

## 新らたに開発されたアミノ配糖体抗生物質の抗菌作用と耐性の機構について

川辺晴英・三橋 進・近藤捷嘉・新島端夫

微生物化学研究所・群大医学部微生物・岡山大医学部泌尿器科

(昭和 50 年 4 月 15 日受付)

新アミノ配糖体抗生物質 3', 4'-dideoxykanamycin B (DKB)<sup>1)</sup>, 6'-methyl-DKB(6-Me-DKB) が梅沢ら<sup>2)</sup>によつて、また amikacin(AK) が川口ら<sup>3)</sup>によつて開発された。これらの新抗生剤は、アミノ配糖体抗生物質を不活性にする酵素をもつほとんどの細菌に有効である。

今回、DKB の臨床的検討の際に得られた緑膿菌から DKB 耐性菌を選択し、それらに対する AK, 6-Me-DKB の抗菌力ならびに薬剤耐性機作について検討したので報告する。

## 実験方法

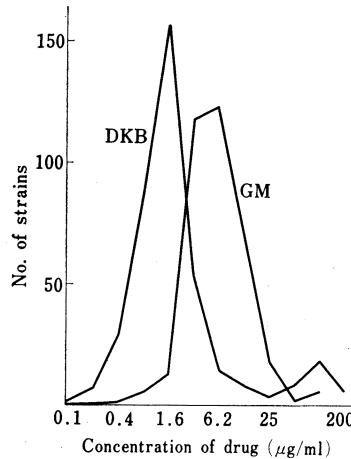
(1) 抗菌スペクトラム：臨床から分離された緑膿菌をペプトン水にうえ、18 時間培養し、その 100 倍希釈液 1 白金耳 ( $10^8$ /ml) を薬剤含有平板培地に接種し、37°C 18 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。なお、培地には Heart infusion(HI) 寒天培地(米研)を使用した。

(2) 使用薬剤：Kanamycin (KM), Streptomycin (SM), 3', 4'-dideoxykanamycin B (DKB) は明治製薬から分与をうけた。Tobramycin(TM) は Eli Lilly 社、gentamicin C complex(GM) はシオノギ製薬、gentamicin C<sub>1</sub> (GM-C<sub>1</sub>) は J. WEINSTEIN, amikacin (AK) はプリストル万有研究所、tetracycline (TC) は台糖ファイザー、Sulfisomidine(SA) は大日本製薬、6'-Me-DKB は梅沢純夫博士から、それぞれ分与をうけた。

(3) Acetyltransferase の調製と酵素活性の測定：菌体は medium B ( $Na_2HPO_4$ , 7 g :  $KH_2PO_4$ , 2 g :  $(NH_4)_2SO_4$ , 1.2 g :  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0.4 g : glucose, 2 g : ペプトン(米研), 10 g : yeast extract(Difco), 1 g : 精製水, 1,000 ml) で振盪培養し、遠心により集めた。Tris buffer (pH 6.0) で洗滌後、同じ buffer で菌体を懸濁し、音波処理 (20 KH<sub>2</sub>, 5 min.) 後、30,000×g 30 分、次いでその上澄を 105,000×g 30 分遠心し得られた上澄を粗酵素液として使用した。酵素活性は、ATP, CoA,  $Mg(CH_3COO)_2$  を加え、37°C で反応後、残存薬剤量を bioassay で測定した。<sup>14</sup>C-acetate の薬剤への取り込みは、phosphocellulose paper に反応液を吸着させ、遊離の isotope を洗浄後、トルエン系シンチレーターを加えて、測定した。

## 実験成績

## (1) 臨床分離緑膿菌に対する抗菌活性：臨床分離の

Fig. 1 MIC distribution of GM and DKB in *P. aeruginosa*Table 1 Minimum inhibitory concentrations of aminoglycoside antibiotics against *P. aeruginosa* (μg/ml)

Strain	KM	DKB	GM-C <sub>1</sub>	AK	6-Me-DKB
Ps. 4	200	50	50	3.1	100
Ps. 33	200	50	3.1	3.1	100
GN 315	100	100	3.1	25	3.1
GN 269	100	50	3.1	50	6.2

Table 2 Inactivation of DKB, 6-Me-DKB and AK by resistant strains of *P. aeruginosa*

Strain	Inactivation of		
	DKB	6-Me-DKB	AK
Ps. 4	+	+	-
ML 4344 R <sub>ms 167</sub> + (KM, DKB, GM, SM, SA) <sup>a)</sup>	+	+	-
GM 315	+	-	+
ML 4344 R <sub>ms 166</sub> + (KM, DKB, AK, GM, SA) <sup>a)</sup>	+	-	+
ML 4344	-	-	-

a) Two strains acquired drug resistance by conjugation in the experiment shown in Table 4.

