

## Propionylmaridomycin の嫌気性菌に対する抗菌作用

二宮敬宇・谷 悦子・渡辺邦友・牛島 彊

上野一恵・鈴木祥一郎

岐阜大学医学部微生物学教室

清水保夫・坂 義人・毛 泉・磯貝和俊

西浦常雄

岐阜大学医学部泌尿器科学教室

## はじめに

Propionylmaridomycin (PMDM) は武田薬品工業株式会社の中央研究所で開発された新しいマクロライド抗生物質である。その抗菌力は leucomycin と josamycin に近似し、また、これらと同じく、PMDM にも耐性誘導現象がみられない。

私どもは PMDM の嫌気性菌に対する抗菌力およびそれに及ぼす諸因子の影響を検討したので、報告する。

## I 抗菌スペクトラム

GAM 半流動高層培地の1夜培養菌を被検菌とし、GAM 寒天培地を用いた平板希釈<sup>1)</sup>、スチールウール (CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 90%ガス) による嫌気環境<sup>2)</sup>で 37°C、48時間培養後、その MIC を測定した。

Table 1 は教室保育の球菌、Table 2 は桿菌の成績である。PMDM は *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*

Table 1 Antibacterial spectrum of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics

Organism	MIC (mcg/ml)						
	PMDM	LM	EM	JM	SPM	LCM	CLM
<i>Peptococcus prevotii</i> ATCC-9321	1.56	1.56	0.78	1.56	3.13	0.19	0.19
<i>Peptococcus aerogenes</i> ATCC-14963	0.78	0.78	0.78	0.78	6.25	0.19	0.19
<i>Peptococcus variabilis</i> ATCC-14955	3.13	6.25	6.25	0.78	6.25	0.78	0.39
<i>Peptococcus variabilis</i> PL-7	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	0.19	0.19
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> Z-1003	3.13	1.56	3.13	0.78	6.25	0.19	0.19
Group-1 NCTC-9801	1.56	1.56	1.56	1.56	0.19	0.19	0.19
Group-2 NCTC-9804	6.25	0.78	0.78	6.25	6.25	0.19	0.19
Group-7 NCTC-9808	3.13	3.13	0.78	1.56	6.25	0.19	0.19
Group-8 NCTC-9810	0.78	1.56	0.78	0.78	12.5	0.19	0.19
Group-9 NCTC-9811	1.56	0.39	0.39	0.19	0.19	0.39	0.19
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> B-38	1.56	1.56	0.78	0.78	3.13	0.78	0.19
<i>Peptostreptococcus putridus</i> B-30	1.56	0.19	0.78	1.56	0.78	0.19	0.19
<i>Veillonella parvula</i> ATCC-10790	50	12.5	3.13	12.5	100	0.19	0.19

(NCTC の菌株を含めて) に対しすぐれた抗菌力を持ち、その MIC は 6.25 mcg/ml 以下であつた。 *Veillonella parvula* には 50 mcg/ml であつた。他剤との比較では、

PMDM は LM より劣り、EM, JM と同等、SPM よりすぐれている。

桿菌では、PMDM は *Bacteroides* には 3.13 mcg/ml

Table 2 Antibacterial spectrum of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics

