

## 新カナマイシン DKB (3',4'-Dideoxykanamycin B) の抗菌作用

飯田 恭子・小池 聖淳

九州大学歯学部口腔細菌学教室

R因子による Kanamycin 耐性菌は Kanamycin 不活化酵素を産生し、そのうちの1つは3',4'の水酸基を磷酸化する Kanamycin 磷酸化酵素により、Kanamycin を不活化することが知られている。このことから、Kanamycin B の3',4'の水酸基を水素に置換することにより、この酵素による不活化を免れさせようとする目的で作製されたものが3',4'-Dideoxykanamycin B (DKB) である<sup>1)</sup>。この薬剤の抗菌スペクトラムはグラム陽性球菌からグラム陰性桿菌と非常に幅が広く、とくに各種抗生物質に抵抗性を示す *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* に著効を示すことが、われわれの成績も含めて第19回東日本化学療法学会シンポジウムにて発表された<sup>2)</sup>。さらにわれわれは、大腸菌、緑膿菌を用いて、この薬剤の抗菌作用の機序を調べた結果、この作用は殺菌的であり、きわめて早期にその作用を発現すること、および、この殺菌作用と併行して、これらの菌に重要な形態変化を与えることなどを明らかにした<sup>3)</sup>。今回はそれについての詳細な結果を報告すると同時に、化学構造もその骨格を同じくして、かつ抗菌スペクトラムも非常によく似ている Gentamicin (GM)<sup>4,5)</sup>と比較した結果もあわせて報告する。

## 実験材料ならびに方法

1) 使用菌株および抗生剤：大腸菌としては教室保存の *Escherichia coli* B, *E. coli* P 28, P 29 (東京大学医学研究所 本間遜博士から分与されたもの) を用いた。

DKB は明治製菓株式会社のもので、GM は塩野義製薬株式会社のもので用いた。

これらの薬剤は生理食塩水に 100  $\mu\text{g/ml}$  に、使用前に溶解され、stock solution とされた。

2) 薬剤の最少発育阻止濃度 (MIC) 測定法ならびに抗菌作用測定法

これらの菌株に対する MIC の測定は、化学療法学会が定める寒天稀釈法により、BHI寒天培地 (Difco 製) を用いて測定された。抗菌作用の測定には、これらの菌株の BHI-broth 中での対数増殖期中期 (Klett unit 90~100) にそれぞれの薬剤が最終濃度 10  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加され、添加直後 10分、20分、30分、60分、120分後に Klett type spectrophotometer (日本光電社製) にて、波長 660  $\mu\text{m}$  でその optical density が測定

されると同時に、培養液がそれらの時間毎に 0.1 ml ぬぎとられ、寒天平板法により生菌数が測定された。また対照としては、添加薬剤液と同量の生食水が同時期に培養液に加えられ、同様に optical density 生菌数が測定された。

## 3) 電子顕微鏡法

薬剤作用後 10分、30分、60分、120分に、これらの菌は KELLENBERGER-RYTER 1%  $\text{OsO}_4$  液にて法<sup>6)</sup>のとおり 16時間固定され、0.5% 醋酸ウラニール液にて2時間処理された。その後エタノール脱水、propylene oxide 置換を経て、Epon 812 にて包埋され<sup>7)</sup>、電子顕微鏡用試料とされた。これらの試料は Reichert UMO<sub>2</sub> 超マイクロームにより薄切され、0.4% クエン酸鉛にて電子染色され、日本電子 JEM 100 B にて観察された。

## 結 果

使用菌株に対する DKB, GM の MIC は Table 1 に示す、*E. coli* B, P 28, P 29 とともにこれらの薬剤に対しては高感受性である。

さらに、*E. coli* B, P 28 の対数増殖期にこれらの薬剤を加えると、optical density は 15分まではそのまま上昇するが、その後は上昇を完全に停止し、その後は非常に緩慢であるが下降を示し、120分後を見ると明らかに薬剤添加時の optical density より下方にある (Fig.

Table 1.

	<i>E. coli</i> B	P 28	P 29
DKB	3.1 $\mu\text{g/ml}$	0.75 $\mu\text{g/ml}$	0.38 $\mu\text{g/ml}$
GM	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.38 $\mu\text{g/ml}$	0.75 $\mu\text{g/ml}$

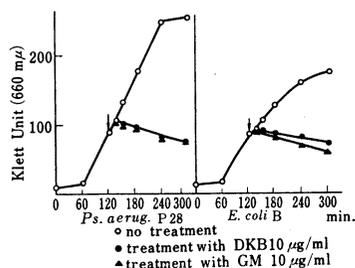
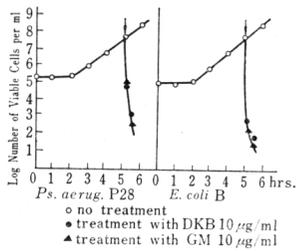
Fig. 1. Effect of DKB and GM on the growth of *Ps. aeruginosa* P 28 and *E. coli* B.

