

Propionylmaridomycin に関する化学的, 細菌学的研究

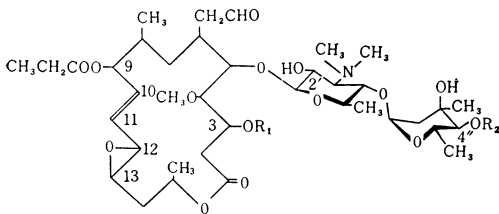
新井 武利

昭和薬科大学微生物学研究室

はじめに

Propionylmaridomycin は武田薬品工業株式会社で研究開発された新 macrolide 抗生物質であり, 下に示すような構造を有し, lactone 環 3 位, mycarose 4'' 位の側鎖の差により 6 つの components にわかれ, component III が main component であり, 約 70% 以上を占める。化学名は 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 である。

Structure of propionylmaridomycin



	R ₁	R ₂
component I	COCH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
II	COCH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
III	COCH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₃
IV	COCH ₃	COCH ₂ CH ₃
V	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃
VI	COCH ₃	COCH ₃

今回, propionylmaridomycin について他の macrolide 抗生物質との差異を IR, NMR, UV, TLC などによつて確認し, さらに 2, 3 の細菌学的検討を行なったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1) 赤外吸収スペクトル (IR)

Propionylmaridomycin (以下, PMDM と略す), EM, OM, LM, JM, SPM について KBr tablet で

IR スペクトルを測定した。

2) 核磁気共鳴スペクトル (NMR)

PMDM を CDCl₃ に溶解して NMR スペクトルを測定した。

3) 紫外吸収スペクトル (UV)

PMDM, EM, OM, LM, JM, SPM について UV スペクトルを測定した。

4) 薄層クロマトグラフィ (TLC)

PMDM, EM, OM, LM, JM, SPM についてブタノール-酢酸-水=3:1:1, ベンゼン-アセトン=5:2 または 3:1 の溶媒系を用いて TLC (plate: Kieselgel G, 110°C, 15分加熱) を行ない, 10% H₂SO₄ 噴霧後, 80°C, 10分加熱して発色させた。

5) 臨床分離ブドウ球菌に対する感受性分布

臨床分離の黄色ブドウ球菌 42 株について日本化学療法学会標準法により各 macrolide 抗生物質に対する MIC を測定して感受性分布の検討を行なった。

6) PMDM と他の macrolide 抗生物質との交叉耐性
臨床分離の黄色ブドウ球菌 42 株について LM, JM, SPM, EM, OM と PMDM との交叉耐性を検討した。

7) 抗菌力におよぼす影響

i) pH の影響

Heart infusion (HI) agar (Difco) の pH を 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 とし, トリプトソイブイオン (栄研) で前培養した *Staph. aureus* 209-P を用いて, PMDM の抗菌力におよぼす pH の影響を検討した。

ii) 接種菌量の影響

トリプトソイブイオンで前培養した *Staph. aureus* 209-P を原液 (2.0×10⁸ cells/ml) とし, これを滅菌生理食塩液で 10 倍希釈し, HI agar を用いて MIC を測定して, 接種菌量による影響を検討した。

8) 各 component の抗菌活性

PMDM は前述のように 6 つの components にわけられるが, そのうち I~V までの component について MIC を測定した。また *Staph. aureus* 209-P を用いた TLC による bioautography も行なった。

9) 代謝産物の抗菌活性

PMDM は生体内で mycarose 4'' 位の ester が加水分解されるが, その代謝産物 (PMDM-M) の抗菌活

Fig. 1 IR spectra of propionylmaridomycin (PMDM), EM and OM (KBr tablet)