Organism	MIC (mcg/ml)						
	PMDM	LM	EM	JM	SPM	LCM	CLM
<i>Bacteroides fragilis</i> H-7	3.13	1.56	0.78	0.19	25	0.19	6.25
<i>Bacteroides convexus</i> H-10	3.13	0.78	1.56	0.78	12.5	6.25	0.19
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> W-3	1.56	0.78	1.56	0.39	6.25	3.13	0.78
<i>Bacteroides distasonis</i> W-7	3.13	1.56	3.13	0.78	12.5	12.5	3.13
<i>Bacteroides vulgatus</i> W-5	0.19	0.19	0.78	0.19	3.13	3.13	0.19
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> H-12	50	25	25	50	25	0.19	0.19
<i>Sphaerophorus</i> sp. H-17	100	100	100	100	100	0.39	0.19
<i>Clostridium perfringens</i>	3.13	1.56	3.13	3.13	6.25	0.19	0.19
<i>Clostridium tetani</i>	0.19	0.19	0.78	0.19	1.56	0.19	0.19
<i>Clostridium novyi</i>	0.78	0.19	0.78	0.19	1.56	0.19	0.19
<i>Clostridium histolyticum</i>	0.19	0.19	0.78	0.19	0.78	0.19	0.19
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.78	0.78	0.78	0.78	6.25	50	6.25
<i>Clostridium septicum</i>	100	100	100	100	100	6.25	50

Table 3 Comparative susceptibility of anaerobic bacteria to PMDM and its five components

Organism	MIC (mcg/ml)					
	PMDM	C-I	C-II	C-III	C-IV	C-V
<i>Bacteroides fragilis</i> H-9	1.56	0.78	0.78	3.13	0.78	3.13
<i>Bacteroides convexus</i> W-1	1.56	3.13	0.78	1.56	6.25	3.13
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> W-10	1.56	1.56	0.78	1.56	3.13	1.56
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> W-12	50	50	50	50	50	50
<i>Sphaerophorus freundii</i> H-14	100	100	100	100	100	100
<i>Sphaerophorus</i> sp. H-16	100	100	100	100	100	100
<i>Sphaerophorus</i> sp. H-18	100	100	100	100	100	100
<i>Peptococcus anaerobius</i> B-40	12.5	3.13	3.13	12.5	12.5	12.5
<i>Peptococcus prevotii</i> ATCC-9321	1.56	1.56	1.56	3.13	6.25	3.13
<i>Peptococcus variabilis</i> ATCC-14955	1.56	1.56	0.78	3.13	3.13	1.56
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> B-38	0.78	0.78	0.78	0.78	3.13	0.78
<i>Peptostreptococcus putridus</i> PL-9-2	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39
Group-1 NCTC-9801	3.13	1.56	1.56	3.13	3.13	3.13
Group-6 NCTC-9817	1.56	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56
Group-7 NCTC-9808	3.13	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25

以下、*Sphaerophorus* には 50 mcg/ml, 100 mcg/ml であつた。*Clostridium* には *C. septicum* を除き、3.31 mcg/ml 以下の MIC を示した。他剤との比較では球菌

と類似したパターンを示した。

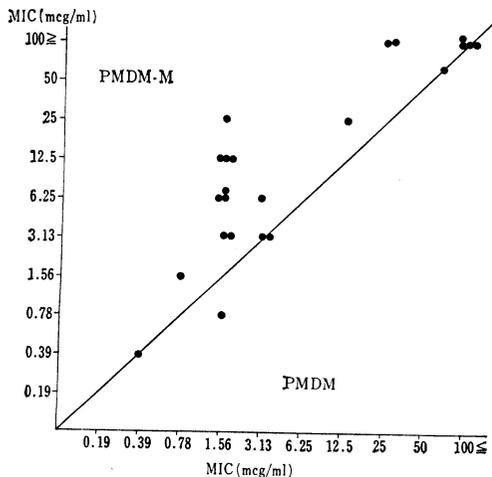
Table 4 Antibacterial spectrum of propionylmaridomycin and its metabolites