緑膿菌 355 株に対するアミノ配糖体抗生剤の MIC を測定した。Fig. 1 に示すように、DKB の感受性分布は  $1.6 \mu\text{g}/\text{ml}$  にピークがあったが、GM は  $6.2 \sim 12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  に感受性のピークを示した。このことから緑膿菌に対して DKB は GM とともに極めてすぐれた抗菌作用を示すことが判明した。これら緑膿菌 355 株から DKB に耐性を示した *Ps. 4* と *Ps. 33* を選び、 $6'$ -N-acetylating enzyme をもつ GN 315, GN 269 を対照として、GM-C<sub>1</sub>, AK, 6-Me-DKB の抗菌力をみると、(DKB<sup>r</sup>, AK<sup>r</sup>, 6-Me-DKB<sup>s</sup>) と (DKB<sup>r</sup>, AK<sup>s</sup>, 6-Me-DKB<sup>r</sup>) の耐性型に分れた (Table 1)。

(2) 薬剤の不活性化: DKB, AK は  $6'$ -NH<sub>2</sub> 基をもつが、6-Me-DKB は C-6' のアミノ基にメチル基が入っている。従来、知られている  $6'$ -N-acetylating enzy-

me をもつ GN 315, GN 269 は 6-Me-DKB に感受性を示すことは考えられることである。しかし *Ps. 4*, *Ps. 33* は AK に感受性で 6-Me-DKB に耐性を示した。そこで次に、粗酵素液を調製して薬剤の不活性化を調べた (Table 2)。アミノ糖抗生剤に感受性の場合は、その薬剤の不活性化は全く認められず、耐性である時は薬剤の不活性化を認めた。これらの反応には、CoA が必要なこと、また、ATP, CoA は acetyl CoA におきかえられることから *Ps. 4* はアセチル化により薬剤を不活性化していると結論される。さらに  $^{14}\text{C}$ -acetate を用いて基質特異性を調べた (Table 3)。6-NH<sub>2</sub> 基を欠く KM-C, GM-C<sub>1</sub> には isotope のとりこみがなかった。しかし、AK は  $6'$ -NH<sub>2</sub> 基をもつにもかかわらず  $^{14}\text{C}$ -acetate のとりこみがみられなかった。

(3) 耐性遺伝子の存在場所: これらアミノ配糖体抗生剤の耐性を支配する遺伝子が伝達性 plasmid 上に存在するか否かを調べた。Table 4 に示したように  $6'$ -N-acetyltransferase をもつ GN 315, GN 269 では (KM, DKB, AK, GM, SA) 耐性が伝達した。この GM 伝性は低く (MIC  $3.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、GM-C<sub>1a</sub>, -C<sub>2</sub> が  $6'$ -N-acetylating enzyme により不活性化をうけている。また、KM, DKB, AK, GM 耐性を支配する遺伝子は同一の酵素によるものである。*Ps. 4* は (KM, DKB, GM, SM, SA) 耐性が、*Ps. 33* は (KM, DKB, TC, CM, SM, SA) 耐性が伝達した。従がって、これらの薬剤耐性を支配する遺伝子は、R 因子上に存在する。

(4) 不活性化された DKB の構造: 粗酵素液を用いて

Table 3 Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetic acid into various aminoglycoside antibiotics and their inactivation by *Ps. 4*

Antibiotic	Inactivation (%)	Incorporation of $^{14}\text{C}$ -acetic acid into the drugs (cpm)
KM-A	98	4,100
KM-C	0	105
AK	0	42
DKB	91	2,550
6-Me-DKB	80	2,549
6-Me-KM	97	4,680
GM-C <sub>1</sub>	0	0

The S-105 fraction was prepared from *Ps. 4*.

Table 4 Conjugal transfer of drug resistance in *P. aeruginosa*

Donor	Recipient	Selective drug	Transfer frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Resistance pattern of exconjugants
<i>Ps. 4</i>	ML 4561	DKB	3	(KM, DKB, GM, SM, SA)
ML 4561 R <sub>ms 167</sub> +	ML 4344	GM	4	"
(KM, DKB, GM, SM, SA)		DKB	9	"
		GM	5	"
<i>Ps. 33</i>	ML 4561	DKB	0.04	(KM, DKB, TC, CM, SM, SA)
ML 4561 R <sub>ms 168</sub> +	ML 4344	DKB	0.2	"
(KM, DKB, TC, CM, SM, SA)				
GN 315	ML 4561	DKB	4	(KM, DKB, AK, GM, SA)
		AK	2	"
ML 4561 R <sub>ms 166</sub> +	ML 4344	DKB	3	"
(KM, DKB, AK, GM, SA)		AK	3	"
GN 269	ML 4561	DKB	1	(KM, DKB, AK, GM, SA)
		AK	1	"
ML 4561 R <sub>ms 179</sub> +	ML 4344	DKB	0.7	"
(KM, DKB, AK, GM, SA)		AK	0.4	"