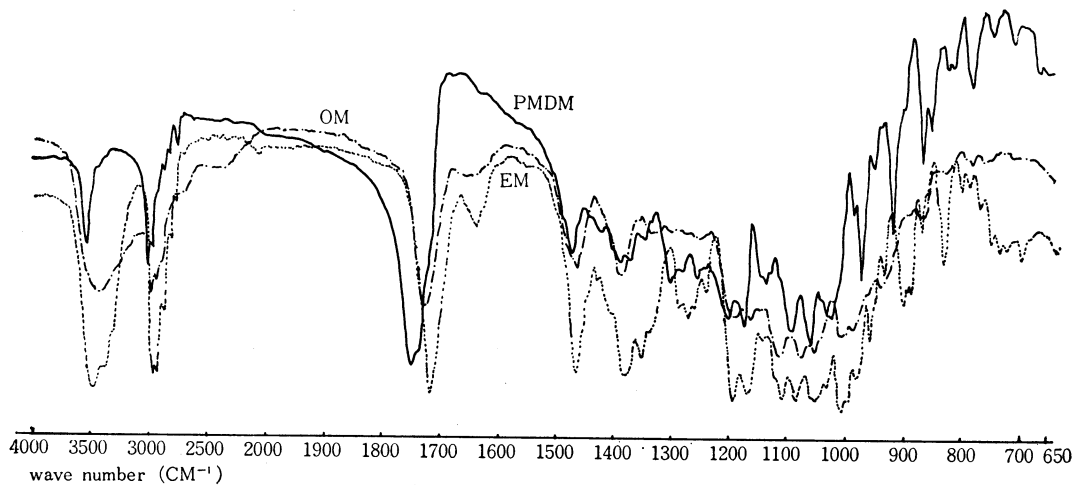
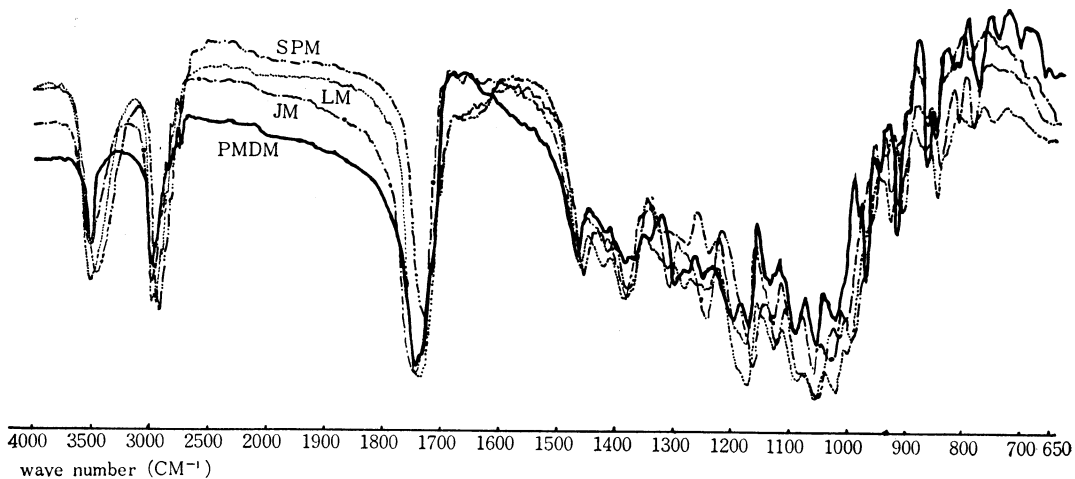
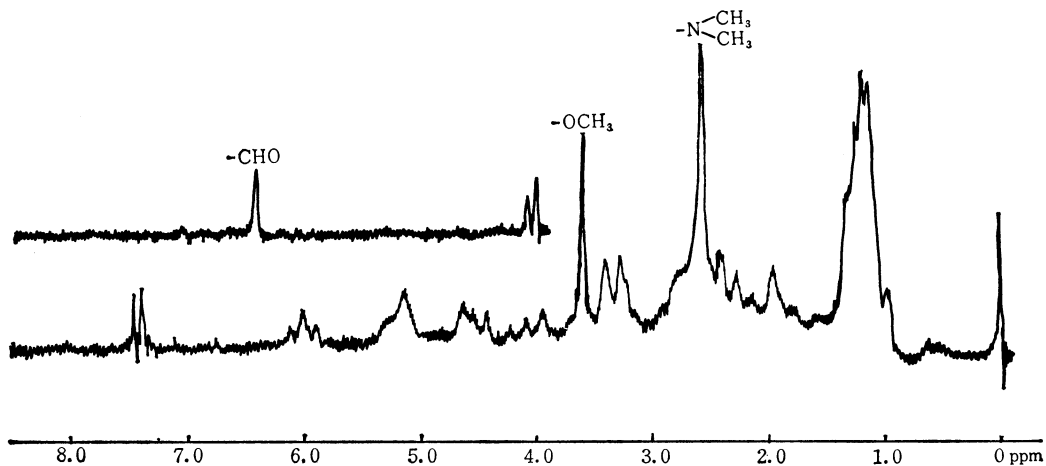


