

新しいアミノ配糖体系抗生物質 HAPA-B の細菌学的研究

横井山繁行・鳥屋 実・諸星 俊郎・尻谷 善則
高島 明子・早野 和夫

東洋醸造株式会社リサーチセンター

五島遼智子・辻 明良

東邦大学医学部微生物学教室

新しいアミノ配糖体系抗生物質 HAPA-B の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用を Amikacin, Gentamicin, Dibekacin, Tobramycin と比較検討し、次の結果を得た。

HAPA-B はグラム陽性菌、グラム陰性菌に対し広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を示した。特に *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* などのグラム陰性菌に対し強い抗菌力を有していた。

HAPA-B はアミノ配糖体系抗生物質耐性菌の多くに感受性を示した。また、HAPA-B の抗菌作用は殺菌的であり、その殺菌力は Amikacin より強力であった。

マウス感染実験に対し HAPA-B は *in vitro* 抗菌力と同様に優れた治療効果を示した。また、Amikacin を含むアミノ配糖体系抗生物質耐性菌の感染にも優れた治療効果を認めた。

マウス血漿中濃度では HAPA-B は Amikacin とほぼ同様のピーク値を示した。

HAPA-B は米国シエリング社により創製され、東洋醸造株式会社とエッセクス日本㈱により共同開発された新しいアミノ配糖体系抗生物質である。本物質は Gentamicin B の 1 位のアミノ基に hydroxyaminopropionyl 基を化学的に導入したもので、その化学構造式を Fig. 1 に示した。HAPA-B はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトラムを有し、各種アミノ配糖体系抗生物質の耐性菌に対し有効であることが報告されている^{1,2,3,4)}。

今回、HAPA-B の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を同系統

の Amikacin, Gentamicin, Dibekacin, Tobramycin と比較検討したので、その実験成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

研究室保存株および近年臨床材料から分離された各種グラム陽性菌およびグラム陰性菌を用いた。

2. 薬 剤

HAPA-B (東洋醸造)

Amikacin (AMK, 万有製薬)

Gentamicin (GM, エッセクス日本)

Dibekacin (DKB, 明治製薬)

Tobramycin (TOB, 塩野義製薬)

3. 薬剤感受性 (MIC) 測定法

日本化学療法学会感受性測定法に準じた^{5,6)}。

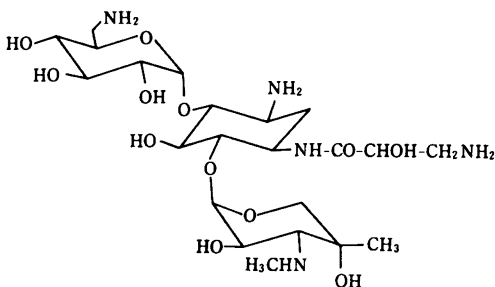
4. 殺菌作用

殺菌作用は以下の 3 通りの方法で AMK, GM と比較した。

1) 最小殺菌濃度 (MBC)

E. coli, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* および *P. aeruginosa* 各 20 株を試験菌として Broth dilution 法により MBC を求めた。Antibiotic medium 3 (ABM 3, Difco) で 2 倍希釈した薬剤希釈系列

Fig. 1 Chemical structure of HAPA-B



1-N-[(2S)-3-Amino-2-hydroxypropionyl]-4-O-(6-amino-6-deoxy- α -D-glucopyranosyl)-6-O-[3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)- β -L-arabinopyranosyl]-2-deoxystreptamine

に試験菌を接種し (10^8 cfu/ml), 37°C, 18時間培養した。肉眼観察で菌の発育がみられない最小薬剤濃度を MIC とした。発育がみられない Tube の broth 各 5 μ l をとり, 薬剤を含まない Heart infusion agar (HIA, Difco) に塗布し, 37°C, 18時間培養後, 肉眼的に菌の発育がみられない最小薬剤濃度を MBC とした。

2) 増殖曲線に及ぼす影響

E. coli 145, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *C. freundii* GN 346 および *P. aeruginosa* IAM 1095 を試験菌とし, ABM 3 で 37°C, 18時間培養した菌液を新しい ABM 3 で希釈し, 37°C, 2時間振盪培養を行なった後に薬剤を添加し, 経時的に生菌数を測定した。

3) 混合菌培養の増殖曲線に及ぼす影響 *E. coli* NIHJ JC-2 と GM, AMK 耐性の *S. marcescens* 1165 を試験菌として, Heart Infusion Broth (HIB, Difco) で 37°C, 18時間培養した菌液を両者同時に薬剤を含む HIB に接種し, 以下, 上記の方法に従って生菌数を測定した。生菌数測定は *E. coli* NIHJ JC-2 では MacConkey 寒天 (栄研) を, *S. marcescens* 1165 では DNA 寒天 (日水製薬) に 10 μ g/

ml の Cephalexin を加えたものを使用した。

5. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

培地 pH, 接種菌量, 血清添加および培地種類の影響を *E. coli* W 3630, *S. marcescens* TL-1, *P. aeruginosa* IAM 1095 を試験菌として MIC 値の変動により検討した。

6. 無細胞蛋白合成系の調整

E. coli Q-13 (RNase I⁻) を使用した無細胞蛋白合成系の調整は NIRENBERG⁷⁾, 諸星⁸⁾の方法に従って行なった。

7. マウス実験感染に対する治療効果

マウス実験的感染症に対する治療効果は以下の4通りの方法で AMK, GM と比較検討した。

1) マウス全身感染における治療効果

マウスは Slc : ICR 系, 雄, 4週令, 1群 10匹を用いた。*E. coli* W 3630, *S. marcescens* TL-1, *P. aeruginosa* IAM 1095 を試験菌として 5%ムチン (Bacto mucin, Difco) 液に懸濁し, 最小致死菌量を腹腔内接種した。薬剤は感染1時間後に1回, 筋肉内投与した。感染7日後のマウス生存数より Van der Waerden 法により ED₅₀ (mg/kg) を求め

Table 1 Antibacterial spectrum Gram positive and negative aerobic bacteria

Test strains	MIC (μ g/ml)				10 ⁸ cfu/ml
	HAPA-B	AMK	GM	DKB	TOB
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	1.56	1.56	0.39	0.39	0.20
<i>S. epidermidis</i> sp-al-1	0.78	0.78	0.20	0.20	0.10
<i>S. pyogenes</i> N. Y. 5	50	50	6.25	25	12.5
<i>S. faecalis</i> 1501	>100	>100	25	50	12.5
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	1.56	3.13	0.78	6.25	6.25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.20	0.05	0.10	\leq 0.05
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39
<i>E. coli</i> W 3630	0.10	0.39	0.10	0.20	0.20
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.39	0.78	0.39	0.39	0.39
<i>C. freundii</i> GN 346	0.39	0.78	0.39	1.56	0.78
<i>S. paratyphi</i> AH 901	0.20	0.39	0.10	0.20	0.10
<i>S. enteritidis</i> Gaertner	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39
<i>S. flexneri</i> 638-66	3.13	3.13	1.56	1.56	0.78
<i>S. sonnei</i> E 33	0.78	1.56	0.78	0.78	0.78
<i>P. morgani</i> 0239	1.56	0.78	0.39	0.78	0.39
<i>P. rettgeri</i> ACR	1.56	1.56	0.39	0.39	0.39
<i>P. vulgaris</i> OX 19	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78
<i>E. aerogenes</i> 0655	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39
<i>E. cloacae</i> GN 336	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39
<i>S. marcescens</i> TL-1	1.56	3.13	0.78	12.5	6.25
<i>S. marcescens</i> 37-203	3.13	25	1.56	100	50
<i>S. marcescens</i> 1165	6.25	25	50	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> ML 4561	3.13	3.13	1.56	0.78	0.39
<i>P. aeruginosa</i> 2512	0.78	0.78	6.25	50	12.5
<i>P. putida</i> 1842	3.13	1.56	100	>100	25
<i>P. maltophilia</i> 1850	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. cepacia</i> 2622	25	25	25	25	12.5
<i>P. putrefaciens</i> 2658	0.39	1.56	0.39	0.78	0.78
<i>A. calcoaceticus</i> 2685	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>A. xylooxidans</i> 2690	>100	>100	>100	>100	>100

