

Propionylmaridomycin の研究

真下啓明・加藤康道・斉藤 玲・矢島 戔

北海道大学医学部第二内科学教室

武田薬品工業株式会社で開発された macrolide 抗生物質である maridomycin は, leucomycin あるいは josamycin と同様 lactone 環は16員環であるが, 12, 13位に epoxide を有し, また3位および4'位の acyl 側鎖の相異により6種の component から成るが, このうちⅢが main component とされている。臨床的には9位が propionyl 化された propionylmaridomycin として試用されている。

今回, 以下のような検討を行なったので報告する。

実験方法と結果

1. 抗菌作用

教室保存の患者分離黄色ブドウ球菌, 大腸菌およびクレブシエラ菌株を用い, 日本化学療法学会標準法に従がい, Heart infusion (HI) 寒天培地を用いる希釈法でその最小阻止濃度を測定した。抗生剤は propionylmaridomycin (PMDM) およびその代謝物の1つである 4'-deacyl-propionylmaridomycin (PMDM-M), kitasamycin (LM) などを用いた

a) 黄色ブドウ球菌に対する抗菌力

黄色ブドウ球菌59株の PMDM, PMDM-M および LM に対する感受性をしらべた。

結果は Table 1 にしめた。MIC 値の累積分布をみると, PMDM では 1.6 mcg/ml にピークがあるが, LM では 0.8 mcg/ml にある。いずれも 3.2 mcg/ml 以下で 42/59 の株が阻止されている。代謝物である PMDM-M では 3.2 mcg/ml にピークがあり原物質にくらべて抗菌力は約 1/4 に低下した。PMDM, LM いずれの場合も 100 mcg/ml で阻止されない株が 17/59 に認められた。これらの値を相関図を用いて検討すると, PMDM と LM の間には交叉耐性が成立すると考えられる。

b) 培地 pH による抗菌力の差

上記の培地 pH を 7.2 および 8.4 に調整し, 同様に黄色ブ菌, 大腸菌およびクレブシエラの PMDM, PMDM-M および主成分である PMDM-Ⅲ (component Ⅲ) に対する感受性をしらべた。

結果は Table 2 のとおり, PMDM-M では pH 8.4 のほうが pH 7.2 にくらべ抗菌力の増強がみられたが, PMDM および component Ⅲ では両者に差は認められなかつた。大腸菌, クレブシエラに対してはいずれの培地でも 100 mcg/ml 以上であつた。

2. 試験管内代謝実験

PMDM の *in vitro* での代謝物を検討するため, thin layer chromatography による解析を試みた。

展開用の plate は silica gel (Merck G) で作製し展開溶媒系は benzene : acetone = 2 : 1 または 1 : 1 を用いた。展開後の発色は 1% chloroform iodine 液を用いた。Bioautography は 1% 枯草菌 PCI-219 芽胞浮遊液加 HI 寒天を plate 上に薄層とし, 37°C で培養して行なつた。

a) PMDM の各 component の bioautography

PMDM はその側鎖に結合する acyl 基の相異により6種の component から成るが, そのうち main component であるⅢ, およびⅠ, Ⅱ, Ⅳ, Ⅴの各 component の bioautography をおこなつた。結果は Fig. 1 のように, ⅠからⅤまで次第に Rf 値が小さくなる。また各 component の抗菌力を重層法で検討した。標準曲線は低濃度でややばらつきがみられるが, 100 mcg/ml でみると, PMDM を 100% としてⅠ~Ⅴの順に 60%, 80%, 100%, 100%, および 65% となる。

b) 血清および pH による変化

PMDM の main component であるⅢを pH 2.0 お

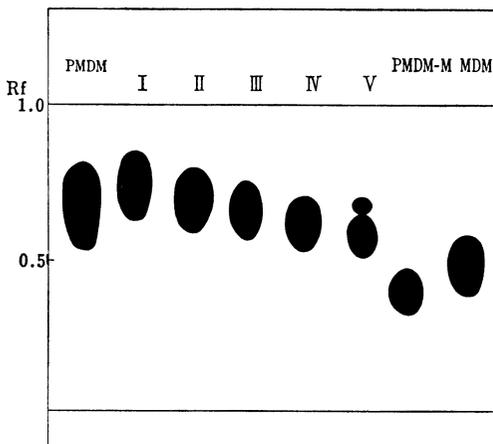
Table 1 Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to propionylmaridomycin, kitasamycin and PMDM-M

	(mcg/ml)										
	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	>100
Propionylmaridomycin		2	17	19	4						17
Kitasamycin	1	3	25	11	2						17
PMDM-M				6	23	12	2				16

Table 2 Influence of media's pH on susceptibility of bacteria to propionylmaridomycin and metabolite (mcg/ml)

