

新しいマクロライド系抗生物質 propionylmaridomycin に関する細菌学的研究

中沢昭三・小野尚子・大槻雅子
西野武志・中尾雅文・野村 知
京都薬科大学微生物学教室

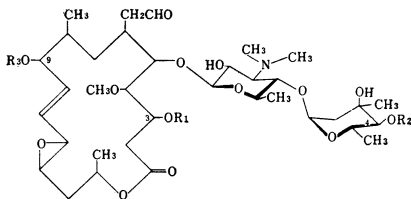
横川 節子

武田薬品工業株式会社醸酵生産物研究所

はじめに

Propionylmaridomycin (PMDM) は1970年武田薬品工業株式会社中央研究所において開発された新しいマクロライド系抗生物質である。この物質は6つの component より成り、その物理化学的性状は次のとおりである。

化学構造 Propionylmaridomycin (PMDM)
および component



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Pr |
|--------|----------------|----------------|----------------|---|
| PMDM I | Pr | i-Val | Pr | Pr : COCH ₂ CH ₃ |
| II | Ac | i-Val | Pr | Ac : COCH ₃ |
| III | Pr | Pr | Pr | i-Val : COCH ₂ CH(CH ₃) ₂ |
| IV | Ac | Pr | Pr | |
| V | Pr | Ac | Pr | |
| VI | Ac | Ac | Pr | |

化学名

5-[4'-O-(4''-O-Acyl-2'',6''-dideoxy-3''-C-methyl- α -L-ribohexopyranosyl)-3',6'-dideoxy-3'-dimethylamino- β -D-glucopyranosyl]-3-acyloxy-12,13-epoxy-6-formylmethyl-4-methoxy-8-methyl-9-propionyloxy-10-hexadecen-15-olide.

分子式 (component III) : C₄₄H₇₁NO₁₇

分子量 (component III) : 886.05

Component 6種のうちで main component である IIIは70%以上を占め、これと I, II, IVを加えると約95%となり、V, VIは合わせて5%以下である。

本物質は白色粉末でエタノール, メタノール, エーテル, クロロホルムなどに易溶, 水に難溶である。本剤のマウスを用いた急性毒性 LD₅₀ は p. o. >10,000 mg/kg, i. p. 5,000 mg/kg といわれている。

今回、私どもはこの propionylmaridomycin およびその代謝物について既知マクロライド系抗生物質である erythromycin (EM), oleandomycin (OL), leucomycin (LM), josamycin (JM), spiramycin (SPM)を対照薬剤として同一条件にて細菌学的評価を行なった結果、この新しい国産のマクロライド系抗生物質は LM, JMのグループとほぼ同程度の試験管内抗菌力ならびにマウス生体内抗菌力を有し、またこれら抗生物質や SPM などと同様にブドウ球菌に対し耐性非誘導型に属することが認められた。また今回の研究に当つて私どもが最も興味を持つた点は既知のマクロライド系抗生物質では検討ができなかつた component や metabolite が入手でき、これらの *in vitro*, *in vivo* の抗菌活性までチェックできたことであり、本剤の吸収, 体内分布, 排泄面におけるこれらの体内動態, 代謝研究とあいまつてマクロライド系抗生物質による化学療法への進歩に貢献するものと思う。

実験方法および実験成績

Propionylmaridomycin の抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性球菌・桿菌, グラム陰性球菌・桿菌に対する試験管内抗菌力, MIC(mcg/ml)を日本化学療法学会感受性測定法により求めた。なお、レンサ球菌群, 肺炎球菌, シフテリア菌の測定には10%馬血液加 Heart infusion 寒天培地を用いて 37°C, 20時間培養後の MIC を, 淋菌, 髄膜炎菌には G.C. 培地, 嫌気性菌群の破傷風菌, ガス壊疽菌にはチオグリコール酸塩培地を用いて 37°C, 48時間培養後の MIC を求めた。その成績は Table 1 a), b) に示されるように PMDM は既知マクロライド系抗生物質と同様グラム陽性球菌・桿菌, グラム陰性球菌に対して有効であるが, その抗菌力は例えばマクロライド感受性ブドウ球菌にみられるように PMDM, LM, JM は 0.39~1.56 mcg/ml, EM は 0.19~0.39 mcg/ml, SPM は 1.56~8.25 mcg/ml に感

Table 1 Antibacterial spectrum

a) Gram-positive bacteria

| Test organisms | PMDM | LM | JM | SPM | EM |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>Staph. aureus</i> 209-P-JC | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.19 |
| " Neumann | 3.12 | 1.56 | 1.56 | 6.25 | 0.19 |
| " Smith | 0.78 | 0.78 | 0.78 | 1.56 | 0.19 |
| " Terajima | 1.56 | 0.78 | 1.56 | 6.25 | 0.39 |
| " E-46 | 1.56 | 0.78 | 0.78 | 1.56 | 0.19 |
| " No. 50774 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 3.12 | 0.19 |
| " No. 80(Mac-R) | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| <i>Staph. epidermidis</i> | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 6.25 | 0.19 |
| <i>Staph. citreus</i> | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 0.39 | 0.05 |
| <i>Sarcina lutea</i> PCI-1001 | 0.1 | 0.1 | 0.05 | 0.05 | 0.01 |
| <i>Diplo. pneumoniae</i> I | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.05 | 0.01 |
| " II | 0.39 | 0.19 | 0.19 | 0.39 | 0.05 |
| " III | 0.19 | 0.19 | 0.1 | 0.1 | 0.01 |
| <i>Strept. pyogenes</i> S 23 | 0.39 | 0.78 | 0.19 | 0.39 | 0.05 |
| " Cook | 0.19 | 0.39 | 0.19 | 0.1 | 0.02 |
| <i>Strept. faecalis</i> | 3.12 | 1.56 | 1.56 | 0.78 | 0.05 |
| <i>Strept. viridans</i> | 3.12 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.05 |
| <i>B. subtilis</i> PCI-219 | 0.19 | 0.39 | 0.19 | 0.19 | 0.05 |
| <i>B. anthracis</i> | 0.39 | 1.56 | 0.39 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Cory. diphtheriae</i> | 0.19 | 0.05 | 0.1 | 0.1 | 0.01 |
| <i>Clostr. tetani</i> | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 12.5 | 0.39 |
| <i>Clostr. perfringens</i> | 12.5 | 6.25 | 6.25 | 25 | 3.12 |