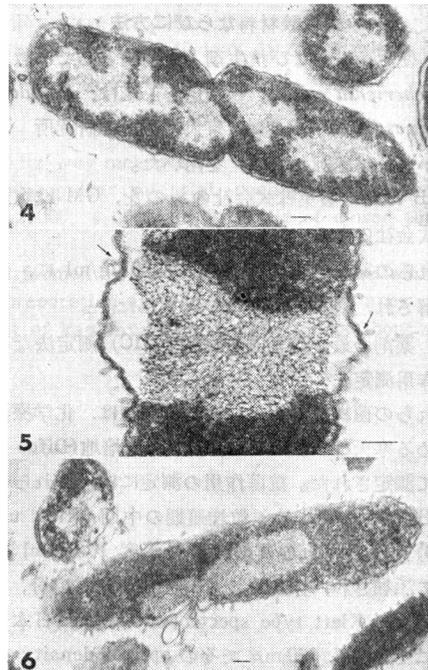
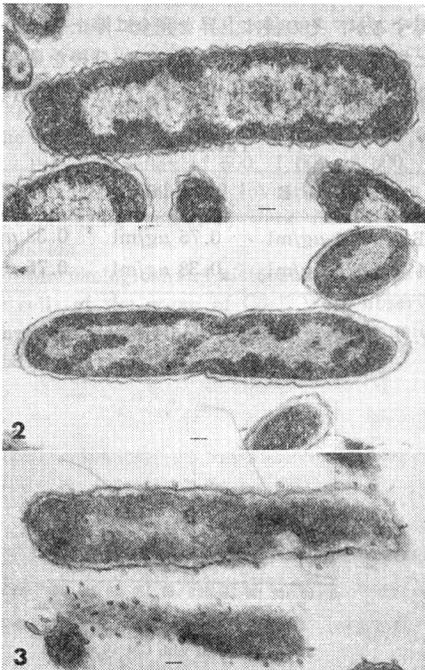
Fig. 2. Bactericidal effect of DKB and GM against *Ps. aeruginosa* P 28 and *E. coli* B.



- Photo. 1. Thin section of a normally growing cell of *E. coli* B. Markers represent 100 nm.
- Photo. 2. Thin section of a normally growing cell of *Ps. aeruginosa* P 28.
- Photo. 3. Thin section of *E. coli* B cell treated with 10 µg/ml of DKB for 30 min.
- Photo. 4. Thin section of *Ps. aeruginosa* P 28 cell treated with 10 µg/ml of DKB for 30 min.
- Photo. 5. A high magnification of *Ps. aeruginosa* P 29 cell treated with DKB for 120 min. Arrows show the blebs derive from the outer layer of the cell wall.
- Photo. 6. Lysis of *Ps. aeruginosa* P 29 cell treated with 10 µg/ml of DKB for 120 min.

1)。このことは徐々にではあるが、溶菌していることを示すと考えられる、また薬剤の P 28 の生菌数に与える影響を測定する実験では対数増殖期の生菌数  $5 \times 10^7/\text{ml}$  の時期に薬剤を加えられると DKB では 10 分後に約  $10^{-3}$ 、30 分で  $10^{-5}$  に生菌数が低下し、GM でも同様に生菌数が低下する。*E. coli* B では、10 分で  $10^{-5}$ 、30 分で  $10^{-6}$  に生菌数の低下がみられた (Fig. 2)。すなわち、両薬剤とも増殖期の菌に対しては 30 分で 99.9% 以上の菌を殺菌することが分つた。

以上のようにこれらの薬剤は *E. coli* B、および *Ps. aeruginosa* に対し激烈な作用をもつことが確められ、とくに optical density 曲線では落菌を思わせる結果が得られたことから、電子顕微鏡的形態学的裏付けを得ることが試みられた。Photo. 1 は *E. coli* B の対数増殖期、Photo. 2 は P 28 の対数増殖期の菌を示す。細胞壁は二重膜構造を示す外層とその内側の顆粒層からなり、いずれも外層は波動状を示す。原形質膜は同様に二重膜からなり、表面は平滑である。原形質内はリボゾームによって占められ、中央部にやや electron lucent な核部があり、核線維が存在する。これに薬剤を与えて 30 分後では、*E. coli* B (Photo. 3)、*Ps. aeruginosa* P 28 (Photo. 4)、P 29 細胞壁表面に露滴状に突起が生じ、その突起は細胞壁外層と連絡していることが示されている (Photo. 5 矢印)。また菌がその表面で tangential に薄切をうけると、細胞壁表面を電子顕微鏡的に観察することになるが、このような状態でも明らかにその突起を観察するこ