Organism	MIC (mcg/ml)		
	PMDM	MDM	PMDM-M
<i>Peptococcus variabilis</i> ATCC 14955	1.56	1.56	6.25
<i>Peptococcus prevotii</i> ATCC 9321	1.56	1.56	6.25
<i>Peptococcus anaerobius</i> B-40	12.5	6.25	25
<i>Peptostreptococcus putridus</i> PL-9-2	0.39	0.19	0.39
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0.78	0.39	1.56
Group 1 NCTC-9801	3.13	1.56	3.13
Group 6 NCTC-9817	1.56	0.78	0.78
Group 7 NCTC-9808	3.13	3.13	3.13
Group 8 NCTC-9810	1.56	0.78	3.13
Group 9 NCTC-9811	1.56	0.78	3.13
H-3	25	6.25	100
Group 5 NCTC-9816	25	3.13	100
<i>Bacteroides fragilis</i> H-6	1.56	1.56	12.5
<i>Bacteroides convexus</i> H-8	1.56	3.13	12.5
<i>Bacteroides fragilis</i> H-9	1.56	1.56	6.25
<i>Bacteroides convexus</i> W-1	1.56	1.56	12.5
<i>Bacteroides convexus</i> W-2	3.13	1.56	6.25
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> W-10	1.56	0.78	12.5
<i>Sphaerophorus freundii</i> H-14	100	100	100
<i>Sphaerophorus</i> sp. H-16	100	100	100
<i>Sphaerophorus</i> sp. H-18	100	100	100
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> W-12	50	6.25	50

PMDM は6つの component から構成され、その主な component はⅢで、70%以上を占め、これとⅠ、Ⅱ、Ⅳを加えると、95%以上となり、Ⅴ、Ⅵは5%以下である。その component の抗菌力を Table 3 に示した。そして、その抗菌力はⅡ、Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴの順でわずかずつすぐれている。PMDM の抗菌力はⅠと近似している。どの component も *Sphaerophorus* には大きな MIC 値を示した。

また、PMDM は生体内で急速に代謝され、生体内で抗菌力を発揮しているものは代謝物であると考えられている。ラットではその大部分は 4''-deacyl-propionylmaridomycin (PM-DM-M) と呼ばれているものであり、これを含め、現段階では3種類の代謝物\*が報告されている。Table 4 は2種類の代謝物および PMDM の成績である。MDM, PMDM, PMDM-M の順ですぐれた抗菌力をもっている。また、Fig. 1 は PMDM と PMDM-M との抗菌力の相関を示したものである。

Fig. 1 Cross-sensitivity of propionylmaridomycin and 4''-deacyl-propionylmaridomycin



\* (その他 maridomycin...MDM, 4''-deacyl-maridomycin...MDM-M)

II 臨床分離株の感受性分布

最近、当教室、当大学泌尿器科学教室および順天堂大学臨床病理学教室で、臨床材料から分離し、当教室で同定した嫌気性菌 216 株について、PMDM の抗菌力を検討した。

Table 5 は球菌の成績である。*Peptococcus* の中、*P. variabilis*, *P. anaerobius*, *P. prevotii* は 100 mcg/ml で、他の *Peptococcus* は 6.25 mcg/ml 以下の MIC である。

*Peptostreptococcus* では全株が 25 mcg/ml 以下で 1.56 mcg/ml に MIC のピークがある。

*Veillonella* はマクロライド系抗生物質には低い感受性を示すといわれている。この PMDM も同様であり、

Table 5 Antibacterial effect of propionylmaridomycin against anaerobic coccus isolated from clinical materials

Species	No. of strains	MIC (mcg/ml)										
		0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100 $\leq$	
<i>Peptococcus variabilis</i>	14			1	9		1					3
<i>Peptococcus anaerobius</i>	12				8		2					2
<i>Peptococcus prevotii</i>	4			1	2							1
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	3		1	1	1							
<i>Peptococcus</i> sp.	2					2						
<i>Peptostreptococcus putridus</i>	12	1	4	1	4	1			1			
<i>Peptostreptococcus foetidus</i>	2			1		1						
<i>Veillonella alcalescens</i>	9								1	4		4
<i>Veillonella parvula</i>	5								1	1		3
<i>Veillonella</i> sp.	8							2	3	1		2

Table 6 Antibacterial effect of propionylmaridomycin against anaerobic rods isolated from clinical materials