MIC (mcg/ml)

Table 1 Antibacterial spectrum

b) Gram-negative bacteria

| Test organisms | PMDM | LM | JM | SPM | EM |
|-------------------------------|------|------|-------|------|------|
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 3.12 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 0.1 |
| " meningitidis | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 12.5 | 1.56 |
| <i>Escherichia coli</i> NIH | >100 | >100 | 0 >10 | >100 | >100 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | 100 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Salmonella typhi</i> T-287 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Shigella boydii</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Shigella sonnei</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

MIC (mcg/ml)

受性を示し、PMDM は LM, JM の抗菌力とほぼ同程度であり EM の感受性が最も良好であった。

Propionylmaridomycin の components および代謝物の抗菌スペクトラム

PMDM の 6 種の component のうち VI を除く 5 種ならびに PMDM 投与後の生体内代謝物 3 種についての抗菌スペクトラムを調べた。

なお代謝物は main の component III からの代謝物であつてそれぞれ R₂ または 9 位の COCH₂CH₃ が OH に変つた 4''-deacyl-propionylmaridomycin (PMDM-M), maridomycin (MDM) および R₂, 9 位 2 カ所とも変つた 4''-deacyl-maridomycin (MDM-M) である。

その成績は Table 2 a), b) に示すとおりで component の V を除いて I, II, III, IV はほとんど抗菌力に差異はなく、また metabolite である MDM, PMDM-M, MDM-M はいずれも抗菌活性が認められた。

臨床分離ブドウ球菌に対する感受性分布

臨床分離ブドウ球菌 100 株に対する感受性分布を He-

art infusion 寒天培地を用いて日本化学療法学会感受性測定法に準じ、37°C, 20 時間培養により求めた。その成績は (Fig. 1 a) に示されるように各薬剤とも感受性株と耐性株という大きく 2 つの山に分けられた。感受性株についてみると EM は最も良い感受性を示し、0.1 mcg/ml に、JM は 0.78 mcg/ml, SPM は 3.12 mcg/ml に鋭い 1 峰性の山を示し、PMDM は LM, OL とその peak の値は等しく、1.56 mcg/ml に山を示し PMDM では約 60% の株が存在していた。マクロライド ≥ 100 mcg/ml 耐性株については EM では約 30%, LM JM, SPM, OL, PMDM では約 25% の存在がみられた。

次に PMDM とその代謝物 MDM, PMDM-M を用いて同様に 100 株の臨床分離ブドウ球菌の感受性分布を調べた結果、Fig. 1. b) に示すような成績が得られた。

臨床分離ブドウ球菌における交差耐性

先のマクロライド系抗生物質の感受性を求めたブドウ球菌 100 株のうち、EM に ≥ 100 mcg/ml の耐性を示す菌株 30 株について EM 以外の他のマクロライド系抗生物質間の交差耐性をみた。その結果は Table 3 に示さ

