌が認められたが、他の各所要濃度投与群における生存マウスには接種菌の陰性化が認められた。

(3) *Streptococcus pyogenes* Ti-125 Gr-A Type I に対する治療効果を生存率でみると、Fig. 5 に示すとおりで、M₁ の ED₅₀ は 260 mg/kg、SF-837 の ED₅₀ は 145 mg/kg と両試料間には 5% の危険率において有意差が認められ、M₁ は SF-837 より劣る治療効果として認められた。臓器還元培養では、*Staphylococcus aureus* Smith S-424 の場合と同様、生存マウスには接種菌の消失が認められた。

(4) *Salmonella enteritidis* No. 11 に対して、M₁ は 1,400 mg/kg 投与群においてのみ 40% の生存率が認められたが、SF-837 では 1,400 mg/kg 投与群において 80%、700 mg/kg 投与群において 20% の生存率が認められ、その ED₅₀ は 1,060 mg/kg であつた。なお、生存マウスは皮毛に光沢なく、運動不活発であり、剖検所見では腹腔内に毛状凝塊物の形成、および脾臓の肥大が認められ、さらに、肝臓、脾臓、および腎臓からは純培養的に接種菌が検出され、本症に対して M₁ および SF-837 には共に著明な治療効果が認められなかつた。

M₁ および SF-837 の治療効果を要約す

ると、Table 4 に示すとおりである。このように、*Staphylococcus aureus* および *Streptococcus pyogenes* に対して M_1 は *in vitro* において、SF-837 の $1/2 \sim 1/8$ の抗菌力を示す程度にもかかわらず、*in vivo* での ED_{50} 値には MIC 値ほどの差が認められなかつた。この結果は SF-837 が生体内に吸収されると M_1, M_2 に代謝され、とくに、生体内では M_1 が主体である事実、また、 M_1 は SF-837 に比してタンパク結合が低いことから理解され、*in vitro* での MIC の差がそのまま *in vivo* で出なかつたものと推察される。

総 括

明治製菓中央研究所において分離されたマクロライド系の新しい抗生物質、SF-837 の代謝物 (M_1, M_2) の *in vitro* および *in vivo* での抗菌活性について検討を行ない、次のような成績を得た。

- 1) M_1 および M_2 はグラム陽性菌に対して抗菌活性を示したが、SF-837 に比して M_1 は $1/2 \sim 1/8$, M_2 は $1/4 \sim 1/64$ 程度抗菌活性が弱いことを認めた。
- 2) 臨床分離菌株であるブドウ球菌に対する M_1 の抗菌活性は SF-837, LM および JM に比して若干弱いと認められた。

臨床分離菌株である大腸菌に対して、 M_1 , SF-837, LM および JM は共に抗菌活性を示さなかつた。

3) コウシ血清 1 ml 当たりの抗生物質 100~1,000 mcg/ml の濃度範囲で、 M_1 のタンパク結合率は 14.1~7.5%, SF-837 は 28.4~13.6% で、 M_1 は SF-837 に比して $1/2$ 程度結合率が低い傾向を認めた。

4) マウス腹腔内感染症に対する M_1 の経口投与による治療効果は、*Staphylococcus aureus* に対して SF-837 とほぼ同等であり、*Streptococcus pyogenes* に対しては SF-837 より劣つていた。*Salmonella enteritidis* に対して M_1 および SF-837 は共に著明な治療効果が認められなかつた。

文 献

- 1) 庄村知子, 梅村甲子郎: 新マクロライド系抗生物質 SF-837 の吸収, 代謝, 排泄に関する研究, 第 1 報, 代謝物の同定について。薬学雑誌 投稿中。
- 2) 井上重治, 庄村知子, 鶴岡崇士, 尾本捷二, 仁井田太郎, 梅村甲子郎: Isolation and structure of two metabolites of a macrolide antibiotic, SF-837 substance. Chem. Pharm. Bull. 投稿中。

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON TWO METABOLITES (M_1, M_2) OF SF-837

KATUMI KAWAHARA, TAKASHI YOSHIDA, TADAHIRO WATANABE,

KEINOSUKE MIYAUCHI and BUNZO NOMIYA

Research Laboratories, Meiji Seika Kaisha Ltd., Yokohama

SHOZO TADA and SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo

The antimicrobial activity of M_1 and M_2 , two metabolites of SF-837, are studied *in vitro* and *in vivo*. The results obtained are as follows:

- 1) M_1 and M_2 showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, but it was somewhat inferior to that of SF-837.
- 2) M_1 was active against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, but it was less active as compared with those of SF-837, kitasamycin and josamycin. M_1 and SF-837 were inactive against clinical isolates of *Escherichia coli*.
- 3) Rate of binding to serum protein of M_1 and SF-837, at the concentrations of 100~1,000 mcg potency per 1 ml of calf serum was 14.1~7.5% and 28.4~13.6% respectively, apparently smaller in M_1 .
- 4) In experimental mice infections with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* no significant differences were noted in ED_{50} as compared with the differences in *in vitro* activities. Against infections with *Salmonella enteritidis* both M_1 and SF-837 were confirmed to be inactive.