Fig. 2 IR spectra of propionylmaridomycin (PMDM), LM, JM and SPM (KBr tablet)

Fig. 3 NMR spectrum of propionylmaridomycin III (60MHz in CDCl₃)

性を *Staph. aureus* 209-P を用いて cylinder plate method で測定し、比較検討した。

II. 実験成績

1) 赤外吸収スペクトル

EM, OM と PMDM の IR スペクトラムは, Fig. 1 に示すとおりであり, 波数 1700 cm^{-1} 付近の $>\text{C}=\text{O}$ 基の吸収に EM, OM と PMDM とでは差異が認められ, また 1600 cm^{-1} 以下の指紋領域にもかなりの差異が認められた。16員環 macrolide 抗生物質である, LM, JM, SPM と PMDM の IR スペクトラムは, Fig. 2 に示すとおりであり, $>\text{C}=\text{O}$ 基の吸収もだいたい一致し, 4 者がひじょうに類似したスペクトラムを示した。しかし指紋領域では各々わずかずつではあるが異なつたスペク

ラムが認められた。

2) 核磁気共鳴スペクトル

PMDM の NMR スペクトラムは, Fig. 3 に示すとおりであり, $-\text{CHO}$ 基, $-\text{OCH}_3$ 基, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 基が各 1 個存在することが推定された。

3) 紫外吸収スペクトル

PMDM の main component である PMDM-III および LM, JM, SPM の UV スペクトラムを Fig. 4 に示すが, LM, JM, SPM の 3 者はともに $230\text{ m}\mu$ 付近に共役 2 重結合の吸収が認められたが, PMDM-III では同様な吸収は認められなかつた。

4) 薄層クロマトグラフィ

Macrolide 抗生物質の TLC を Fig. 5 に示すが, ブタノール-酢酸-水系溶媒およびベンゼン-アセトン系溶媒ともに EM, OM, SPM の 3 者と PMDM, LM, JM の 3 者との Rf 値の差異は明確に認められたが, PMDM と LM, JM との Rf 値の差はベンゼン-アセトン系溶媒のほうが著明であつた。また, H_2SO_4 噴霧の結果, PMDM の main spot は暗灰紫色を, JM, LM は淡紫色または淡桃色を呈した。ただし, この呈色は条件によつてやや変動する。

5) 臨床分離ブドウ球菌の感受性分布

臨床分離の黄色ブドウ球菌 42 株の macrolide 抗生物質に対する感受性分布は Fig. 6 に示すとおりである。図から明かなように, PMDM に対する分布曲線は 2 峰性を示し, 3.1 mcg/ml に 1 つの peak があり, 6.25 mcg/ml 以下に 76.2% の株が含まれるが, 200 mcg/ml 以上の高度耐性を示した株が 19.1% 認められた。他剤と比較すると, PMDM の *in vitro* の抗菌活性は EM より 3 管程度, LM より 1 管程度, JM と同程度かやや劣るが, SPM より優れ OM と同程度であつた。