Metabolites of propionylmaridomycin

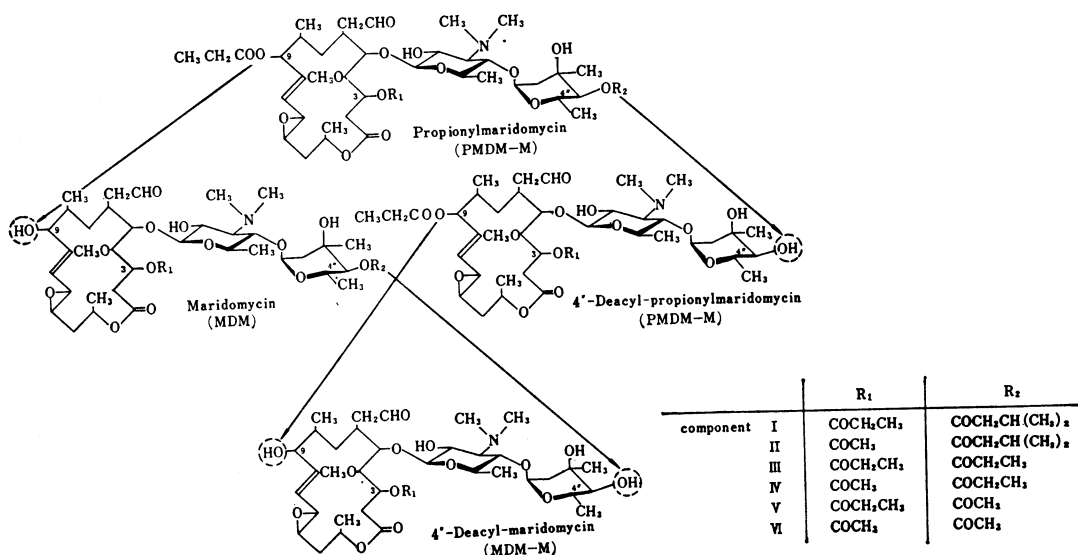


Table 2 Antibacterial spectrum

a) Gram-positive bacteria

| Test organisms | PMDM | Components | | | | | Metabolites | | |
|---------------------------------|------|------------|---------|----------|---------|--------|-------------|--------|-------|
| | | PMDM I | PMDM II | PMDM III | PMDM IV | PMDM V | MDM | PMDM-M | MDM-M |
| <i>Staph. aureus</i> 209-P-JC | 0.39 | 0.78 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 6.25 | 0.39 | 3.12 | 3.12 |
| " Smith | 0.78 | 1.56 | 0.78 | 0.78 | 0.39 | 3.12 | 0.39 | 1.56 | 3.12 |
| " Terajima | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 12.5 | 1.56 | 3.12 | 6.25 |
| " Neumann | 1.56 | 3.12 | 3.12 | 1.56 | 1.56 | 12.5 | 1.56 | 6.25 | 6.25 |
| " E-46 | 0.78 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.78 | 12.5 | 0.78 | 3.12 | 6.25 |
| " No. 50774 | 1.56 | 3.12 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 12.5 | 1.56 | 6.25 | 6.25 |
| " No. 80 (Mac-R) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Staph. epidermidis</i> | 1.56 | 3.12 | 1.56 | 3.12 | 3.12 | 25 | 1.56 | 6.25 | 6.25 |
| <i>Strept. pyogenes</i> S-23 | 0.39 | 1.56 | 0.39 | 0.19 | 0.39 | 3.12 | 0.19 | 0.39 | 0.78 |
| <i>Strept. pyogenes</i> Cook | 0.19 | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 0.39 | 1.56 | 0.09 | 0.39 | 0.39 |
| <i>Strept. faecalis</i> | 3.12 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 3.12 | 6.25 | 1.56 | 1.56 | 3.12 |
| <i>Strept. viridans</i> | 3.12 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 3.12 | 6.25 | 1.56 | 1.56 | 3.12 |
| <i>Diplo. pneumoniae</i> type I | 0.19 | 0.78 | 0.39 | 0.19 | 0.19 | 0.78 | 0.09 | 0.19 | 0.78 |
| " type II | 0.39 | 0.78 | 0.78 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.19 | 0.39 | 0.78 |
| " type III | 0.39 | 0.78 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.19 | 0.78 | 0.78 |
| <i>Sarcina lutea</i> PCI-1001 | 0.09 | 0.19 | 0.19 | 0.09 | 0.09 | 0.39 | 0.09 | 0.19 | 0.09 |
| <i>B. subtilis</i> PCI-219 | 0.78 | 1.56 | 0.78 | 0.78 | 0.78 | 6.25 | 0.78 | 3.12 | 3.12 |
| <i>B. anthracis</i> | 0.39 | 0.78 | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 3.12 | 0.19 | 1.56 | 3.12 |
| <i>Cory. diphtheriae</i> | 0.19 | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 0.19 | 1.56 | 0.09 | 0.78 | 0.78 |
| <i>Cl. tetani</i> | 3.12 | 1.56 | 3.12 | 6.25 | 6.25 | 12.5 | 3.12 | 12.5 | 25 |
| <i>Cl. perfringens</i> | 25 | 12.5 | 25 | 25 | 50 | 100 | 25 | 100 | 100 |

MIC (mcg/ml)

Table 2 Antibacterial spectrum

b) Gram-negative bacteria

| Test organisms | PMDM | Components | | | | | Metabolites | | |
|---------------------------|------|------------|---------|----------|---------|--------|-------------|--------|-------|
| | | PMDM I | PMDM II | PMDM III | PMDM IV | PMDM V | MDM | PMDM-M | MDM-M |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | 3.12 | 3.12 | 1.56 | 3.12 | 3.12 | 12.5 | 0.78 | 12.5 | 12.5 |
| <i>N. meningitidis</i> | 3.12 | 6.25 | 3.12 | 3.12 | 3.12 | 12.5 | 0.78 | 6.25 | 12.5 |
| <i>E. coli</i> NIH | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Entero. aerogenes</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Sal. typhi</i> T-287 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Sal. enteritidis</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Sh. dysenteriae</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Sh. flexneri</i> 2a | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Sh. boydii</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Sh. sonnei</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>P. vulgaris</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Pseudo. aeruginosa</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

MIC (mcg/ml)

Fig. 1 a) Sensitivity distribution of clinical isolates *Staph. aureus* (100 strains)

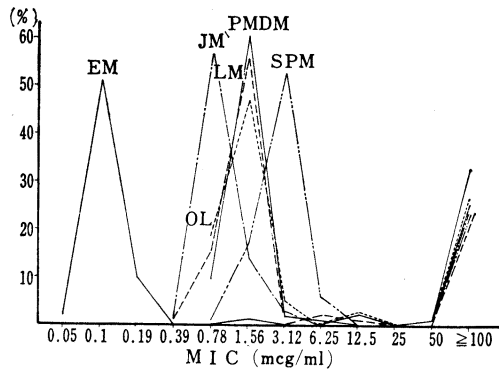
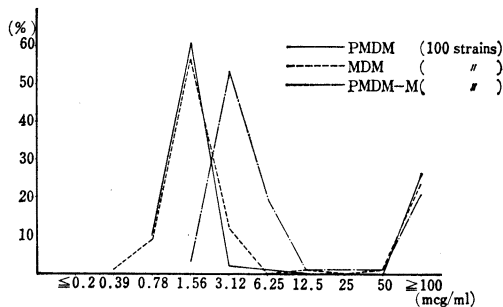


Fig. 1 b) Sensitivity distribution of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*



れるように EM への耐性を示す株 4 株, EM, OL 2 剤に耐性を示す株 2 株が認められたが他の 24 株は EM, OL, SPM, JM, LM, PMDM に ≥ 100 mcg/ml の耐性を示した。

Table 3 Cross resistance

| | |
|---------------------------|-----------|
| EM | 4 strains |
| EM, OL | 2 |
| EM, OL, SPM, JM, LM, PMDM | 24 |

30 strains

抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, 人血清添加, 接種菌量の影響を *Staph. aureus* 209-P-JC 株を試験菌として Heart infusion ブイオン培地を用いた液体希釈法により 37°C, 20 時間培養後の最小発育阻止濃度を求めた。その成績は Table 4 に示すように PMDM は他のマクロライド系抗生物質と同様, 培地 pH がアルカリ側では段階的に抗