た。

2) 混合菌全身感染における治療効果

マウスは上記と同じものを1群8匹用いた。*E. coli* NIHJ JC-2とGM, AMK 耐性の *S. marcescens* 1165を試験菌とし、両菌液を同時に5%ムチン液に懸濁して腹腔内接種した。以下上記の方法に準じてED₅₀を求めた。また、死亡マウスの心血培養を行なった。

3) 噴霧菌吸入感染における治療効果

K. pneumoniae B 54と *P. aeruginosa* No. 15を試験菌として用いた。*K. pneumoniae* B 54感染には上記と同じマウス1群10匹を用いた。菌接種は吸入感染実験装置(CIS型, 日本クレア)を用いて最小致死菌量を吸入させた。薬剤は感染2, 5, 8時間後の3回, 筋肉内投与した。*P. aeruginosa* No. 15の場合は, 感染4日前にCyclophosphamide(エンドキサン, 塩野義製薬)4mgを腹腔内投与したマウス1群10匹を用いた。薬剤は感染1, 4時間後の2回筋肉内投与した。マウス生存数よりED₅₀を求めた。

4) 上行性尿路感染における治療効果

マウスはSlc:ICR系, 雌, 5週令, 1群5匹を用いた。*P. aeruginosa* 0844を試験菌とし, NISHI⁹⁾, 大森ら¹⁰⁾の方法に準じて上行性尿路感染モデルで検討した。薬剤は感染翌日から1日2回, 連続5日間, 筋肉内投与した。薬剤最

終投与24時間後に腎内生菌数を測定し, 生菌数が 1×10^2 cfu/g以下となったマウスを完全治癒とし, ED₅₀を求めた。

8. マウス血漿中濃度

マウスは全身感染と同じ条件のものを1群4匹用いた。薬剤を筋肉内投与した後, 各マウス毎に心採血した血漿中の薬剤濃度を *B. subtilis* ATCC 6633を検定菌とするペーパーディスク法で測定した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトラム

HAPA-Bの標準菌株に対する抗菌力をAMK, GM, DKB, TOBと比較した成績をTable 1, 2に示した。HAPA-Bは既存のアミノ配糖体系抗生物質と同様にグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して強い抗菌力を示した。グラム陽性菌に対しHAPA-BはAMKとほぼ同等のMICを示したが, グラム陰性菌の多くではHAPA-BのMICはAMKの1/2でGMに匹敵する強い抗菌力を示した。嫌気性菌に対する抗菌作用はAMK, GM, DKBと同様にほとんど認められなかった。

2. 臨床分離株における感受性分布

Table 2 Antibacterial spectrum Gram positive and negative anaerobic bacteria

Test strains	MIC(μ g/ml) 10^6 cfu/ml			
	HAPA-B	AMK	GM	DKB
<i>P. asaccharolyticus</i> PL-4-1	>100	>100	>100	>100
<i>P. saccharolyticus</i> ATCC-14953	100	25	3.1	12.5
<i>P. magnus</i> ATCC-14956	50	50	25	50
<i>Ps. anaerobius</i> GAI-1160	>100	>100	100	>100
<i>Pr. acnes</i> ATCC-11828	100	100	50	>100
<i>E. aerofaciens</i> ATCC-25986	>100	>100	50	100
<i>E. lentum</i> GAI-1515	12.5	12.5	6.3	6.3
<i>E. limosum</i> E-531	>100	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> ATCC-25285	>100	>100	>100	>100
<i>B. fragilis</i> 2552	>100	>100	>100	>100
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC-29742	>100	>100	>100	>100
<i>B. ovatus</i> Ju-26-1	>100	>100	>100	>100
<i>B. distasonis</i> Ju-11-1	>100	>100	>100	>100
<i>B. vulgatus</i> 4741	>100	>100	>100	>100
<i>B. asaccharolyticus</i> GAI-0415	>100	>100	>100	>100
<i>B. melaninogenicus</i> ss. <i>intermedius</i> GAI-0416	100	12.5	100	50
<i>B. bivius</i> GAI-0642	>100	>100	>100	>100
<i>F. nucleatum</i> GAI-0462	>100	>100	>100	>100
<i>F. varium</i> ATCC-8501	>100	>100	>100	>100
<i>F. necrophorum</i> GAI-0467	>100	>100	>100	>100
<i>V. parvula</i> GAI-0580	12.5	12.5	12.5	25
<i>C. sporogenes</i> GAI-0005	>100	>100	>100	>100
<i>C. perfringens</i> GAI-0084	>100	>100	>100	>100
<i>C. ramosum</i> GAI-2560	>100	>100	100	>100
<i>C. bifermentans</i> GAI-0209	>100	>100	100	100
<i>C. sordellii</i> GAI-0029	>100	>100	>100	>100

Fig. 2 Susceptibility of *S. aureus* (54 strains)

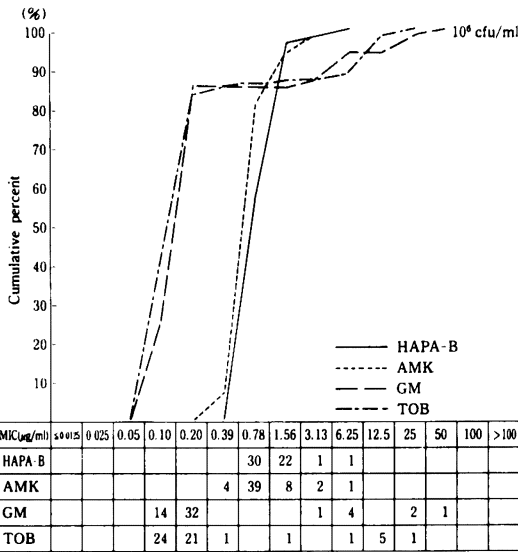


Fig. 3 Susceptibility of *S. epidermidis* (19 strains)

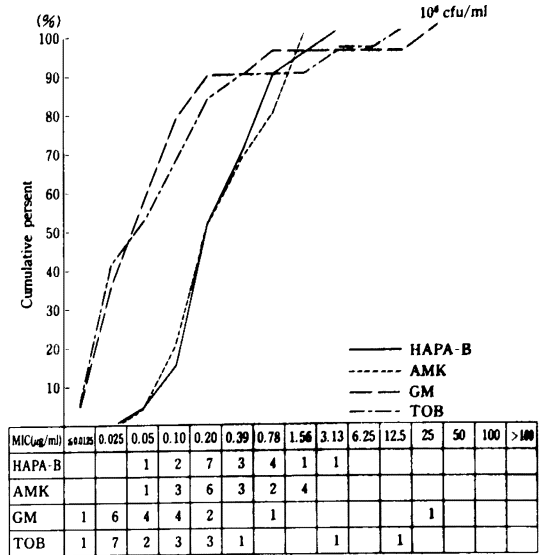


Fig. 4 Susceptibility of *E. coli* (143 strains)

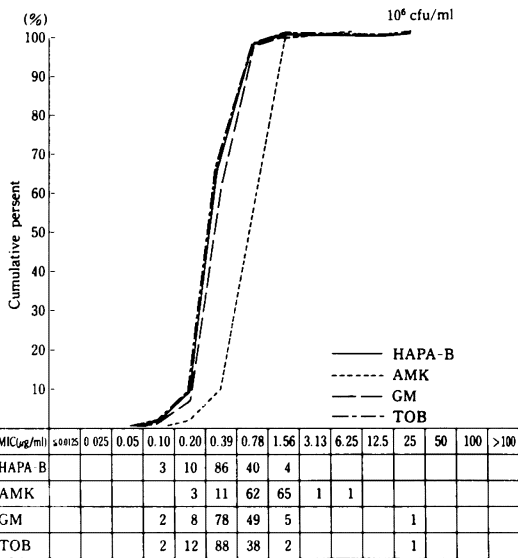
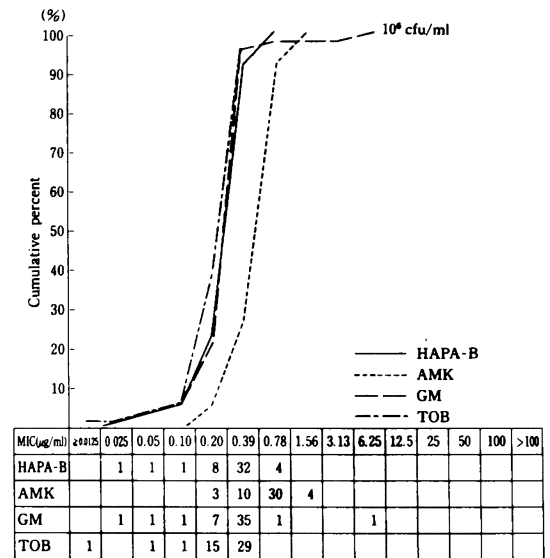