6) 交叉耐性

PMDM と他の macrolide

Fig. 4 UV spectra of propionylmaridomycin III, LM, JM and SPM

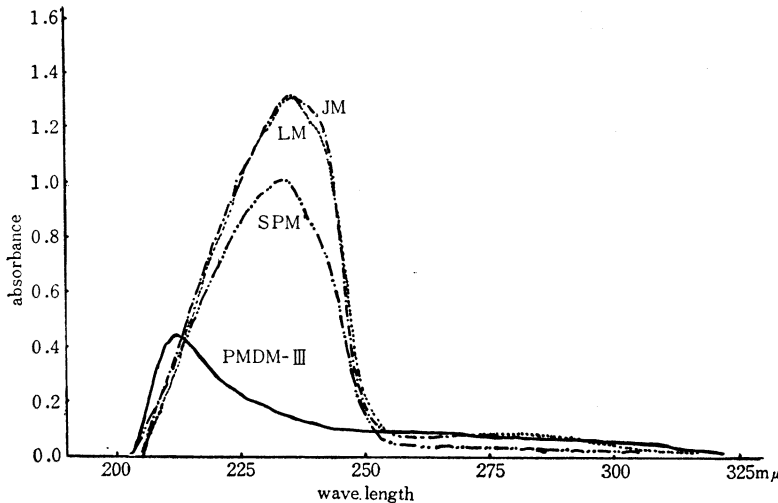
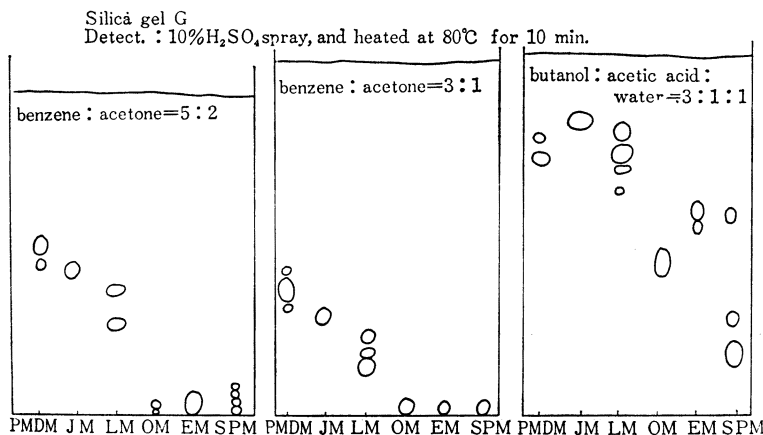


Fig. 5 Thin-layer chromatograms of macrolide antibiotics



PMDM JM LM OM EM SPM PMDM JM LM OM EM SPM PMDM JM LM OM EM SPM

Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates of *Staph. aureus* to propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics (42 strains)

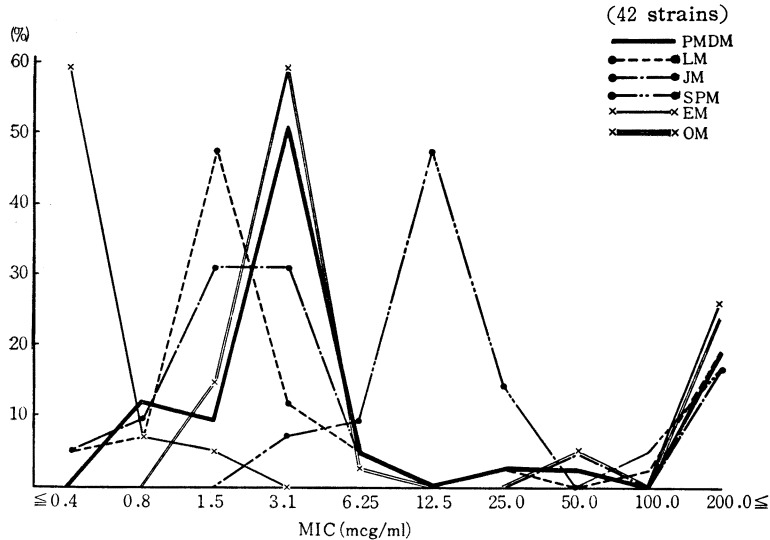


Fig. 7 Cross sensitivity of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics (I) (*Staph. aureus* 42 strains)