Table 4 Influence of various factors on activity of propionylmaridomycin Heart infusion broth

| Factors | | <i>Staph. aureus</i> 209-PJC | | | | |
|-------------------------|-----------------|------------------------------|------|------|------|-------|
| | | PMDM | LM | JM | SPM | EM |
| pH | 9 | 0.19 | 0.19 | 0.09 | 0.09 | 0.006 |
| | 8 | 0.19 | 0.19 | 0.09 | 0.19 | 0.012 |
| | 7 | 0.78 | 0.39 | 0.39 | 3.12 | 0.39 |
| | 6 | 3.12 | 1.56 | 1.56 | 50 | 0.78 |
| | 5 | 6.25 | 6.25 | 3.12 | >50 | 3.12 |
| Human serum (%) | 0 | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 1.56 | 0.09 |
| | 10 | 0.39 | 0.39 | 0.19 | 1.56 | 0.09 |
| | 25 | 0.39 | 0.78 | 0.19 | 3.12 | 0.09 |
| | 50 | 0.78 | 0.78 | 0.39 | 6.25 | 0.09 |
| Inoculum size (cell/ml) | 1×10^7 | 0.78 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.19 |
| | 1×10^6 | 0.39 | 0.19 | 0.19 | 0.78 | 0.09 |
| | 1×10^5 | 0.39 | 0.19 | 0.19 | 0.39 | 0.05 |
| | 1×10^4 | 0.19 | 0.19 | 0.19 | 0.39 | 0.05 |

Each value shows the MICs against the test organism

菌力の増強が認められた。人血清添加による影響は EM では全くみられず, LM, JM, PMDM においては, 人血清を 50% 培地に加えることにより抗菌力が 1/2 に低下した。接種菌量による影響は 10^4 個/ml ~ 10^7 個/ml の菌量の増加により JM, LM では 1/2, EM, SPM, PMDM では 1/4 に抗菌力の低下がみられた。

細菌の増殖曲線に及ぼす影響

Staphylococcus aureus No. 50774 株を Brain heart infusion ブイオン培地に約 10^4 個/ml 接種し, 37°C, 3 時間培養を行ない約 10^6 個/ml になったとき, EM, JM, OL, PMDM を MIC を中心として MIC の 2 倍, 4 倍, 1/2 および 1/4 量添加した。以後 2, 4, 6, 8 および 24 時間後の生菌数を求めた。その成績は Fig. 2~5 に示されている。すなわち, EM においては 4 MIC で著明な生菌数の減少を示し, 2 MIC, MIC, 1/2 MIC および 1/4 MIC では対照と同様横バイあるいは薬剤濃度に応じた菌数の減少がみられた。JM においては 6~8 時間にかけて MIC 以上の濃度で生菌数の減少が認められ, 4 MIC においては 24 時間まで完全な生菌数の抑制作用がみられた。LM においては, MIC 濃度における生菌数は JM とほぼ同程度であるが, 2 MIC, 4 MIC において著明な生菌数の減少が認められた。PMDM においては 4 MIC で 24 時間まで著明な生菌数の減少が認められたが 2 MIC では 8 時間まで減少していた菌数が, 24 時間にかけて再

び増殖するのがみられた。MIC 以下の濃度においては対照と較べ8時間まで薬剤濃度に応じた生菌数の抑制作用がみられたが24時間後では対照と同程度の生菌数の増加がみられた。

Fig. 2 Bactericidal effect of erythromycin
Strain : *Staph. aureus* No. 50774
MIC : 0.4 mcg/ml

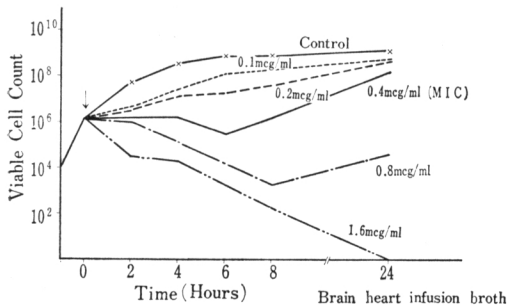


Fig. 3 Bactericidal effect of josamycin
Strain : *Staph. aureus* No. 50774
MIC : 3.0 mcg/ml

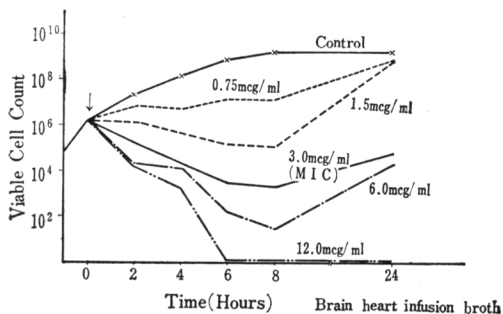


Fig. 4 Bactericidal effect of leucomycin
Strain : *Staph. aureus* No. 50774
MIC : 3.0 mcg/ml

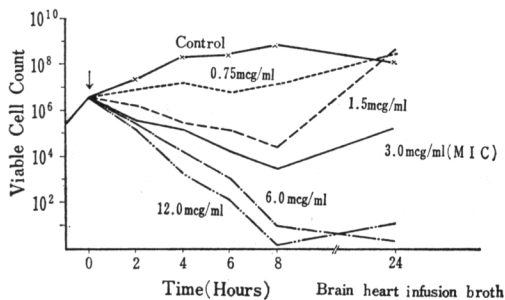
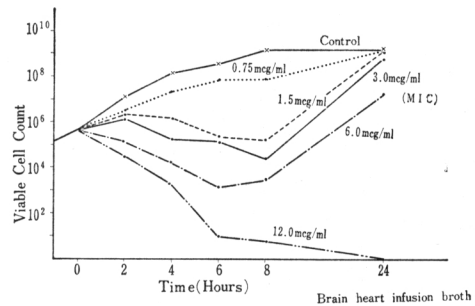


Fig. 5 Bactericidal effect of propionylmaridomycin
Strain : *Staph. aureus* No. 50774
MIC : 3.0 mcg/ml



電子顕微鏡応用による抗菌像

Heart infusion broth に *Staph. aureus* 209-P を培養し、培養後4時間目の対数期途上に薬剤を作用させ、経時的に試料をとりだした。2.5% グルタルアルデヒドで前固定し、1% OsO₄ で固定後、酢酸ウラニルで処理し、アルコール系列で脱水をおこない、走査型電子顕微鏡試料作製の場合はその後、5%塩化第2鉄で処理、カーボン、金を蒸着後、JSM-u 3型走査電子顕微鏡を用いて観察をおこなった。いつばう、超薄切片による電子顕微鏡試料作製の場合は脱水後、LUFT らの方法によりエポキシ樹脂に包埋し、LKB ultramicrotome 4801 A を用いて切片を作製、酢酸ウラニル、クエン酸鉛で2重染色をおこなった後、電子顕微鏡 Akashi S-500 を用いて観察した。