Strain No.	PMDM		PMDM (III)		PMDM-M	
	pH 8.4	7.2	8.4	7.2	8.4	7.2
<i>S. aureus</i> 26	0.8	0.8	0.4	0.4	0.8	0.8
PC-G 3	1.6	1.6	0.4	0.8	3.2	6.3
sensitive 74	1.6	1.6	0.8	0.8	0.8	1.6
12	1.6	1.6	0.4	0.4	3.2	6.3
7	0.4	0.4	0.4	0.4	3.2	1.6
PC-G 21	0.4	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8
resistant 22	>100	>100	>100	>100	25	25
6	100	>100	"	"	>100	>100
<i>E. coli</i> 12	>100	>100	>100	>100	>100	>100
13	"	"	"	"	"	"
15	"	"	"	"	"	"
11	"	"	"	"	"	"
17	"	"	"	"	"	"
19	"	"	"	"	"	"
20	"	"	"	"	"	"
25	"	"	"	"	"	"
<i>Klebsiella</i> 27	>100	>100	>100	>100	>100	>100
16	"	"	"	"	"	"
29	"	"	"	"	"	"
28	"	"	"	"	"	"
<i>S. aureus</i> 209 P	0.4	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8
<i>E. coli</i> NIHJ	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Fig. 1



よび 8.0 の酢酸 buffer およびリン酸 buffer に 500 mcg/ml となるよう加え、37°C で 1 時間放置し、その 10 ml

を spot して展開後 bioautography をおこなった。結果は pH 8.0 では全く変化がないが、pH 2.0 では原点の部分に不明の代謝物が認められた。また同様に人血清として monitrol I を用いた場合、PMDM および PMDM-M を全く同じ条件で bioautography をおこなったが、いずれも変化はみられなかった。

次に同様に monitrol I およびラット血清に PMDM を 50 mcg/ml となるように加え、血清中の酵素活性を抑制するため acetone を等量に加えたものと、対照としてリン酸 buffer を加えたものにつき、ethylacetate で抽出し減圧乾固したものを methanol で再溶解し、同様に bioautography をおこなった。

結果は Fig. 2, 3 にしめた。血清非添加時には acetone 添加および buffer 添加とも標準品と全く差はないが、monitrol 添加後処理した場合は bioautography の spot がやや縮小した。しかし代謝物と考えられる spot は出現しなかった。これに反しラット血清添加後処理したものではいずれも代謝物と考えられる spot が

Fig. 2

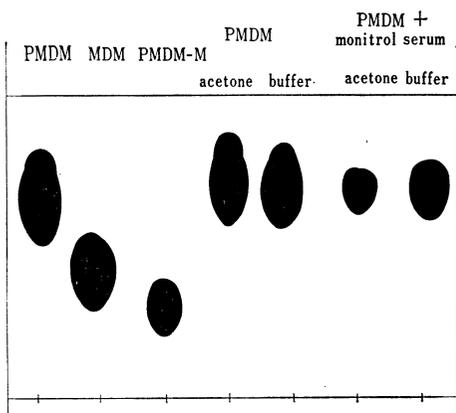
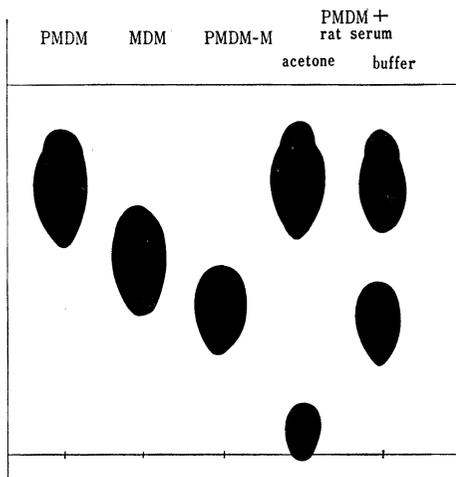


Fig. 3



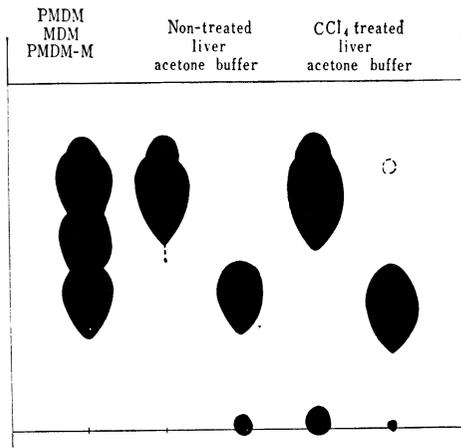
出現し、buffer だけの場合は PMDM-M の spot に一致した。

c) ラット肝エマルジョンによる変化

ラット肝を剔出し直ちに emulsion としたものに同量の PMDM 溶液および2倍量の acetone を加えて酵素活性を抑制したものと acetone の代りに buffer を加えたものとを 37°C, 30分間放置後遠心し、上清を ethyl-acetate で抽出し、減圧乾固したものをさらに methanol で再溶解し、定量的に spot して展開後、bioautography をおこなった。さらに四塩化炭素を筋注して肝脂肪変性をおこしたラットの肝を剔出して同様に処理した。