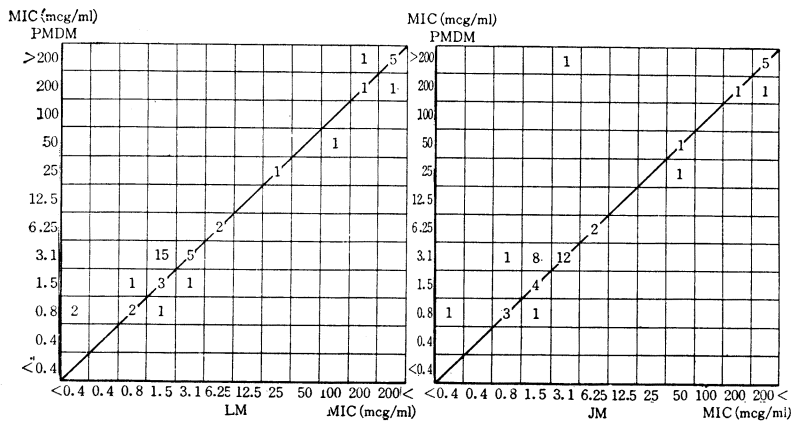
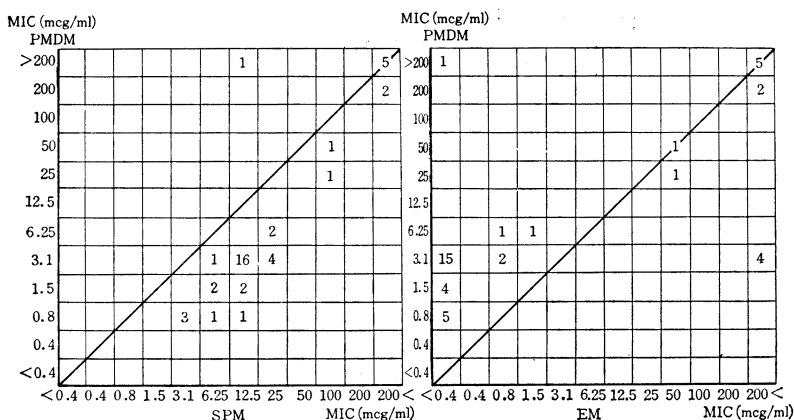


Fig. 8 Cross sensitivity of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics (II) (*Staph. aureus* 42 strains)



抗生物質との交叉耐性の検討結果を Fig. 7, 8, 9 に示した。

LM に対しほぼ完全な交叉耐性が認められた。しかし, PMDM に高度耐性を示しながら EM, JM, SPM に感受性を示した株が 1 株あり, また逆に EM に高度耐性でありながら PMDM に感受性である株が 4 株あり, OM においても 200 mcg/ml を示したのに対し, PMDM では 25 mcg/ml とやや PMDM のほうが低い MIC を示した株が 1 株認められた。

7) 抗菌力におよぼす影響

i) pH の影響

HI agar の pH を変化させて, MIC におよぼす培地の pH の影響を検討したところ, Table 1 に示すような結果が得られた。すなわち, 酸性側では MIC が大きくなり, アルカリ性側では MIC が小さくなった。

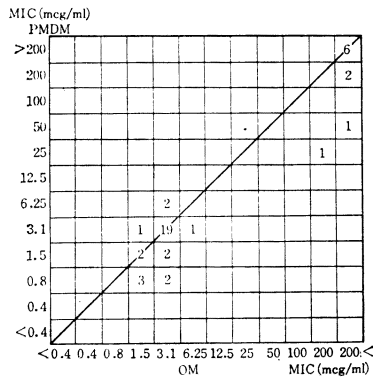
ii) 接種量の影響

Staph. aureus 209-P の接種量を変化させて MIC を測定したところ, Table 2 に示すような結果が得られた。すなわち, 10^9 cells/ml の接種量と 10^7 cells/ml とでは 1 管程度の MIC の差がみられたが, $10^7 \sim 10^4$ cells/ml では MIC の変動はなく, 接種量の影響は認められなかった。

8) 各 component の抗菌活性

PMDM の各 component について bioautography を行ない, Fig. 10 のような結果を得た。各 component について等量 (約 4 mcg) ずつ spot したにもかかわらず, 生じた増殖阻止円の大きさにやや差があり, component IV と V は小さな spot を示した。また, compo-

Fig. 9 Cross sensitivity of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics (III) (*Staph. aureus* 42 strains)



ment III は PMDM の spot と同じ程度の Rf 値と阻止円の大きさを示した。

各 component の Gram 陽性菌に対する MIC は Table 3 に示すとおりであり、II~IV は PMDM とほぼ同じであったが、I が 1 管程度、V が 2 管程度劣った抗菌活性を示した。

Table 1. Effect of medium pH on antibacterial activity of propionylmaridomycin

pH	5.0	6.0	7.0	8.0
MIC (mcg/ml)	12.5	3.1	0.75	0.75

H. I. agar

Table 2. Effect of inoculum size on antibacterial activity of propionylmaridomycin