その結果、走査電子顕微鏡による観察はPhoto. 1, 2に示すとおりで、ブドウ球菌 *Staph. aureus* 209-P の control ならびに propionylmaridomycin 6.25 mcg/ml 作用時の抗菌像を立体的にとらえている。

Photo. 1 Normal *Staphylococcus aureus* 209-P cells
(Scanning electron-microscope × 19,000)

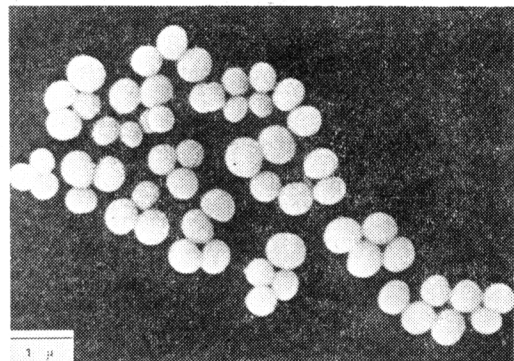
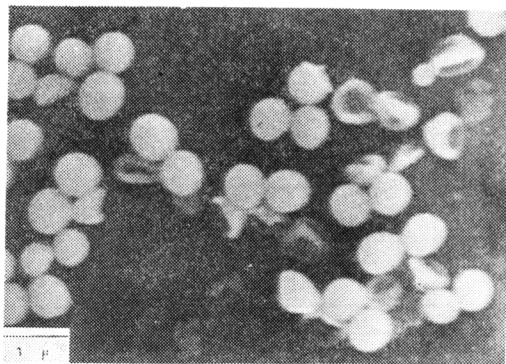


Photo. 2 Figure after propionylmaridomycin
6.25 mcg/ml contacted
(Scanning electron-microscope $\times 20,000$)



抗菌作用によりドーナツ状に押しつぶされた感じで溶菌しているブドウ球菌が認められる。次の Photo. 3, 4 (a, b, c) はいずれも超薄切片標本による細菌細胞の微細構造の観察結果を示し、Photo. 3 は分裂期の control であり細胞壁 (cell wall), 隔壁 (cross wall), 細胞質膜 (cell membrane), 核 (nucleus) などが観察できる。

Photo. 3 The electron-micrograph of intact
S. aureus 209-P

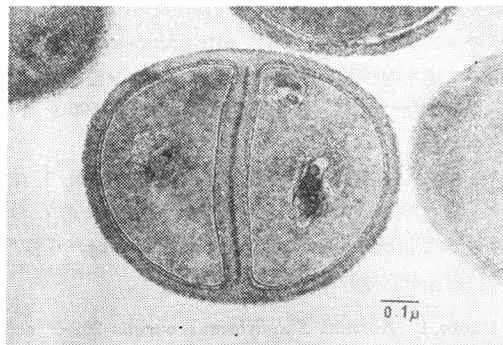


Photo. 4-(a) は damage を受けた分裂期の細胞で左側の細胞質の溶菌状態が認められるが、ここで注目すべきは cell wall の肥厚である。Control の数倍にもなっている。

Photo. 4-(b) も同様であるがこの場合肥厚細胞壁の多層構造が観察できた。

Photo. 4-(c) は溶菌状態の細胞を示しており、これらの超薄切片像と先の走査電子顕微鏡での立体像と比較すると興味深い。

試験管内耐性獲得状態および交差耐性

Heart infusion ブイヨン培地を用い、*Staphylococcus*

Photo. 4-(a) *S. aureus* 209-P exposed to
propionylmaridomycin

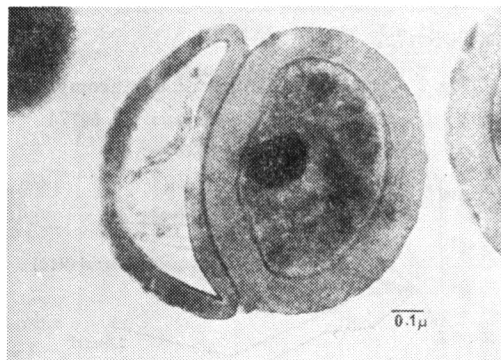


Photo. 4-(b)

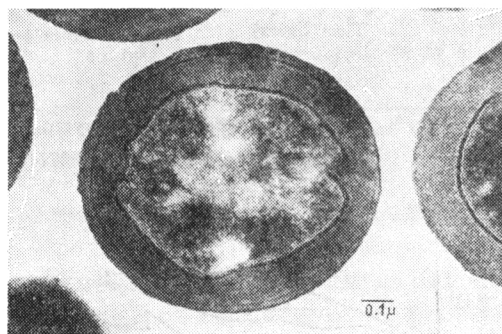
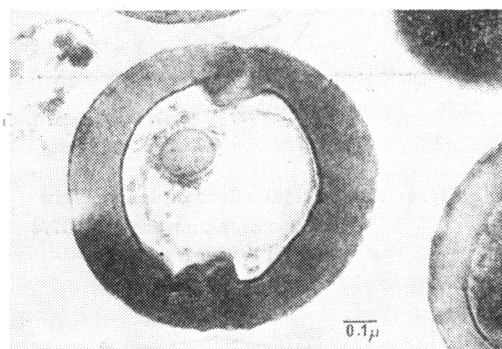


Photo. 4-(c)



aureus 209-P-JC 株を試験菌として 37°C, 24 時間を 1 世代とする増量の継代法により試験管内耐性獲得状態を検討した、その成績は Fig. 6 に示されるように各薬剤とも大きな差はなく、ほぼ同程度の階段的上昇を示した。また、このようにして得られたそれぞれの薬剤に対する耐性菌を用いて交互の薬剤間の交差耐性の有無を *Staphylococcus aureus* 203-P JC 原株を対照として検討を行なった。その成績は Table 5 に示されるように