Fig. 5 Susceptibility of *K. pneumoniae* (47 strains)



臨床分離株に対する HAPA-B の MIC を累積分布表によって Fig. 2 ~ 15 に示した。また、各菌種の試験菌の 50% 及び 90% の発育を阻止する薬剤濃度 (MIC₅₀, MIC₉₀) をまとめて Fig. 16 に示した。

S. aureus の場合、HAPA-B の抗菌力は GM, TOB より弱い AMK と同程度で、その感受性ピークは 0.78 μg/ml, MIC₉₀ は 1.56 μg/ml で鋭い感受性曲線を示した。

S. epidermidis では HAPA-B の MIC₉₀ は 0.78 μg/ml で、AMK とほぼ同じ感受性分布であった。

E. coli と *K. pneumoniae* において、HAPA-B の MIC₉₀ は 0.78, 0.39 μg/ml で、GM, TOB とほぼ同じ感受性曲線を示し、AMK より 2 倍優れた抗菌力が認められた。

C. freundii に対し HAPA-B の MIC₉₀ は 6.25 μg/ml, AMK, GM, TOB は 25 μg/ml で HAPA-B が最も強い抗

Fig. 6 Susceptibility of *C. freundii* (28 strains)

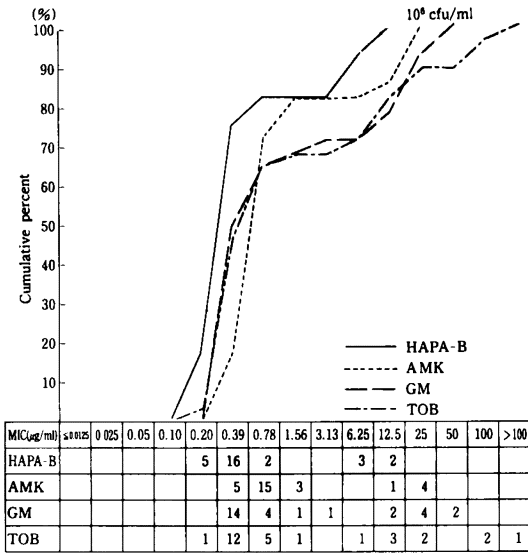


Fig. 7 Susceptibility of *E. cloacae* (13 strains)

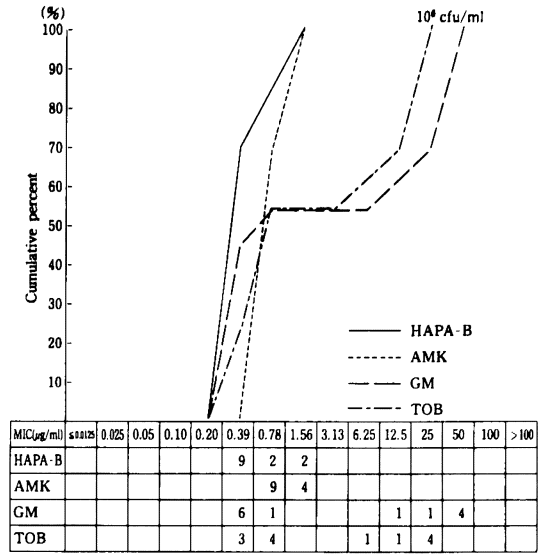


Fig. 8 Susceptibility of *P. mirabilis* (37 strains)

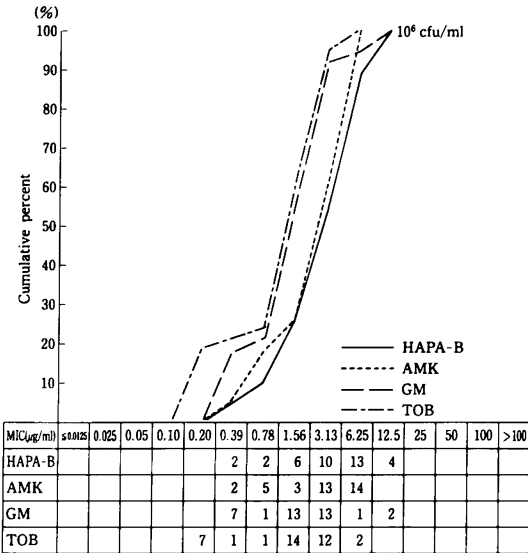
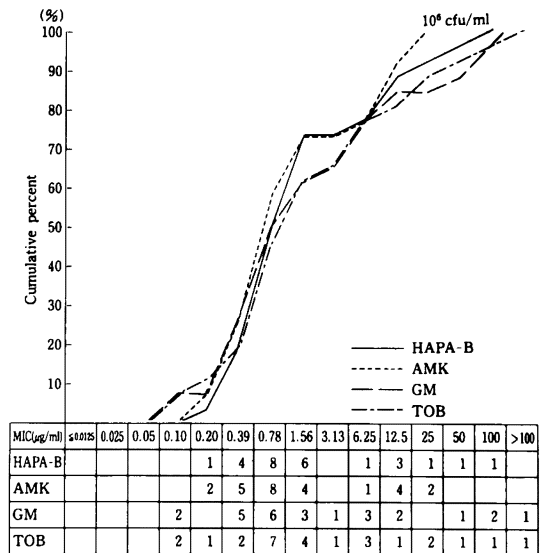


Fig. 9 Susceptibility of *P. vulgaris* (26 strains)



菌を示した。

E. cloacae では HAPA-B の抗菌力は AMK, GM, TOB より強く, MIC は 0.39 ~ 1.56 μg/ml の範囲に分布した。また, GM, TOB 耐性株にも強い抗菌力を示した。

P. mirabilis の場合, HAPA-B の感受性分布は AMK と同程度で, GM, TOB より若干劣っていた。

P. vulgaris, *P. rettgeri*, *P.morganii* において HAPA-

B, AMK, GM, TOB はいずれも同程度の強い抗菌力が認められた。

S.marcescens では HAPA-B の抗菌力が最も強く, HAPA-B の MIC₉₀ は 12.5 μg/ml であったが, AMK, GM, TOB はいずれも 25 μg/ml 以上であった。

P. aeruginosa に対しては, HAPA-B は AMK と同程度の感受性分布を示した。

Fig. 10 Susceptibility of *P. rettgeri* (12 strains)

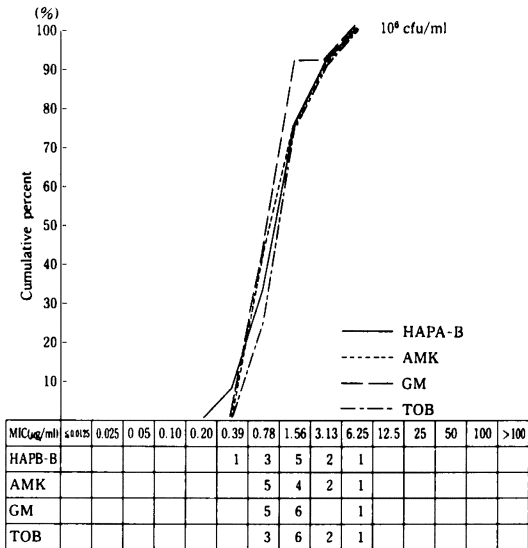


Fig. 11 Susceptibility of *P. morganii* (33 strains)