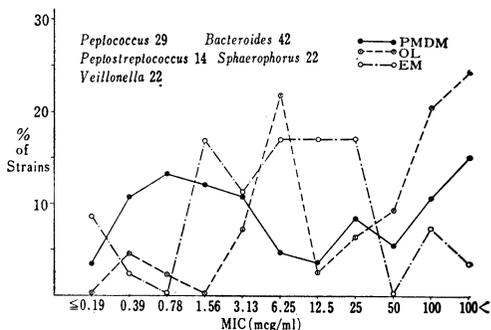
Species	No. of strains	MIC (mcg/ml)										
		0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100 $\leq$	
<i>B. fragilis</i>	25		2	6	5	6	4	1	1			
<i>B. distasonis</i>	10				1	1	4	1	1	1		1
<i>B. vulgatus</i>	5	1		1	2	1						
<i>B. oralis</i>	2		2									
<i>B. trichooides</i>	2		2									
<i>B. termiitidis</i>	2						1	1				
<i>Bacteroides</i> sp.	43		3	2	1	1	16	20				
<i>Sph. varium</i>	11											11
<i>Sph. russi</i>	4											4
<i>Sph. necrophorus</i>	2								1			1
<i>Sph. mortiferum</i>	2											2
<i>Sph. glutinosum</i>	1											1
<i>Sphaerophorus</i> sp.	20											20
<i>Fusobacterium</i>	6	3					1					2

全株が 12.5 mcg/ml 以上の MIC であり、その MIC のピークは 100 mcg/ml 以上にある。

Table 6 はグラム陰性桿菌の成績である。*Bacteroides* は PMDM に感受性、*Sphaerophorus* は耐性を示し、その後の実験で *Bacteroides* は 250 mcg/ml で全株がその発育を阻止され、いつぼう、*Sphaerophorus* は *S. necrophorus* を除いて、500 mcg/ml 以上の MIC を示した。FINEGOLD は EM 60 mcg/ml ディスクをこの 2 属の簡易鑑別に用いている<sup>4)</sup>。PMDM も鑑別に使用できそうである。今後検討したい。

Fig. 2 は Table 5, Table 6 に示した嫌気性菌の中の 119 株の、PMDM, EM, OL に対する感受性分布を比較したものである。PMDM は EM と類似したパター

Fig. 2 Comparative susceptibility of anaerobic bacteria to PMDM, OL and EM



ンを示した。

III MIC に及ぼす諸因子について

(1) 培地 pH による MIC の変動

GAM 寒天培地の pH を 5, 7 および 9 に調整, 接種菌量を $10^8$ コとし, pH による MIC の変動を検討した。アルカリ側で PMDM は抗菌力が強くあらわれた。その成績を Table 7 に示す。

Table 7 Effect of medium pH on antibacterial activity of propionylmaridomycin

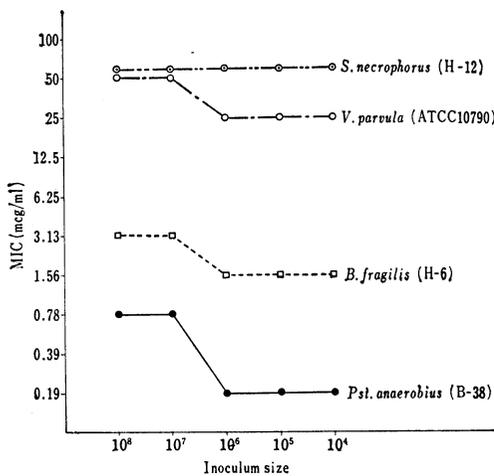
Organism	MIC (mcg/ml)		
	pH 5	pH 7	pH 9
<i>Peptococcus anaerobius</i> B-40	NG	0.19	0.19
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> B-38	NG	1.56	0.19
<i>Veillonella parvula</i> ATCC-10790	NG	50	12.5
<i>Bacteroides fragilis</i> H-6	NG	3.13	0.78
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> H-12	NG	50	50