Fig. 6 Development of resistance of *Staph. aureus* 209-P-JC *in vitro*

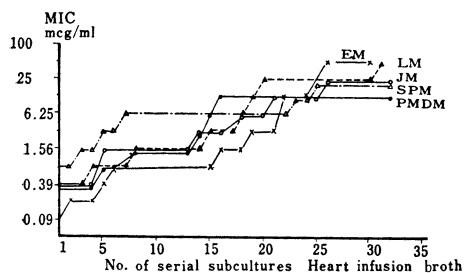


Table 5 Cross resistance

| Drug Strains | EM | LM | JM | SPM | PMDM |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| EM-R | >100 | 50 | 25 | 100 | 50 |
| LM-R | 12.5 | 100 | 50 | >100 | 100 |
| JM-R | 12.5 | 100 | 100 | >100 | >100 |
| SPM-R | 12.5 | 25 | 25 | 25 | 50 |
| PMDM-R | 3.12 | 50 | 25 | 25 | 50 |
| <i>Staph. aureus</i> 209-P-JC | 0.19 | 0.19 | 0.39 | 0.78 | 0.39 |

MIC (mcg/ml)

原株に較べEM では16~64倍, LM では100倍以上, JM, SPMでは64倍以上, PMDM においても100倍以上感受性の低下が認められ, 臨床的に分離されたブドウ球菌の各薬剤間における交差耐性とは異なり試験管内で人工的に得られた耐性菌はマクロライド系抗生物質間で完全な交差耐性を示した。

耐性誘導

Staphylococcus aureus 537-E (群馬大学 三橋教授分与株)を用いて, EM, PMDM の耐性誘導性の有無を検討した。EM あるいは PMDM を 0.05 mcg/ml 含むものおよび薬剤の代りに蒸留水を加えた試験管にトリプトソーヤブイオン培地で37°C, 18時間培養を行なった試験菌を加え37°C, 1時間振盪培養を行なった。1時間後 EM あるいは PMDM を 50 mcg/ml 含有する新しい培地および薬剤を含まない培地にこの試験菌を加え以後8時間まで菌数増加による比濁を biophotometer を用いて測定した。その成績は Fig. 7, 8 に示されるように EM 0.05 mcg/ml で誘導を行なった場合には EM, PMDM 50 mcg/ml の濃度においても試験菌の増殖を認めた。逆に PMDM 0.05 mcg/ml で誘導を行なった場合には EM, PMDM 50 mcg/ml 含有培地での菌の増殖はみられなかつた。

Fig. 7 Effect of EM on induction

MIC (mcg/ml)
Staph. aureus 537-E EM 12.5
 PMDM 0.78

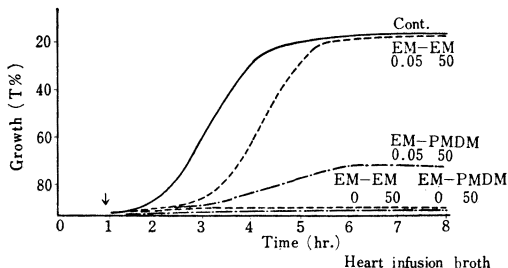
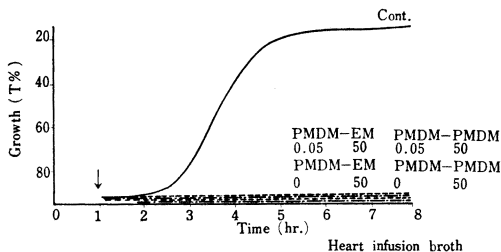


Fig. 8 Effect of PMDM on induction *Staph. aureus* 537-E



マウス実験的感染症に対する治療効果

Staphylococcus aureus Smith 株を2倍濃度の Heart infusion broth (Difco製)で37°C, 18時間培養し, これを原液として Heart infusion broth で希釈を行ない10% mucin と等量混合し, この0.5 ml を1群10匹の体重 18±1g dd系マウスの腹腔内に接種(約 6×10⁴ cells/ml=100 LD₅₀)した。

なお治療群は菌攻撃後2時間目に 2.5 mg/mouse~0.16 mg/mouse 経口投与または 1mg/mouse~0.031mg/mouse それぞれ1回尾静脈より注射し, 1週間観察し判定した。

なお経口薬剤は何れも 0.5% CMC に懸濁させたものを使用し, 静注薬剤の PMDM-M および MDM-M は 1%コハク酸水溶液にまた PMDM, MDM については 10% Carbowax 溶液を用いて溶解した。

その成績は Table 6, 7 に示すとおりで PMDM は既知マクロライド系抗生物質とほぼ同程度の効果を示した。また, PMDM の component の成績ではⅢが最も強く I, Ⅱは同程度, N, Vはやや弱かつた。また代謝物, MDM, PMDM-M, MDM-M の経口投与あるいは静注治療での効果は *in vitro* での効果と平行し MDM が PMDM-M や MDM-M より優れた成績を示した。

Table 6 Therapeutic effects of propionylmaridomycin and other macrolides against experimental *Staph. aureus* Smith infection in mice.

| Antibiotic | ED ₅₀ (mg/mouse) oral |
|------------|-------------------------------------|
| PMDM | 0.96 |
| EM | 1.0 |
| OM | 0.39 |
| LM | 1.06 |
| JM | 0.81 |
| SPM | 0.97 |

Animal: ddys ♂ mouse
Body weight: 18±1g

Table 7 Therapeutic effects of propionylmaridomycin and its components and metabolites against experimental *Staph. aureus* Smith infection in mice.

| Administration route | | ED ₅₀ | ED ₅₀ (mg/mouse) | |
|----------------------|----------|------------------|-----------------------------|-------|
| | | Antibiotic | Oral | I. V. |
| PMDM | | | 1.63 | 0.17 |
| Components | PMDM-I | 1.69 | — | — |
| | PMDM-II | 1.56 | — | — |
| | PMDM-III | 1.09 | — | — |
| | PMDM-IV | 3.25 | — | — |
| | PMDM-V | >2.5 | — | — |
| Metabolites | MDM | 1.63 | 0.09 | 0.09 |
| | PMDM-M | 2.00 | 0.21 | 0.21 |
| | MDM-M | — | 0.17 | 0.17 |