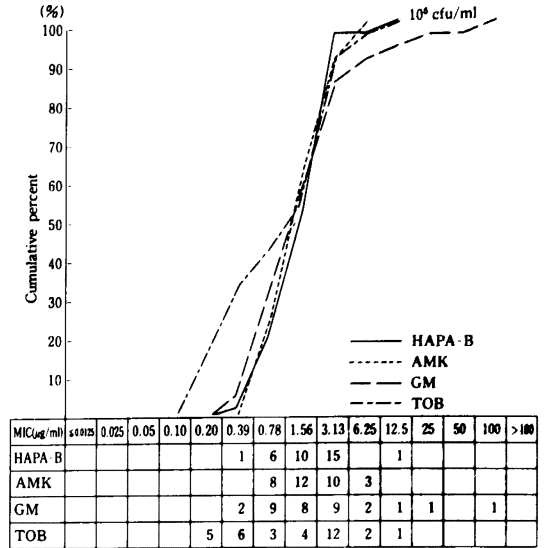


Fig. 12 Susceptibility of *S. marcescens* (79 strains)

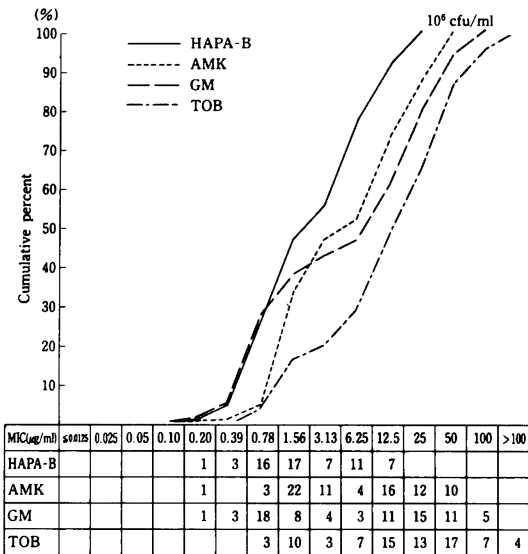
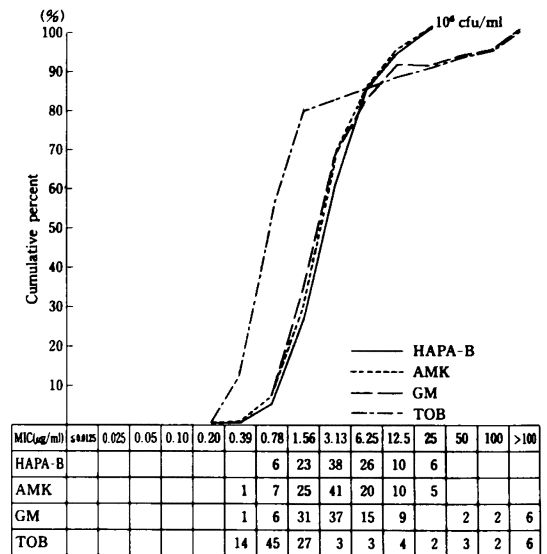


Fig. 13 Susceptibility of *P. aeruginosa* (109 strains)



GM 耐性 *S. marcescens* (41 株) の 75.6% は HAPA-B に感受性を示し、HAPA-B は AMK より 2 倍強い抗菌力を示した。TOB の感受性分布は 1 株を除き 25 μg/ml 以上であった。

GM 耐性 *P. aeruginosa* (30 株) の 86.7% は HAPA-B 感受性で、HAPA-B は AMK と同じ感受性分布を示した。TOB は 1 株を除き 25 μg/ml 以上であった。

さらに、MIC₉₀ で比較すると、*S. epidermidis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* を除く菌種において、HAPA-B の抗菌力は AMK, GM, TOB より強く、MIC₉₀ が 25 μg/ml を越える菌種は見られなかった。

3. 耐性パターン

S. marcescens, *P. aeruginosa* において、HAPA-B, AMK, GM, DKB, TOB いずれかの MIC が 25 μg/ml 以

Fig. 14 Susceptibility of GM^r *S. marcescens* (41 strains)

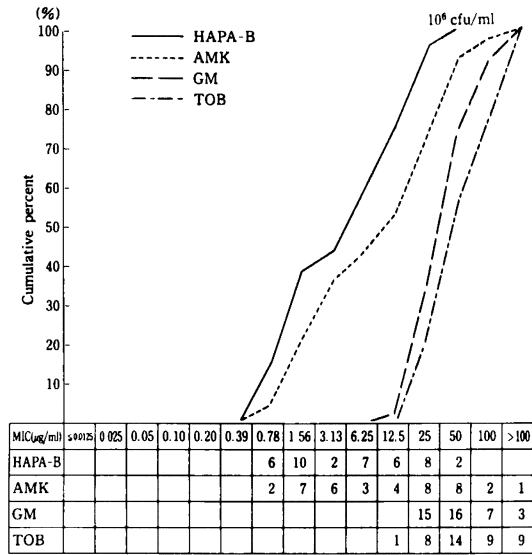


Fig. 15 Susceptibility of GM^r *P. aeruginosa* (30 strains)

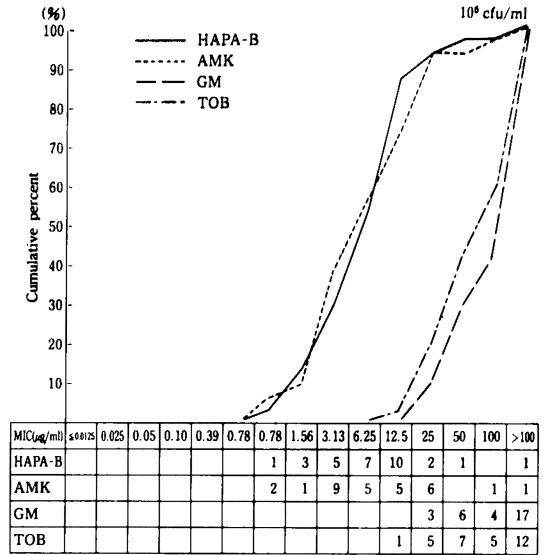


Fig. 16 Comparison of MIC₅₀ and MIC₉₀ against clinical isolates

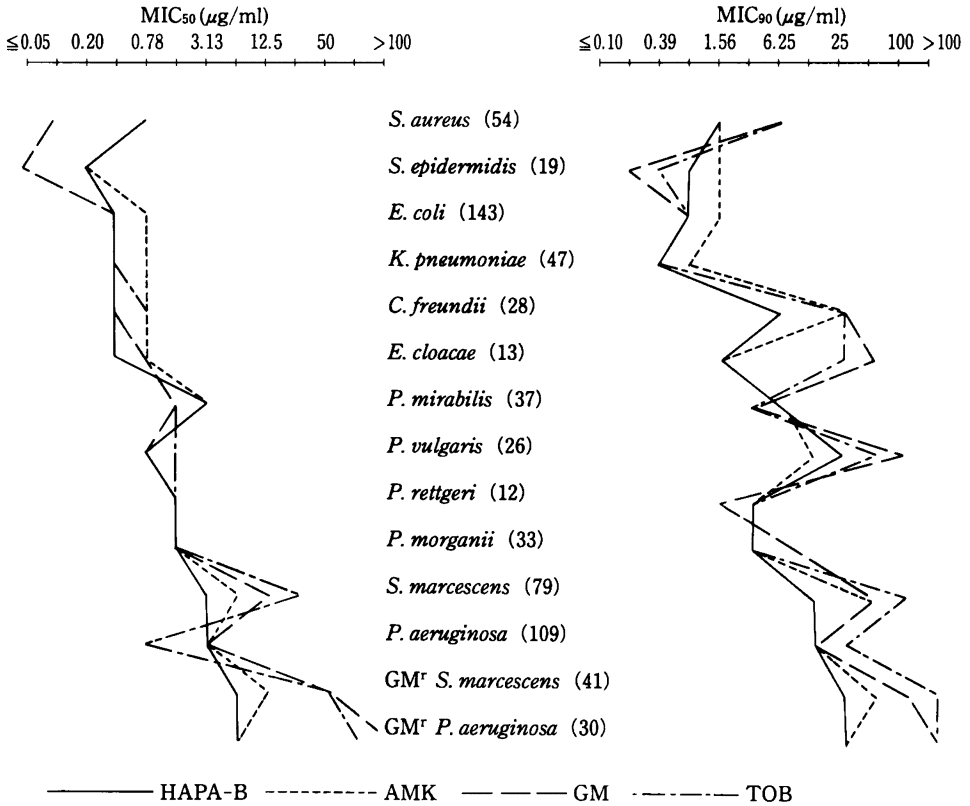


Fig. 17 Resistance patterns of *S. marcescens* (76 strains)