不活化 DKB を得た。得られた不活化 DKB は Amberlite CG 50( $\text{NH}_4^+$ form) カラムで精製した。この不活化 DKB の構造は近藤(微化研)により、C-6' のアミノ基に酢酸が入っていることから明らかにされた。

### 討 論

薬剤耐性菌の遺伝学的研究および耐性機構の生化学的研究によって、DKB, AK などのすぐれた薬剤が開発され、すでに三橋ら<sup>4,5)</sup>によって発表されたように、緑膿菌にも極めて有効で、KM 耐性菌にもすぐれた抗菌力を示すことが明らかにされている。たまたま DKB の基礎的研究の際、極めて稀ではあったが、DKB 耐性菌が検出された。これまでの調査では、緑膿菌には KM を acetyl 化することによって耐性化している菌 (KM<sup>r</sup>) は極めて多い。GM の普及によって、KM と GM をともに acetyl 化する菌 (KM<sup>r</sup>, GM<sup>r</sup>) が出現した。これらの菌に対し DKB は有効である。しかし今回 (KM, GM, DKB) をともに acetyl 化する菌 (KM<sup>r</sup>, GM<sup>r</sup>, DKB<sup>r</sup>) が発見された。これらの菌が DKB 使用前に分離されることから、緑膿菌を含め、病巣菌の中には、かなり幅広く、多くのアミノ配糖体抗生素を acetyl 化できる菌が存在していることを示している。DKB の使用によって、このような菌が選択され、病院内管理の不手際でこの菌が他の患者への感染、仮りに定着しなくとも、この菌のもつ R 因子が、感染患者の緑膿菌に伝達される可能性は大である。新薬の開発が重要であることはもちろんであるが、その新薬の寿命を長くして有効性を持続するためには、耐性菌の遺伝学的性状を知って、その伝播を阻止することは、次の大きい課題と考えられる。

### 結 論

- 新らに開発された DKB, AK は緑膿菌に対し極めて有効である。
- DKB の使用前に分離された緑膿菌から、KM,

GM, DKB 耐性菌が検出された。

- この菌の SM, KM, GM, DKB 耐性は R 因子上にあることが判明した。
- KM, GM, DKB 耐性の機構は 6'-NH<sub>2</sub> の acetyl 化によることが結論された。

本研究の遂行に、梅沢浜夫博士の指導を頂いた。また不活化物の最終的な構造決定は微化研 近藤博士によった。ここに謝意を表する。

### 文 献

- UMEZAWA, H.; S. UMEZAWA, T. TSUCHIYA & Y. OKAZAKI: 3', 4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiotics* 24: 485~487, 1971
- UMEZAWA, H.; Y. NISHIMURA, T. TSUCHIYA & S. UMEZAWA: Synthesis of 6'-N-methylkanamycin and 3', 4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B active against resistant strains having 6'-N-acetylating enzymes. *J. Antibiotics* 25: 743~745, 1972
- KAWAGUCHI, H.; T. NAITO, S. NAKAGAWA & K. FUJISAWA: BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiotics* 25: 695~708, 1972
- mitsuhashi, S. & H. KAWABE: Comparative studies of antibacterial activity of various aminoglycoside antibiotics. Second International Symposium on Antibiotic Resistance: Drug-inactivating Enzymes and Other Problems of Resistant Bacteria. Czechoslovakia, June 1974 (in press)
- mitsuhashi, S.: Epidemiology and genetics of aminoglycoside antibiotics resistance in pathogenic bacteria. in MITSUHASHI Drug action and drug resistance in bacteria. II. Aminoglycoside antibiotics, pp. 175~203. University of Tokyo Press, Tokyo, 1975

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF DKB AND MECHANISM OF ITS RESISTANCE AGAINST *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA*

HARUHIDE KAWABE, SUSUMU MITSUHASHI, KATSUYOSHI KONDO  
and TADAO NIIZIMA

Institute of Microbial Chemistry, Department of Microbiology,

School of Medicine, Gunma University, and

Department of Urology, School of Medicine, Okayama University

We compared the antibacterial activity of DKB (3', 4'-dideoxykanamycin B) and that of gentamicin on 355 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, and the mechanism of resistance to DKB was studied.

- 1) The newly introduced semisynthetic aminoglycoside antibiotics, *i. e.*, 3',4'-dideoxykanamycin B(DKB), 6'-N-methyl DKB(6'-Me-DKB) and amikacin have been found to be effective against *Pseudomonas aeruginosa* which are resistant to the known aminoglycoside antibiotics.
- 2) DKB resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from clinical specimens before DKB was used.
- 3) The strain resistant to DKB and 6'-Me-DKB disclosed that the enzyme catalyzing inactivation of both DKB and 6'-Me-DKB was mediated by an R factor.
- 4) Enzymatic studies of inactivation reaction and chemical studies of the inactivated products indicated that DKB and 6'-Me-DKB were inactivated by acetylation of the 6' amino group of the drugs.