Animal: ddys ♂ mouse
Body weight: 18±1g

総括ならびに考案

武田薬品中央研究所において開発された新しいマクロライド系抗生物質 propionylmaridomycin (PMDM) に関する細菌学的評価を既知マクロライド系抗生物質である erythromycin, oleandomycin, leucomycin, josamycin, spiramycin などを対照薬剤として比較検討した。その結果この物質は既知薬剤と同様にグラム陽性菌群ならびにグラム陰性球菌に対して抗菌スペクトラムを示し、またその抗菌力 (MIC) は leucomycin や josamycin とほとんど同等であった。

また本物質の component のうち I, II, III, IV, V について各種病原菌に対する抗菌力を比較したところ I~V

までは大差が認められなかつたが V の抗菌力はやや弱かつた。なお component VI は資料の入手が困難で検討できなかったが、ほぼ V と同等の抗菌力を示すと研究所よりの私信を受けている。なお論文のはじめで述べたとおり本物質は main component である III が 70% 以上を占め、これと I, II, IV を加えると約 95% となり V, VI は合わせて 5% 以下に抑えられており、このような理由から本物質の抗菌力はその主成分である III のそれに近いということになる。いつぼう、本物質が体内で極めて速やかに代謝物になることがわかつてきた。すなわちラット体内においては propionylmaridomycin (PMDM) の経口投与によりほとんど 4''-deacyl-propionylmaridomycin (PMDM-M) に代謝される外に maridomycin (MDM) も検出される。またヒトに 1g 内服させた場合の血中には 4''-deacyl-maridomycin (MDM-M), MDM, PMDM-M, PMDM がまた尿中にも、MDM, MDM-M, PMDM-M, PMDM が認められている。そこでこれらの代謝物の抗菌活性について検討したが、その結果 propionylmaridomycin の propionyl 化されるものと maridomycin の抗菌力についてはグラム陽性のブドウ球菌群では本物質である PMDM が、0.39~1.56 mcg/ml を示すのに対して MDM が同様に 0.39~1.56 mcg/ml と同一抗菌力を示した。しかしながら興味深い点は溶血レンサ球菌において、PMDM が 0.19~0.39 mcg/ml に対し MDM では 0.09~0.19 mcg/ml となり、また肺炎球菌でも同様にその抗菌力は 2 倍程度強くなっている。またグラム陰性球菌のリン菌、髄膜炎菌でも 4 倍程度も強くなっている。いつぼう、PMDM-M ならびに MDM-M の抗菌活性は PMDM に比較するとブドウ球菌始め多くの感受性菌に対して大体 1/2~1/4 程度に弱くなつてはいるものの、その活性は維持されており本物質の経口投与後の動物ならびにヒト生体内における抗菌活性が期待される。

次に、本物質の臨床分離ブドウ球菌株の感受性分布を調べたが約 75% 近くは 1.56 mcg/ml 付近にピークを有する感受性株であつたが、残りの約 25% は ≥ 100 mcg/ml の高度耐性株であり、これらの耐性株は既知マクロライド系抗生物質と完全に交差耐性を示していた。なお erythromycin 高度耐性株は 30 株存在し、これらと他マクロライド系抗生物質間の交差耐性を調べると erythromycin 単独耐性株は 4 株、erythromycin と oleandomycin 2 剤耐性株は 2 株で残りの 24 株は erythromycin, oleandomycin, leucomycin, josamycin, spiramycin, それに本物質にも完全な交差耐性を示した。

また本物質の代謝物の感受性分布を見ると、代謝物 MDM は本物質 PMDM とほとんど同じ 1.56 mcg/ml

にピークを有し、代謝物 PMDM-M は 1 管弱い 3.12 mcg/ml にピークを有していた。しかしながら、いつぼう、これら 3 物質いずれも ≥ 100 mcg/ml の高度耐性株が約 20 数%認められ完全に交差していた。

次に、*in vitro* 抗菌作用におよぼす諸因子の影響あるいは抗菌作用が静菌的(bacteriostatic)か殺菌的(bactericidal)かなどの抗菌作用の型式について検討したが既知マクロライド系抗生物質とほとんど同一傾向が認められた。すなわち抗菌力におよぼす pH の影響ではアルカリ側で抗菌力の増強が認められ人血清蛋白添加による影響では余り大きな低下はなく、また接種菌量による影響については一般的に 10^6 個/ml, 10^7 個/ml 接種により影響が認められた。また、本物質の抗菌作用型式は MIC 濃度では静菌的であり MIC の 2~4 倍濃度において殺菌的作用が認められた。

そしてこのような抗菌作用が発揮されつつある時期におけるブドウ球菌の抗菌像について電子顕微鏡的観察を行なつたところ立体的観察(走査型電子顕微鏡)では赤血球のようにドーナツ状に押しつぶされた感じの溶菌像が認められ、また超薄切片標本(透過型電子顕微鏡)では細胞質内の大きな欠損部位または溶菌像を明瞭に観察するとともに細胞壁の著しい肥厚化現象を認めることができた。なおマクロライド系抗生物質やクロラムフェニコール、テトラサイクリン系抗生物質など蛋白合成阻害抗生物質による細菌細胞壁の肥厚化現象については私どもの別の報告を参照して頂きたい。

次に、本物質に対するブドウ球菌の試験管内耐性獲得状態を見ると既知マクロライド系抗生物質とほとんど同様に段階的な上昇を示した。そしてこれら人工的耐性株は完全な交差耐性が認められ、この点臨床分離株での成績と異なっていた。また群馬大学 三橋進教授より分与された *Staphylococcus aureus* 537-E を用いた、耐性誘導実験では本物質は erythromycin, oleandomycin などと異なり既知マクロライド系抗生物質の leucomycin, josamycin, spiramycin と同様に非誘導型のマクロライドであることがわかった。