Medium : GAM    Inoculum size :  $10^8$

(2) 培地の種類による MIC の変動

GAM 寒天, Trypticase soy agar (BBL), Liver veal agar (Difco), Brain heart infusion agar (BBL) を被検培地とし, 教室保育株を用い, MIC の変動を検討した。GAM 以外の培地には 5% 羊血液を加え, 実験に供した。球菌では培地による MIC の変動は少なく, 桿菌では GAM 寒天培地で抗菌力が最も強くあらわれた。

Fig. 3 Effect of inoculum size on antibacterial activity of propionylmaridomycin



(3) 接種菌量による MIC の変動

教室保育の 4 菌種の GAM 半流動培地 1 夜培養菌を用い, 希釈液<sup>3)</sup>により 1 ml 当り  $10^8 \sim 10^4$  コの生菌数の菌液を作る。その 1 白金耳を PMDM 含有 GAM 寒天培地に塗抹し, 接種菌量による MIC の変動を調べた。Fig. 3 にその成績を示す。*S. necrophorus* の MIC は影響されないが, *V. parvula*, *B. fragilis*, *Pst. anaerobius* の MIC は接種菌量 $10^7$ コ以上で高くなる。

IV 試験管内耐性獲得および自然耐性分布

被検菌株には臨床材料から分離, 同定された *Peptostreptococcus anaerobius* (K-54), *Bacteroides fragilis* (Ju-1) と教室保育の *Sphaerophorus necrophorus* (W-12) を用いた。その 1 白金耳を PMDM 各濃度含有 GAM 寒天培地に接種, 37°C, 24 時間培養後, 最も高い濃度含有培地の発育菌の 1 白金耳を新しい PMDM 含有 GAM 寒天培地に移植する, いわゆる増量の継代法による耐性上昇試験によつた。

PMDM 接触前の自然耐性 mutants の population を Table 8 に示す。*Peptostreptococcus anaerobius* は  $1 \times 10^8$  コ中 0.39 mcg/ml で 1 コ, *Bacteroides fragilis* は  $3 \times 10^8$  コ中 1.56 mcg/ml で 1 コ検出できた。*Sphaerophorus necrophorus* は  $5 \times 10^8$  中 50 mcg/ml で 51 コ検出された。

Fig. 4 Development of resistance of strict anaerobes to propionylmaridomycin in vitro

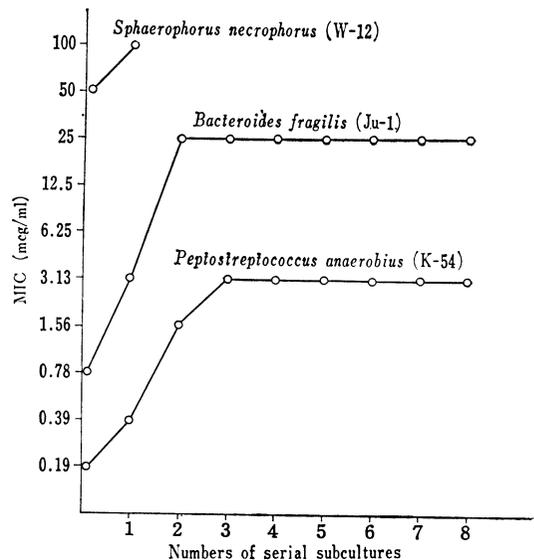


Table 8 Acquirement of spontaneous resistance to propionylmaridomycin

PMDM (mcg/ml)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (K-54)	<i>Bacteroides fragilis ss fragilis</i> (Ju-1)	<i>Sphaerophorus necrophorus</i> (W-12)
100	—	—	—
50	—	—	51
25	—	—	++
12.5	—	—	+++
6.25	—	—	+++
3.12	—	—	+++
1.56	—	1	+++
0.78	—	++	+++
0.39	1	+++	+++
0.19	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++
viable units	$1 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$5 \times 10^8$