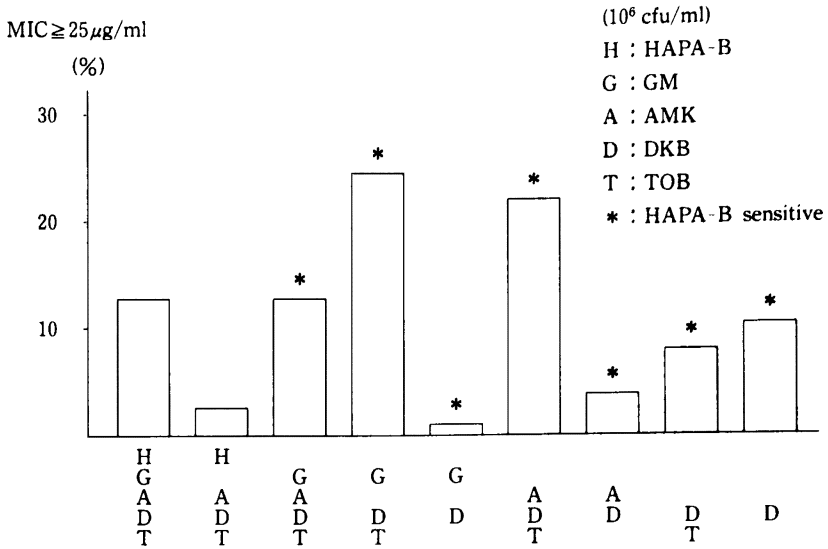
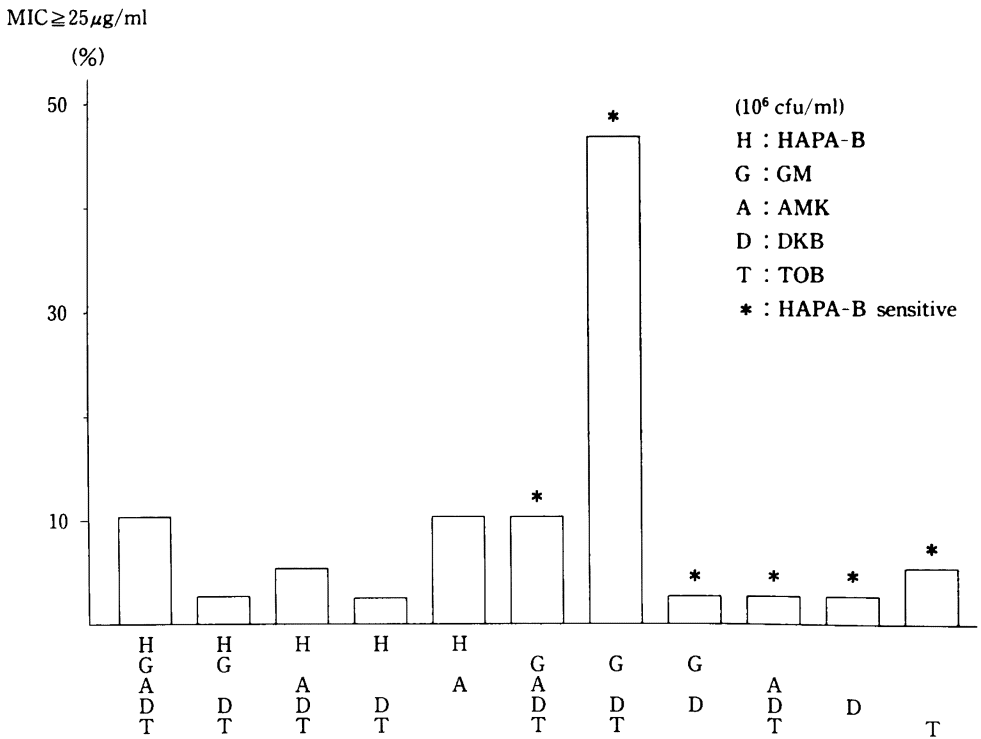


Fig. 18 Resistance patterns of *P. aeruginosa* (39 strains)



上を示す耐性株の5剤に対する耐性パターンを Fig. 17, 18 に示した。

S. marcescens (76株)の場合 GM, DKB, TOB 3剤耐性株が25.0%と最も多く、次いで AMK, DKB, TOB 3剤耐性株の22.4%であった。HAPA-B耐性株は5剤耐性と GMを除く4剤耐性にみられた。また、これらの耐性株の84.2%のHAPA-Bは感受性を示した。

P. aeruginosa (39株)では GM, DKB, TOB 3剤耐性株が46.2%と最も多く、HAPA-B耐性株は5剤耐性、HAPA-BとAMKの2剤耐性などの組合せパターンにみられた。また、これらの耐性株におけるHAPA-Bの耐性率は30.8%と最も少なかった。HAPA-Bは既存のアミノ配糖体系抗生物質に耐性を示す多くの菌株に強い抗菌力を有していた。

4. MBC 分布

臨床分離株に対するHAPA-B, AMK, GMのMBC累積分布をMIC分布と比較して Fig. 19 に示した。HAPA-BのMBCは *P. aeruginosa* を除き1~2MICを示し、特に *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *S. marcescens* ではAMK, GMより優れていた。HAPA-Bの *P. aeruginosa* に対するMBCは2~4MICでAMK, GMと同程度であった。

5. 増殖曲線に及ぼす影響

E. coli 145, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* IAM 1095, *C. freundii* GN 346を試験菌としてHAPA-B, AMK, GMを作用させ、殺菌作用を比較検討した成績を Fig. 20 に示した。

HAPA-BはMIC以上では、いずれの菌種においても著明な菌数減少がみられ、殺菌作用はAMKより強く、GMと同程度であった。*P. aeruginosa* IAM 1095の場合、HAPA-BはMICで6時間目まで増殖抑制がみられたが6時間目以降はAMK, GMと同様に再増殖が認められた。

6. 混合菌培養における増殖曲線に及ぼす影響

E. coli NIHJ JC-2とGM, AMK耐性 *S. marcescens* 1165を試験菌として、混合培養におけるHAPA-B, AMK, GMの殺菌作用を Fig. 21 に示した。

3剤とも5 μ g/mlで *E. coli* NIHJ JC-2を完全に殺菌したが、*S. marcescens* 1165に対しHAPA-Bのみが若干の増殖抑制を示した。さらに、HAPA-Bは50 μ g/mlでは9時間目の生菌数が10² cfu/ml以下、22時間目は5 \times 10² cfu/mlで明らかな殺菌作用を示した。AMK, GMでは9時間目まで増殖抑制または菌数の減少がみられたが、9時間目以降は再増殖を認めた。混合菌培養に対しHAPA-Bのみが強い殺菌作用を示した。

7. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

E. coli W 3630, *S. marcescens* TL-1, *P. aeruginosa* IAM 1095を試験菌として、HAPA-Bの抗菌力に及ぼす接種菌

量、培地pH、血清添加、培地種類の影響について検討した結果を Table 3 に示した。

培地pHについては、いずれの試験菌でも酸性側で弱く、アルカリ側になるほど強くなる傾向がみられた。接種菌量、血清添加の影響はMICにおいて2倍程度変化が認められた。培地種類による影響は *P. aeruginosa* IAM 1095では見られなかったが、*E. coli* W 3630, *S. marcescens* TL-1では Mueller Hinton Medium (Difco)、普通寒天(栄研)ではMICが低く、Brain Heart Infusion Agar (Difco) HIA, ABM 3では高くなる傾向が見られた。

8. 無細胞蛋白合成系におけるアミノ酸の取り込みに及ぼすHAPA-B, AMKの影響

無細胞系における蛋白合成阻害とコドンの読み誤り効果を Table 4 に示した。*E. coli* Q-13 (RNase I) 由来S-100分画(可溶性酵素分画)、R-100分画(リボソーム分画)を使用したポリウリジル酸(Poly U)依存ポリフェニルアラニン蛋白合成系において、HAPA-Bは阻害効果を示した。Poly Uを使った実験系に¹⁴C-Lysineあるいは¹⁴C-Prolineを添加し、ラベルアミノ酸のタンパク質への取り込みの増加を指標にHAPA-B, AMKのコドンの読み誤りの強さを比較した。両薬剤とも濃度依存的にLysine, Prolineの取り込みの増加が認められたが、HAPA-Bのコドンの読み誤り効果はAMKより強く認められた。