とが出来る (Photo. 3)。さらに *E. coli* B, P 29 では原形質は収縮し, 原形質膜も瘤状の突起を示してくる。このような変化は時間とともにはげしくなり, 120 分では, 菌は正常な桿菌状の外形を保つことが出来ず, 細胞壁は, 断裂はないが, 無数の突起によつておおわれる。原形質は不規則に収縮し, 原形質膜は部分的に消失し, 核線維と思われる線維状構造が直接 periplasmic space に露出し, 明らかに溶菌の像を示すようになる (Photo. 6)。

### 考 察

新抗生物質 DKB が GM と同様に非常に広い抗菌スペクトラムを持ち, とくに緑膿菌に対し数少ない有効な抗生剤であることが知られている。今回の実験においてこの薬剤の抗菌作用は GM と同様に殺菌作用であることが判明した。元来アミノ配糖体系抗生剤はストレプトマイシンを始めとして殺菌的に作用することが知られている<sup>9)</sup>。またこれら抗生物質の作用機序はストレプトマイシンを中心として, 蛋白合成系とくにリボゾームの機能構造に関連させて詳しい研究がなされているが<sup>9)</sup>, リボゾーム以外にも作用点をもっていることが明らかにされている。すなわち, これらの薬剤の構造中に含まれている cationic substance (streptomine) が菌側の anionic substance と結合し, その物質のもつ機能を失活させることである。DUBIN & DAVIS<sup>10)</sup> は SM が cell envelope に早期に損傷を与え, その結果, 菌体内  $K^+$  が菌体外に流出することを報告し, TZAGOLOFF & UMBREIT<sup>11)</sup> は nucleotide が流出することを明らかにしている。われわれが今回明らかにした DKB, GM による細胞壁ならびに原形質膜の変形は, DUBIN ら TZAGOLOFF らの生化学的結果と極めてよく一致し, これらの変形は細胞壁, 原形質膜中に多量に含まれている phospholipide とこれら薬剤とが結合し, これらの膜の分子配列に distortion をきたしたがために, 形態変化を招来し, また機能を消失したために, 菌体内内容を流

出させるに至つたと考えている。

### 文 献

- 1) UMEZAWA, H., UMEZAWA, S., TSUCHIYA, T. & OKAZAKI, Y.: 3', 4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *E. coli* and *Ps. aeruginosa*, *J. Antibiotics* **24**, 485 (1971)
- 2) 小酒井 望: 抗菌力, 第 19 回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム "DKB"
- 3) 小池聖淳, 永山在明, 飯田恭子, 中島幸一: 新抗生物質 Dideoxykanamycin B (DKB) の抗菌力, 第 20 回日本化学療法学会西日本支部総会
- 4) WEINSTEIN, M. J., LUEDEMANN, G. M., ODEN, E. M. & WAGMAN, G. H.: Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* **1**, 1963
- 5) BULGER, R. J., SIDELL, S. & KIRBY, W. M. M.: Laboratory and clinical studies of gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic. *Ann. Int. Med.* **59**, 593, 1963
- 6) KELLENBERGER, E., RYTER, A. & SÉCHAND, J.: Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleotides in different physiological state. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 671, 1958
- 7) LUFT, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 409, 1961
- 8) DUBIN, D. T., HANCOCK, R. & DAVIS, B. D.: The sequence of some effects of streptomycin in *Escherichia coli*. *Biochem. et Biophys. Acta* **74**, 476, 1963
- 9) PESTKA, S.: Inhibitors of ribosome functions. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**, 487, 1971
- 10) DUBIN, D. T. & DAVIS, B. D.: The effect of streptomycin on potassium flux in *Escherichia coli*. *Biochem. et Biophys. Acta* **52**, 400, 1961
- 11) TZAGOLOFF, H. & UMBREIT, W. W.: Influence of streptomycin on nucleotide excretion in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **85**, 49, 1963

## ANTIBACTERIAL EFFECTS OF DIDEOXYKANAMYCIN B ON GRAM NEGATIVE BACTERIA

KYOKO IIDA and MASAATSU KOIKE

Department of Microbiology, School of Dentistry, Kyushu University

Dideoxykanamycin B, a new aminoglycoside antibiotic showed the bactericidal effect on the gram-negative bacteria, as well as gentamicin. Short treatment of *Escherichia coli* B, *Pseudomonas aeruginosa* P 28 and P 29 with dideoxykanamycin B and gentamicin resulted in bleb-formation from the outer layer of the cell wall, and prolonged treatment caused lysis of the cells. These alterations may be interpreted that dideoxykanamycin B primarily acts to distort the molecular arrangement of the cell envelope.