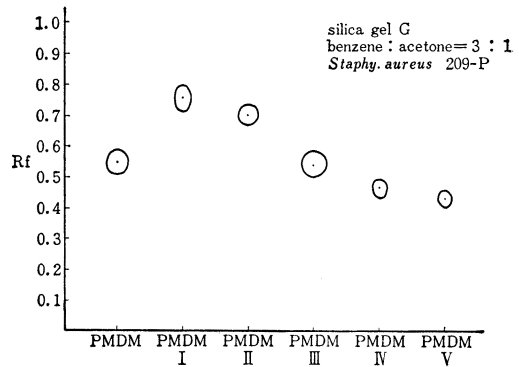
Inoculum size (per ml)	2.0×10^9	2.0×10^7	2.0×10^6	2.0×10^5	2.0×10^4
MIC (mcg/ml)	0.75	0.37	0.37	0.37	0.37

subculture medium : trypticase soy broth
test strain : *Staphylococcus aureus* 209-P

Table 3 Antibacterial spectrum of propionylmaridomycin and its components

Organisms	MIC (mcg/ml)					
	PMDM	PMDM I	PMDM II	PMDM III	PMDM IV	PMDM V
<i>Staph. aureus</i> 209-P	0.75	1.5	0.75	1.5	1.5	6.25
<i>Staph. aureus</i> 671-2	1.5	3.1	1.5	1.5	1.5	6.25
<i>Staph. aureus</i> 6	1.5	3.1	1.5	1.5	1.5	6.25
<i>Staph. epidermidis</i> 1	1.5	6.25	1.5	3.1	3.1	6.25
<i>Staph. epidermidis</i> 2	1.5	3.1	1.5	3.1	3.1	6.25
<i>Staph. epidermidis</i> 8	6.25	6.25	3.1	6.25	6.25	12.5
<i>Sarcina lutea</i> 43	0.2 >	0.4	0.2 >	0.2	0.4	0.2 >
<i>Bac. subtilis</i> PCI-219	0.75	1.5	0.75	0.75	1.5	3.1

Fig. 10 TLC (bioautography) of propionylmaridomycin and its components



9) 代謝産物の抗菌活性

PMDM と PMDM-M との抗菌活性を比較した結果は Table 4 のとおりであり、metabolate である PMDM-M は PMDM に比し、65%の抗菌活性を有していた。

III 考 察

新 macrolide 抗生物質である PMDM について、臨床的によく用いられている、既知 macrolide 抗生物質と化学的、細菌学的に比較検討した。PMDM は IR スペクトラム、TLC から、EM、OM のいわゆる14員環 macrolide 抗生物質 (EM 群と略す) より、LM, JM, SPM などの16員環 macrolide 抗生物質 (LM 群と略す) に類似していることが推定される。IR スペク

Table 4 Comparison of antibacterial activity of PMDM and PMDM-M by cylinder-plate method

	PMDM	PMDM-M
activity (%)	100	65

Test strain : *Staph. aureus* 209-P

トラムにおいて PMDM と EM 群とでは $>C=O$ 基の吸収である 1700cm^{-1} 付近の吸収がズレており、LM 群のそれとは一致している。これは PMDM に NMR スペクトラムにみられるように $-CHO$ 基1個の存在が確認されており、LM¹⁾, JM²⁾, SPM³⁾にも同様に $-CHO$ 基が存在するので、その影響と考えられる。

PMDM と LM, JM, SPM の差異は IR スペクトラムの 1600cm^{-1} 以下の指紋領域および TLC から明かであるが、UV スペクトラムにおいて LM 群には $230\text{m}\mu$ 付近に共役2重結合の吸収が認められるのに対し、PMDM では認められない。すなわち、PMDM は共役2重結合を含んでいないことになるので、他の LM 群との差異はより明確となる。

TLC の plate 上における H_2SO_4 による呈色は macrolide 抗生物質の1つの特徴であり⁴⁾、著者の実験においても同一 plate 上で PMDM と LM, JM とは異なつた呈色がみられたが、条件によつて色調がかなり変動するので、呈色だけで同定、定量することは困難である。

In vitro における抗菌活性はほぼ既知 macrolide 抗生物質と同程度であり、アルカリ性側で抗菌活性が高まるなどの macrolide 抗生物質の特徴をそなえ、また完全ではないが既知 macrolide 抗生物質と交叉耐性が成立するが、これは化学構造がひじょうに類似しているため、当然の結果と思われる。