耐性獲得実験の成績を Fig. 4 に示す。*Peptostreptococcus anaerobius* では 3 代継代で 3.13 mcg/ml に上昇し、その後は上昇しない。*Bacteroides fragilis* では 2 代継代で 25 mcg/ml と急速に上昇、その後は上昇しない。

3.13 mcg/ml に上昇した 8 代継代の *Peptostreptococcus anaerobius* の集落 9 コを無作為に釣菌し、GAM 半流動培地に 10 代継代後、PMDM 含有 GAM 寒天培地で耐性を調べた。9 コ全部が 3.13 mcg/ml であり、安定した耐性菌であった。

同様に、*Bacteroides fragilis* では 11 コ中 9 コが 25 mcg/ml に耐性、2 コが感受性であった。

#### おわりに

Propionylmaridomycin の嫌気性菌に対する抗菌作用を *in vitro* で検討した。グラム陽性球菌の *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, グラム陰性桿菌の *Bacteroides* に対し PMDM は強い抗菌作用を持つ。その MIC は 6.25 mcg/ml 以下であった。

これに反し、グラム陰性球菌の *Veillonella*, グラム陰性桿菌の *Sphaerophorus* (*Fusobacterium*) には propionylmaridomycin は弱い抗菌作用しかもたない。

Propionylmaridomycin に対する嫌気性菌の耐性獲得は本実験に供した *Peptostreptococcus anaerobius* (K-54), *Bacteroides fragilis* (Ju-1) においては弱く、8 代継代でそれぞれ、3.13 mcg/ml, 25 mcg/ml であつた。

*Bacteroides*, *Sphaerophorus* 鑑別に propionylmaridomycin は有用である。この点、今後検討を要する。

*In vivo* における propionylmaridomycin の抗菌作用は次の機会に報告する。

#### 文 献

- 1) 二宮敬字, 他: Chemotherapy 19: 106~110, 1971
- 2) 上野一恵: 国産 steel-wool 法による嫌気性培養による実際。メディアサークル No. 57: 1~7, 1964
- 3) 大谷文茂: 日本細菌学雑誌 25: 222~232, 1970
- 4) 上野一恵: 私信

ACTIVITY OF PROPIONYLMARIDOMYCIN ON STRICT  
ANAEROBIC BACTERIA

KEIU NINOMIYA, ETSUKO TANI, KUNITOMO WATANABE, TSUTOMU USHIZIMA,

KAZUE UENO and SHOICHIRO SUZUKI

Department of Bacteriology, Gifu University, School of Medicine

YASUO SHIMIZU, YOSHIHITO BAN, IZUMI MOU, KAZUTOSHI ISOGAI

and TSUNEO NISHIURA

Department of Urology, Gifu University, School of Medicine

Antibacterial activities of propionylmaridomycin and other macrolide antibiotics were investigated *in vitro*. Strains used are strict anaerobes isolated lately from clinical materials (*Peptococcus* 37 strains, *Peptostreptococcus* 14 strains, *Veillonella* 22 strains, *Bacteroides* 89 strains and *Fusobacterium* 47 strains).

Many strains of *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* and *Bacteroides* were inhibited by 12.5 mcg/ml of propionylmaridomycin, while concentrations as high as 500 mcg/ml of propionylmaridomycin were without antibacterial effect on *Fusobacterium* including *Sphaerophorus*.

Strains of *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* and *Bacteroides* were as sensitive to EM, LM, JM, SPM and mydecamycin as to propionylmaridomycin and more sensitive to LCM, CLM and RFP than it.

For the purpose of differentiating Genus *Bacteroides* from Genus *Fusobacterium*, the plate or disk containing 500 mcg/ml of propionylmaridomycin would be useful.