最後のマウス実験のブドウ球菌感染症に対する治療効果については本物質は既知マクロライド系抗生物質と大差は認められずまたその component においても IV, V を除きほとんど本物質と差異が認められなかつた。そして今回の研究で一番重要な意義を有する metabolite の効果については経口投与ならびに静脈内注射により代謝物 MDM, PMDM-M, MDM-M いずれも十分な抗菌活性を有し *in vitro* において得られた data と平行し MDM が最も強く PMDM-M と MDM-M 間に大差は認められなかつた。なお経口投与による治療効果と静脈

注射での治療効果の間には約 10 倍程度の差で静注治療が優れていた。ともあれ本物質の component ならびに代謝物が *in vitro*, *in vivo* において十分な抗菌活性を有していることが裏付けられ、本剤の臨床効果が期待される。

結 論

1. 本物質の抗菌スペクトラム、抗菌力は既知マクロライド系抗生物質である leucomycin, josamycin と同様である。
2. 本物質の component および metabolite はいずれも *in vitro* ならびに *in vivo* において抗菌力を有していた。
3. 臨床分離ブドウ球菌に対する感受性分布は既知マクロライド系抗生物質 leucomycin や josamycin と同傾向を示した。
4. *In vitro* 抗菌力に及ぼす pH, 人血清蛋白, 接種菌量の影響についても既知薬剤と同様であつた。
5. 本物質の抗菌作用は MIC 濃度において静菌的作用を示し、それ以上の濃度においては殺菌的作用が認められた。
6. ブドウ球菌に対する本物質の抗菌像を立体的にまた超薄切片標本について観察した結果、細胞質の大きな欠損部位ならびに溶菌像を認めるとともに細胞壁の著しい肥厚化現象を認めた。
7. 試験管内耐性獲得状態は既知マクロライド系薬剤と同様に段階的であつた。この人工耐性株については既知マクロライド系抗生物質間に完全な交差耐性が認められた。しかしながら臨床分離株においては erythromycin 単独, erythromycin, oleandomycin 2 剤, さらに erythromycin, oleandomycin, leucomycin, josamycin, propionylmaridomycin, spiramycin すべてに耐性と 3 つのタイプが存在していた。
8. 本物質は耐性非誘導型のマクロライド系抗生物質に属していた。

稿を終るに当り、本物質の貴重な component ならびに metabolite を分与された武田薬品工業株式会社醸酵生産物研究所に厚く感謝致します。

参 考 文 献

——既知マクロライド系抗生物質に関するもの——

- 1) MITSUHASHI, SUSUMU: Drug action and drug resistance in bacteria. 1. Macrolide and lincomycin. University of Tokyo Press.
- 2) 中沢昭三, 山本泰子, 山岸由紀子: Erythromycin

- estolate に関する細菌学的研究。Chemotherapy 11(3): 180~192, 1963
- 3) 横田芳武, 新 利子, 佐藤充子, 三谷敬子: Macrolide 群抗生物質間の交叉耐性について。Chemotherapy 13(4): 307~309, 1965
- 4) 中沢昭三, 石山正光, 大槻雅子, 垣田敬治, 木村圭子: Josamycin に関する細菌学的研究。Chemotherapy 17(4): 576~579, 1969
- 5) 中沢昭三, 横田芳武, 南 亜夫, 三谷敬子, 吉岡 修, 金沢和子, 瀬野幸子, 下山幹雄, 斉藤安正: 新しいスピラマイシン誘導体 acetyl spiramycin に関する基礎的研究。J. Antibiotics, Ser. B 19(6): 1966
- 6) 中沢昭三, 下山幹雄, 前田暁代, 松林都子: 新しいスピラマイシン誘導体, acetyl spiramycin に関する基礎的研究, 第2報。J. Antibiotics, Ser. B 20(4): 1967
- 7) 中沢昭三, 小野尚子, 大槻雅子, 小島和子, 高田和美, 野村 知: 新しいマクロライド系抗生物質 SF-837 に関する細菌学的評価。Chemotherapy 投稿中。
——電子顕微鏡観察に関するもの——
NAKAO, MASAFUMI; EIRYO KITANAKA, KAZUYORI OCHIAI & SHOZO NAKAZAWA: Cell wall synthesis by *Staphylococcus aureus* in the presence of protein synthesis inhibitory agents. I. Electron microscopic study. J. Antibiotics 25(1): 60~63, 1972

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF A NEW MACROLIDE ANTIBIOTIC, PROPIONYL MARIDOMYCIN

SHYOZO NAKAZAWA, HISAKO ONO, MASAKO OTSUKI, TAKESHI NISHINO,
MASAFUMI NAKAO and TOMO NOMURA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

SETSUKO YOKOGAWA

Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

Biological evaluation was made on propionylmaridomycin which was provided by the Research Laboratories of Takeda Chemical Industries, Ltd.

- 1) The antibacterial activity of this macrolide antibiotic was similar to that of the known macrolide antibiotics such as leucomycin or josamycin.
- 2) The components and metabolites of this macrolide antibiotic showed *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity.
- 3) The susceptibility distribution of this macrolide antibiotic against clinical isolates of *Staphylococcus* showed similar patterns as that of leucomycin or josamycin.
- 4) The vulnerability to the influences of the pH value, human serum concentration and inoculum size *in vitro* antibacterial activity of this macrolide antibiotic was also similar to the known macrolide antibiotics.
- 5) *In vitro* antibacterial effect of this macrolide was bacteriostatic at the MIC and it was bactericidal at the concentration higher than MIC.
- 6) By the electron microscopic observation of the antibacterial effect of this macrolide antibiotic against *Staphylococcus*, degeneration and lysis of the cytoplasm and the remarkable thickness of the cell wall were recognized.
- 7) Propionylmaridomycin acquired resistance stepwise like that of the other known macrolide antibiotics *in vitro*. The complete cross resistance was observed among the known macrolide antibiotics against artificial resistant strains.

There were three types of resistance in the clinical isolates, *i. e.*,

- 1) against erythromycin alone, 2) against erythromycin and oleandomycin, and 3) against erythromycin, oleandomycin, leucomycin, josamycin, propionylmaridomycin and spiramycin.
- 8) Propionylmaridomycin did not induce resistance.