結果は Fig. 4 にしめた。四塩化炭素非処理ラット肝では acetone 添加時原物質だけで代謝物は出現しなかつたが、acetone 非添加では原物質はなく、PMDM-M と考えられる代謝物および原点に不明の代謝物が出現した。また四塩化炭素処理ラット肝でも acetone 処

Fig. 4



理では大部分が原物質として検出され、acetone 非添加では PMDM-M および一部不明の代謝物が認められた。

d) 人体液中の代謝物の検討

肝および著るしい腎障害のない症例に PMDM を 400 mg および 1,000 mg 投与しその尿および血液を採取し尿は 10 ml, 血液は 5 ml を ethyl acetate で抽出し減圧乾固後 methanol で再溶解し定量的に spot して展開後、bioautography をおこなった。

結果は Fig. 5, 6 にしめた。尿では 400 mg 投与例で2時間目に原物質および PMDM-M ならびに Rf 値の小さい不明の代謝物が認められたが、4時間では原点近くに不明の代謝物が検出されただけであつた。しかし 1,000 mg 投与例では検出された代謝物の pattern は大きく異なり、2時間目には原物質と原点に不明の代謝物がみられただけであつたが、4および6時間では少量の原

Fig. 5

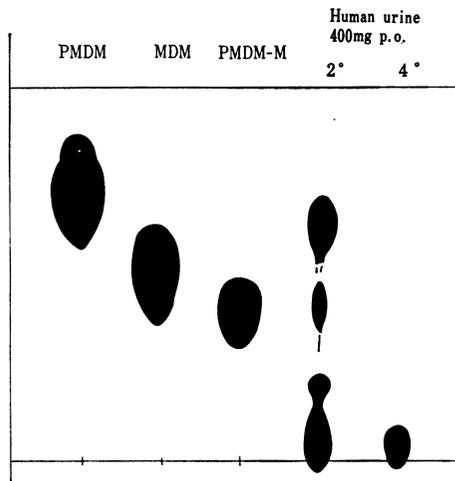
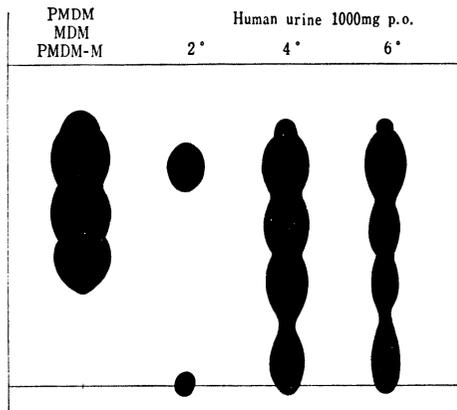


Fig. 6



物質のほか MDM, PMDM-M と考えられる代謝物に加えてさらに Rf 値の小さい不明の代謝物が検出された。いずれの場合も血液中からは抗菌活性を示す spot は認められなかった。参考のため尿中および血清中の抗菌力価を枯草菌 PCI 219 株によるカップ法で測定したが、400 mg 投与例では 2 時間目 16 mcg/ml, 4 時間目 <6 mcg/ml, 1,000 mg 例では 2, 4, 6 時間目にそれぞれ <4.0, 6.0, 6.0 mcg/ml であった。

血清中濃度はいずれも測定限界以下であった。

3. 血清蛋白との結合率

限外濾過法により PMDM および component III の monitrol I に対する蛋白結合率をしらべた。抗生剤濃度は 100 mcg/ml とし、濾液の抗菌力を溶連菌を用いる重層法で測定した。いずれも濾液中にはほとんど残存せず、結合率は90%以上の高い値をえた。

考案と総括

黄色ブドウ球菌に対する propionylmaridomycin の抗菌力は既存の16員環 macrolide 剤とほぼ同等であるとされている。本実験でも kitasamycin (LM) と大差がなく、また 100 mcg/ml 以上の耐性株は LM にも耐性であった。代謝物の1つである PMDM-M 抗菌力は、原物質の1/4~1/2に低下した。後述するような諸成績あるいは各研究機関の成績からも propionylmaridomycin は体内で主として PMDM-M などの代謝物として存在すると考えられるが、これは一般的に他の16員環 macrolide と共通の現象である。それ故、こういう場合にはこれらの代謝物に対する病原菌の感受性を検討しておくことが必要と考える。

一般に macrolide 抗生剤は pH の上昇とともに抗菌力が増大する。それ故、胆道感染症などの場合には胆汁中濃度の高いことと相まって抗菌作用の増大することが