Macrolide 抗生物質の多くはいくつかの component からなつており、各 component によつて *in vitro* の抗菌活性にやや差がみられるが⁵⁾、PMDM においても同様であり、component V は他に比して抗菌活性が劣つた。すなわち、PMDM では mycarose 4'' 位の ester の脂肪酸の炭素数が多いほうが *in vitro* の抗菌活性が高まるものと考えられる。

IV 結 論

1) Propionylmaridomycin は LM, JM, SPM に

類似した macrolide 抗生物質であるが、IR, NMR, UV 各スペクトラム, TLC などにより、これらの既知抗生物質と異なる構造を有することが判明した。

2) Propionylmaridomycin は *in vitro* において黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は EM より3管程度、LM, JM より1管程度劣るが、OM と同程度の MIC 値を示し、SPM よりやや優れている。これらの既知 macrolide 抗生物質と交叉耐性が認められたが、EM 耐性株でありながら propionylmaridomycin 感受性株も認められた。

3) Propionylmaridomycin の *in vitro* の抗菌活性は培地をアルカリ性にするにより増強され、酸性にすると低下した。また、抗菌活性は接種菌量の影響をあまり受けなかつた。

4) Propionylmaridomycin の各 component には *in vitro* の抗菌活性にやや差が認められ、mycarose 4'' 位の ester では脂肪酸の炭素数の多いほうが抗菌活性が大であつた。

最後に、御校閣下さつた東邦大学医学部 桑原章吾教授、および化学的解析に懇切な御助言を賜つた昭和薬科大学多賀淳一教授、ならびに IR, UV 測定に御尽力して下さつた昭和薬科大学 塩島憲治講師に心からの謝意を表します。

文 献

- 1) OMURA, S., *et al.*: The chemistry of leucomycin. IV. Structure of leucomycin A₁. *J. Antibiotics* 21(3): 199~203, 1968
- 2) 大村 智: 第14回日本薬学会関東支部大会 (1970)
- 3) OMURA, S., *et al.*: Structure of the spiramycin (Foromacidines) and their relationship with the leucomycin and carbomycins (Magnamycins). *J. Am. Chem. Soc.* 91(12): 3401~3404, 1969
- 4) STAHL, E. (Translated by M. R. F. ASHWOTH): *Thin-layer chromatography, a laboratory handbook*. Springer-Verlag, New York, p. 572, 1969
- 5) OMURA, S., *et al.*: Structure-biological activities relationships among leucomycin and their derivatives. *J. Antibiotics* 21(9): 532~538, 1968

CHEMICAL AND BACTERIOLOGICAL STUDIES ON PROPIONYLMARIDOMYCIN

TAKETOSHI ARAI

Department of Microbiology, Showa College of Pharmaceutical Sciences

The chemical and bacteriological studies on a new macrolide antibiotic, propionylmaridomycin, were performed in comparison with the other macrolide antibiotics, and the following results were obtained.

1) The chemical structure of propionylmaridomycin was closely related to kitasamycin, josamycin and spiramycin, but the difference between structures of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics was clearly confirmed by TLC, IR, NMR and UV spectrum.

2) The sensitivities to propionylmaridomycin of 42 clinical isolates of *Staph. aureus* were measured by the plate dilution method. The sensitivity distribution curve of *Staph. aureus* showed bimodal pattern with peaks at 3.1 mcg/ml and more than 200 mcg/ml, respectively. Comparatively speaking, mean MIC of propionylmaridomycin tends to be greater than that of EM, LM and JM, less than SPM, and nearly the same as OM.

3) Cross resistance was observed between propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics, but some strains of EM resistant organisms showed to be sensitive to propionylmaridomycin.

4) The antibacterial activity of propionylmaridomycin showed to be more potent at the alkaline side of culture medium pH.

5) The inoculum size did not show any influence on antibacterial activity of propionylmaridomycin.

6) The difference was observed among antibacterial activities of the 6 components of propionylmaridomycin complex. Presence of acetate at the 4''-position of the mycarose showed lower antibacterial activity than propionate or isovalerate at the same position.