9. マウス全身感染に対する治療効果

グラム陽性菌、グラム陰性菌感染に対するHAPA-B, AMK, GMの治療効果を Table 5 に示した。

S. aureus Smith感染に対しHAPA-BのED₅₀は0.77 mg/kgで、AMKと同程度の効果を示したがGMには劣り、*in vitro* 抗菌力と相関した成績が得られた。

S. epidermidis 656, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* 0611感染ではHAPA-BはAMKより2倍優れた治療効果を示した。

GM耐性 *C. freundii* 3901-1感染に対しHAPA-BのED₅₀は0.82 mg/kgでAMKより約3倍優れた効果であった。

E. cloacae GN 336, *P.morganii* 0237, *P. rettgeri* 535および *P. vulgaris* 3811-2感染に対するHAPA-BのED₅₀はAMKより若干優れていた。

S. marcescens TL-1感染では、HAPA-BのED₅₀は3.79 mg/kgでAMKより約2倍優れた効果を示したがGMには劣り、MICと相関する成績を得た。

GM耐性 *S. marcescens* 1167感染に対するHAPA-BのED₅₀は8.71 mg/kgでAMKの約3.5倍優れた効果を示した。

P. aeruginosa 0844, *A. calcoaceticus* NCTC 7844感染において、HAPA-BのED₅₀はAMKと同じか若干優れていた。HAPA-BのED₅₀はGM感受性菌ではGMよりも大

Fig. 19 Comparison of distribution of MIC and MBC of HAPA-B, AMK and GM (20 strains, 10^5 cfu/ml)

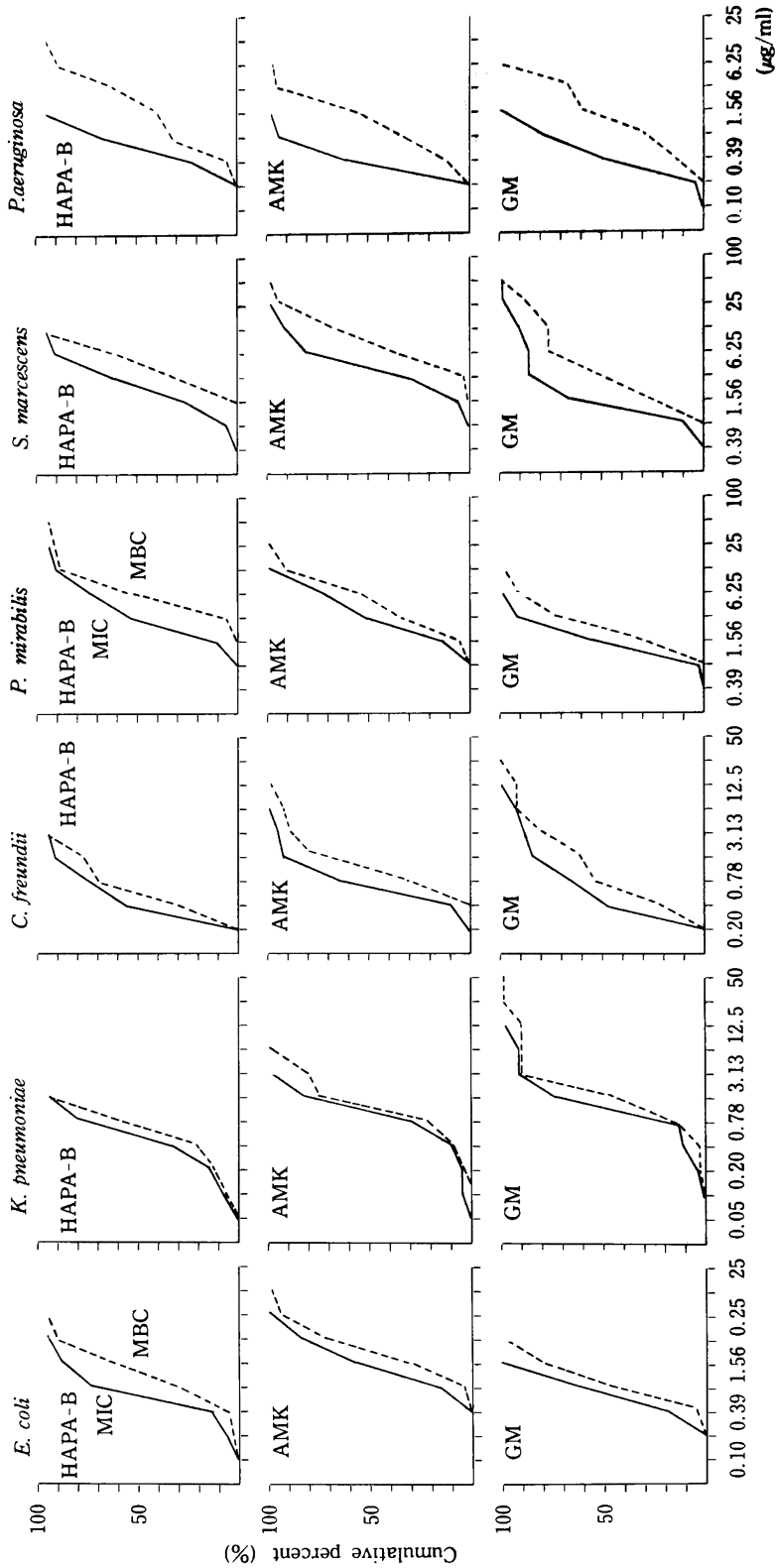
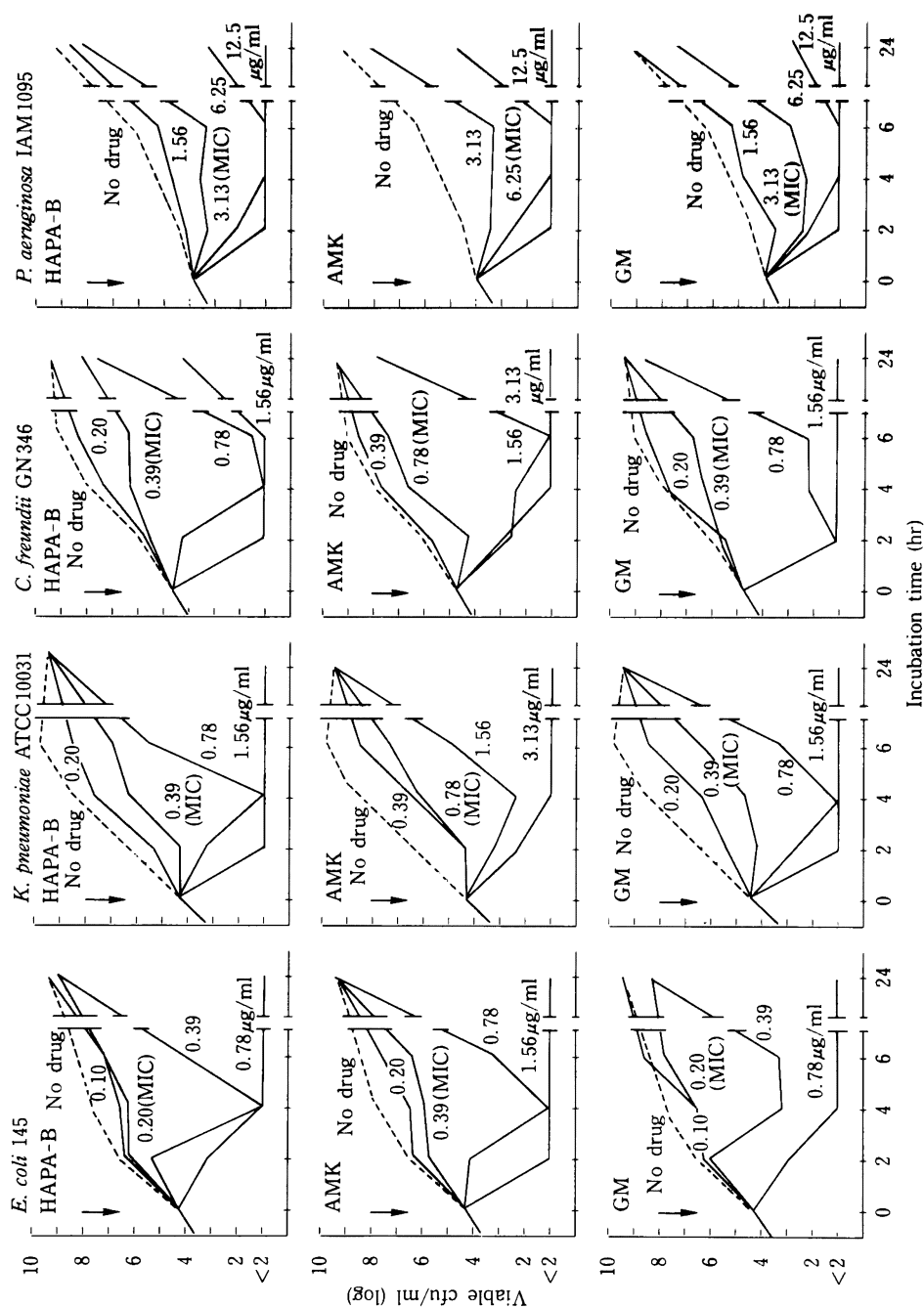