考えられ、治療上有利であるとされている。Propionylmaridomycin の pH による抗菌力の変化をみたが、PMDM, component III, PMDM-M ともに著明な上昇はみられなかった、また gram 陰性桿菌にはいずれの場合も 100 mcg/ml 以上であった。

本物質の生体内代謝をしらべるため、まず *in vitro* の実験をおこなった。pH 2.0 では1時間で完全に变化するが、pH 8.0 では安定であった。またラット血清では代謝物の1つである PMDM-M に变化するが、この場合50%に acetone を添加するとこの変化が抑制された。これは血中代謝酵素を抑制するためと考えられる。Monitrol では変化がみられず、人血清中では比較的安定であると思われる。

Macrolide 剤の主要な代謝臓器は肝であるとされているが、ラット肝エマルジョン中では速やかに本物質は PMDM-M に变化した。この現象は通常ラット肝でも四塩化炭素処理による脂肪肝でも同様であり、脂肪変性時にはこの代謝酵素系は著明な影響をうけないと考える。これらの場合も acetone 添加によりこの変化を抑制し得た。武田薬品研究所での成績によると¹⁾、ラット胆汁中への排泄物はほとんどが代謝物であるが、*in vitro* の場合とはことなり、MDM および不明の代謝物が多く、PMDM-M は比較的すくないとのことである。この点 *in vivo* では代謝の様相がことなるのか、または肝細胞の active transport の差であるかは不明である。

本物質の組織内濃度については血中濃度は低いが、肺濃度はきわめて高く、その他の組織はこの中間にあるが、肝濃度だけは成績により一定せず、比較的高い報告と低い報告がみられる。教室のラットに 400 mg/kg 筋注時 1 時間目の値では血清 1.2 mcg/ml, 肺 21.6 mcg/ml で、肝と腎は測定限界以下であった。肝濃度の成績のばらつきについては種々の理由が考えられるが、詳細は不明である。

人に投与した場合の血中代謝物を検討したが、血中濃度が低くまた試料の量も少なかったため検出不能であった。尿では 1,000 mg と 400 mg 投与では検出された代謝物の pattern にかなり相異がみられたが、いずれも原物質は少量かほとんどなく、PMDM-M, MDM および不明の代謝物として検出された。人の尿、胆汁および血中の代謝物の pattern については原ら、石山ら、柴田ら、河盛らの成績によれば¹⁾、いずれも個体によりかなりの差がみられるようであり、また健常時と病態時の pattern の差も本質的なものか否か不明である。今後さらにこれらの点につき検討がすすめられることが期待される。

結 語

以上, propionylmaridomycin につき, 主として代謝の面から検討を加えた。代謝物の同定など研究面での制約のため, 十分な検討ができなかつたが, 人体液中に存在するのは主に代謝産物であることから, これらの薬剤を臨床的に使用する場合の抗菌力試験, 体液内濃度測定など基礎的研究の実施方式については, 原物質を用いて

おこなう従来の考え方をそのまま適用してよいか問題であり, 今後さらにより適正な方法とするため検討がすすめられる必要がある。

文 献

- 1) 大久保 滉: 第 20 回日本化学療法学会シンポジウム, propionylmaridomycin, 1972

LABORATORY STUDIES ON PROPIONYLMARIDOMYCIN

KEIMEI MASHIMO, YASUMICHI KATO, AKIRA SAITO and OSAMU YAZIMA
Second Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine

The laboratory investigation was carried out on propionylmaridomycin, a new macrolide antibiotic, and the results obtained are as follows;

1. In the susceptibility test of 59 strains of *Staphylococcus aureus* using plate dilution method, similar results were obtained from propionylmaridomycin and kitasamycin, and 70% of strains was distributed below 3.2 mcg/ml, although 30% was resistant to 100 mcg/ml of the antibiotics.

The antibacterial activity of a metabolite, 4''-deacyl-propionylmaridomycin was 1/2~1/4 of original substance.

The effect of alkalization of media was not prominent on the susceptibility of *S. aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* species.

2. The investigation of *in vitro* and *in vivo* metabolism of the substance was carried out using thin layer chromatography.

The degradation to 4''-deacyl-propionylmaridomycin following incubation with serum of the rat was demonstrated but not with Monitrol I.

The antibiotic was degraded by the acidification of solution but not by alkalization.

The antibiotic was changed to 4''-deacyl-propionylmaridomycin following incubation both with liver homogenate of healthy rat and with that of premedicated with carbon tetrachloride.

These changes were inhibited by pretreatment of liver homogenate with acetone.

In analysis of human urine, 4''-deacyl-propionylmaridomycin, maridomycin and other unknown metabolites were detected following oral medication.

3. In protein binding study of the substance, over 90% of binding rate was found with Monitrol I serum using ultrafiltration method.