Fig. 20 Bactericidal activity of HAPA-B, AMK and GM



きかったが、AMKと同程度か2~3倍優れた治療効果を示した。

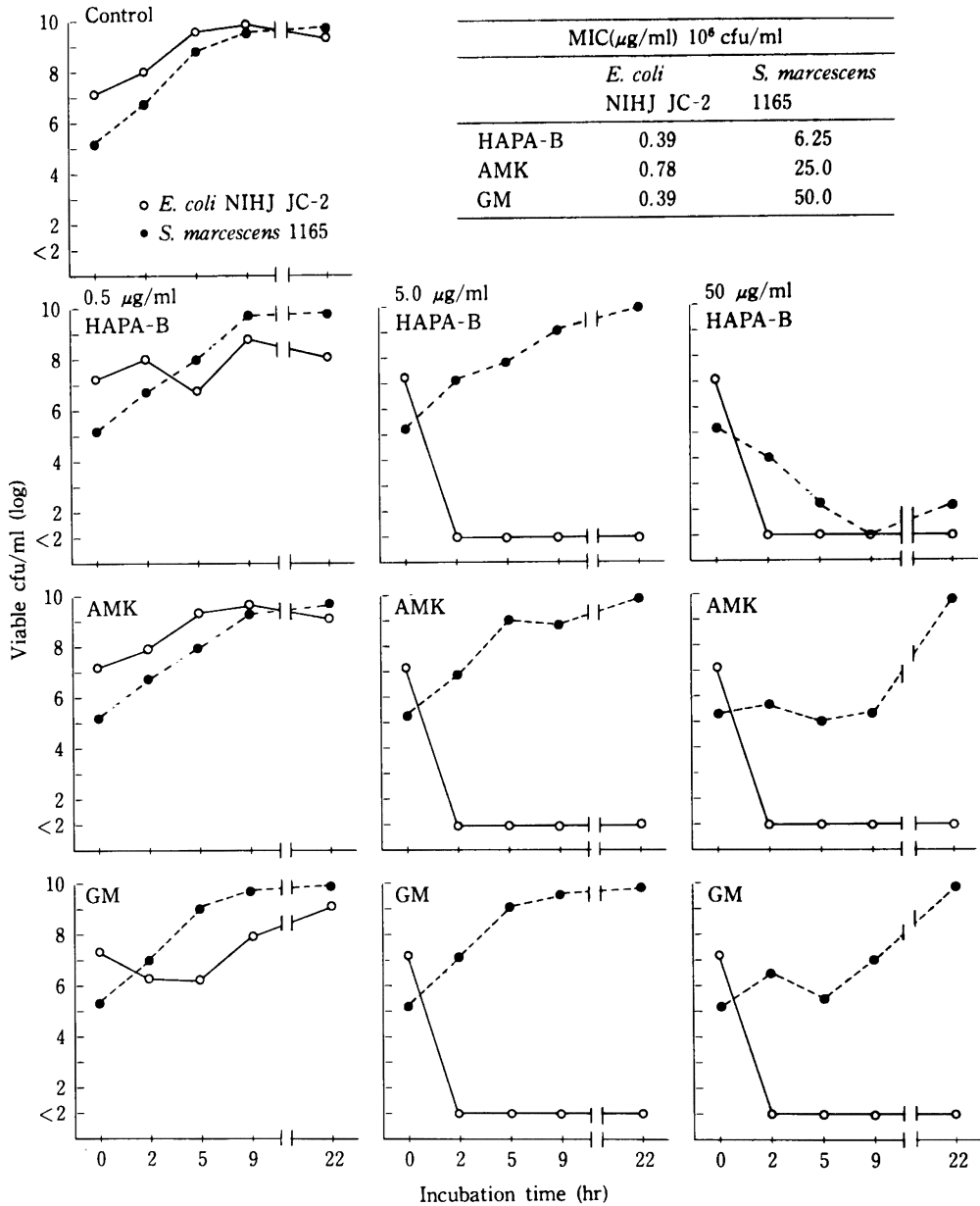
10. 混合菌全身感染における治療効果

E. coli NIHJ JC-2とGM, AMK耐性*S. marcescens* 1165の混合感染におけるHAPA-B, AMK, GMの治療効果をTable 6に示した。

混合感染におけるHAPA-BのED₅₀は4.35 mg/kgで、AMK, GMは20 mg/kg以上であった。

死亡マウスの心血培養では、無治療対照群8例中2例から*E. coli* NIHJ JC-2のみ、6例から*E. coli* NIHJ JC-2と*S. marcescens* 1165が分離され、*S. marcescens* 1165単独分離例はみられなかった。薬剤投与群の*E. coli* NIHJ JC

Fig. 21 Bactericidal activity of HAPA-B, AMK and GM against mixed incubation with *E. coli* and *S. marcescens*



-2 単独分離例は低投与群 (1.25 mg/kg) にみられた。 *S. marcescens* 1165 単独分離例は中および高投与群に多く、 5 mg/kg 群では HAPA-B は 3 例中 1 例、 AMK は 5 例中 1 例、 GM は 5 例中 3 例に認められ、 20 mg/kg 群では AMK で 5 例中 4 例、 GM では 6 例全例であった。 ED₅₀ および *S. marcescens* 1165 単独分離例数は MIC と相関する結果で

あった。

11. 噴霧菌吸入感染における治療効果

K. pneumoniae B 54, *P. aeruginosa* No. 15 の吸入感染に対する HAPA-B, AMK, GM の治療効果を Table 7 に示した。

K. pneumoniae B 54 感染に対し HAPA-B の ED₅₀ は

Table 3 Effect of inoculum size, pH, horse serum and medium on the MIC of HAPA-B

Factor		MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		<i>E. coli</i> W 3630	<i>S. marcescens</i> TL-1	<i>P. aeruginosa</i> IAM 1095
Inoculum size* (cfu/ml)	10 ⁸	0.20	3.13	6.25
	10 ⁷	0.10	1.56	3.13
	10 ⁶	0.10	1.56	3.13
	10 ⁵	0.10	1.56	3.13
	10 ⁴	0.10	1.56	3.13
Medium pH* (10 ⁶ cfu/ml)	5	6.25	25	12.5
	6	0.39	3.13	12.5
	7	0.10	1.56	3.13
	8	0.10	1.56	1.56
Horse serum* (10 ⁶ cfu/ml)	0 %	0.10	1.56	3.13
	20%	0.20	1.56	3.13
	50%	N. G.	3.13	N. G.
Medium (10 ⁶ cfu/ml)	MH	0.10	1.56	3.13
	NA	0.10	0.78	3.13
	HIA	0.78	6.25	3.13
	BHIA	0.78	12.5	3.13
	ABM 3	0.39	6.25	3.13

* : MH : Mueller Hinton Medium BHIA : Brain Heart Infusion Agar
 NA : Nutrient Agar ABM 3 : Antibiotic Medium 3
 HIA : Heart Infusion Agar N. G. : Control not growth

Table 4 Effect of antibiotics on poly U dependent polypeptide synthesis in cell extract obtained from *E. coli* Q-13

Antibiotic	Concentration (μM)	Relative incorporation (%)		
		Phenylalanine	Lysine	Proline
None		100	0.39	0.90
HAPA-B	1	74.6	3.7	2.4
HAPA-B	10	75.0	10.6	6.7
HAPA-B	100	70.7	15.0	10.3
AMK	1	81.8	0.89	0.74
AMK	10	59.8	2.0	2.3
AMK	100	36.6	4.4	4.8

The reaction mixture contained, in 200 μl : 10 mM, Tris-HCl buffer pH 7.8 ; 16 mM, Mg(OAc)₂ ; 50 mM, NH₄Cl ; 0.1 mM, DTT ; 1.0 mM, ATP ; 0.05 mM, GTP ; 5 mM, PEP ; 40 μg , PEP Kinase ; 20 μG , poly U ; 0.25 μCi , ¹⁴C-aminoacid ; 20 μg , tRNA ; R-100, 15 A₂₆₀ units ; S-100, 400 μg .
 The incubations was for 20 minutes at 37°C and the reaction was for labeled amino acid incorporated into TCA-insoluble material was counted in a Aloca Scintillation Spectrometer.

8.71 mg/kg で GM よりやや劣るが AMK の 2 倍優れた効果であった。

P. aeruginosa No. 15 感染では, HAPA-B の ED₅₀ は 15.1 mg/kg で GM には劣るが AMK よりも若干優れた効果が認められた。

12. 上行性尿路感染における治療効果

P. aeruginosa 0844 の上行性尿路感染に対する HAPA-

B, AMK, GM の治療効果を Fig. 22 に示した。

HAPA-B は 80 mg/kg 投与群 5 例全例, 40 mg/kg 投与群 3 例が腎内生菌数 10² cfu/g 以下の完全治癒であった。完全治癒例数から求めた HAPA-B の ED₅₀ は 24.6 mg/kg で, AMK と同程度の効果を示したが GM には劣る成績であった。

13. マウス血漿中濃度

Table 5 *In vivo* antibacterial activities of HAPA-B, AMK and GM on systemic infections in mice

Organisms	Challenge dose (cfu/mouse)	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^6 cfu/ml	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>S. aureus</i> Smith	2×10^6	HAPA-B	0.39	0.77(0.57-1.05)*
		AMK	0.39	0.72(0.52-0.99)
		GM	0.1	0.22(0.17-0.29)
<i>S. epidermidis</i> 656	1×10^6	HAPA-B	0.78	12.3(8.57-17.69)
		AMK	1.56	21.4(35.92-12.79)
		GM	0.78	6.16(3.24-11.68)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	2×10^6	HAPA-B	0.39	1.74(1.30-2.33)
		AMK	0.78	2.46(1.92-3.16)
		GM	0.39	0.62(0.49-0.78)
<i>K. pneumoniae</i> 0611	1×10^5	HAPA-B	0.39	1.34(0.91-1.97)
		AMK	0.78	2.33(1.75-3.11)
		GM	0.78	0.82(0.63-1.09)
<i>C. freundii</i> 3901-1	2×10^7	HAPA-B	0.39	0.82(0.57-1.19)
		AMK	1.56	2.18(1.41-3.36)
		GM	50	24.6(14.63-41.43)
<i>E. cloacae</i> GN 336	1×10^7	HAPA-B	0.39	3.08(2.26-4.18)
		AMK	0.78	3.30(2.61-4.17)
		GM	0.39	1.09(0.76-1.56)
<i>P. morganii</i> 0237	1×10^6	HAPA-B	0.78	1.25(0.83-1.88)
		AMK	0.78	1.44(0.95-2.17)
		GM	0.78	0.63(0.50-0.78)
<i>P. rettgeri</i> 535	2×10^7	HAPA-B	0.78	1.09(0.73-1.63)
		AMK	0.78	1.17(0.67-2.03)
		GM	0.78	0.31(0.16-0.62)
<i>P. vulgaris</i> 3811-2	5×10^6	HAPA-B	1.56	10.0(7.71-12.97)
		AMK	1.56	11.5(7.82-16.87)
		GM	0.78	2.50(1.47-4.25)
<i>S. marcescens</i> TL-1	1×10^7	HAPA-B	1.56	3.79(3.02-4.75)
		AMK	3.13	6.60(4.87-8.94)
		GM	0.78	1.65(1.32-2.07)
<i>S. marcescens</i> 1167	5×10^6	HAPA-B	6.25	8.71(6.70-11.29)
		AMK	12.5	30.31(26.46-34.73)
		GM	50	>40
<i>P. aeruginosa</i> 0844	2×10^4	HAPA-B	0.78	10.72(7.64-15.04)
		AMK	0.78	15.16(10.83-21.21)
		GM	0.78	4.35(3.36-5.65)
<i>A. calcoaceticus</i> NCTC 7844	1×10^6	HAPA-B	1.56	1.65(1.25-2.17)
		AMK	1.56	1.65(1.22-2.23)
		GM	0.78	0.67(0.50-0.89)

Mice : Slc ; ICR strain, male, 4 weeks old, 10 animals/group.

Challenge : i. p. , 5% mucin suspension.

Administration : i. m. , 1 hr. after infection.

ED₅₀ : 7 days after challenge. Van der Waerden method.

* : 95% confidence limit

HAPA-B, AMK を 25 mg/kg 筋肉内投与したマウス血漿中濃度を Fig. 23 に示した。

血漿中濃度のピークは両剤とも 15 分にあり, AUC(area under the curve) は HAPA-B が 55.06 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$, AMK は 59.04 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ で HAPA-B は AMK と同様の血漿中

濃度を示した。

III. 考 察

新しいアミノ配糖体系抗生物質 HAPA-B の *in vitro*,

Table 6 Protective effect of HAPA-B, AMK and GM against experimental mixed infection with *E. coli* and *S. marcescens* in mice

Drugs	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2		<i>S. marcescens</i> 1165		<i>E. coli</i> NIHJ JC-2 + <i>S. marcescens</i> 1165		
	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^6 cfu	ED ₅₀ (mg/kg) 2×10^6 cfu	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^6 cfu	ED ₅₀ (mg/kg) 2×10^6 cfu	ED ₅₀ (mg/kg) $1 \times 10^6 + 2.5 \times 10^6$ cfu	Dose (mg/kg)	Mortality and organisms detected of dying mice
							0 50 100%
HAPA-B	0.39	1.74	6.25	8.12	4.35(2.79-6.78)	20	
		(1.30-2.33)		(5.59-11.8)		5	
		2.46		32.49		1.25	
AMK	0.78	(1.92-3.16)	25	(23.9-44.17)	>20	20	
					5		
				1.25			
GM	0.39	0.62	50	>40	>20	20	
		(0.49-0.78)				5	
					1.25		
Control	(drug free)						

Mice : Slc : ICR strain, male, 4 weeks old, 8 animals/group.

Challenge : i. p., 5% mucin suspension.

Administration : i. m., 1 hr after challenge.

Bacterial detected : heart blood of dying mice, *E. coli* alone , *S. marcescens* alone and the said both .

Table 7 Protective effect of HAPA-B on respiratory infections in mice

Test strains	Challenge dose (cfu/lung)	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^6 cfu/ml	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>K. pneumoniae</i> B54 ^{a)}	5×10^6	HAPA-B	0.1	8.71(4.74-15.9)
		AMK	0.2	20.0(12.7-31.4)
		GM	0.0125	5.0(2.78-8.99)
<i>P. aeruginosa</i> No. 15 ^{b)}	1×10^4	HAPA-B	3.13	15.1(10.1-22.6)
		AMK	1.56	17.4(11.8-25.5)
		GM	3.13	7.58(5.26-10.9)

Mice : Slc : ICR strain, male, 4 weeks old, 10 animals/group. b) : cyclophosphamide treatment (4 mg/mouse, i. p.) for 4 days before infection.

Challenge : Aerosol infection apparatus used for CIS inhalation chamber apparatus (CLEA JAPAN INC.).

Administration : i. m., a) : 2.5 and 8 hrs. after infection, b) : 1 and 4 hrs. after infection.

in vivo における抗菌力を AMK, GM, DKB, TOB と比較検討した。

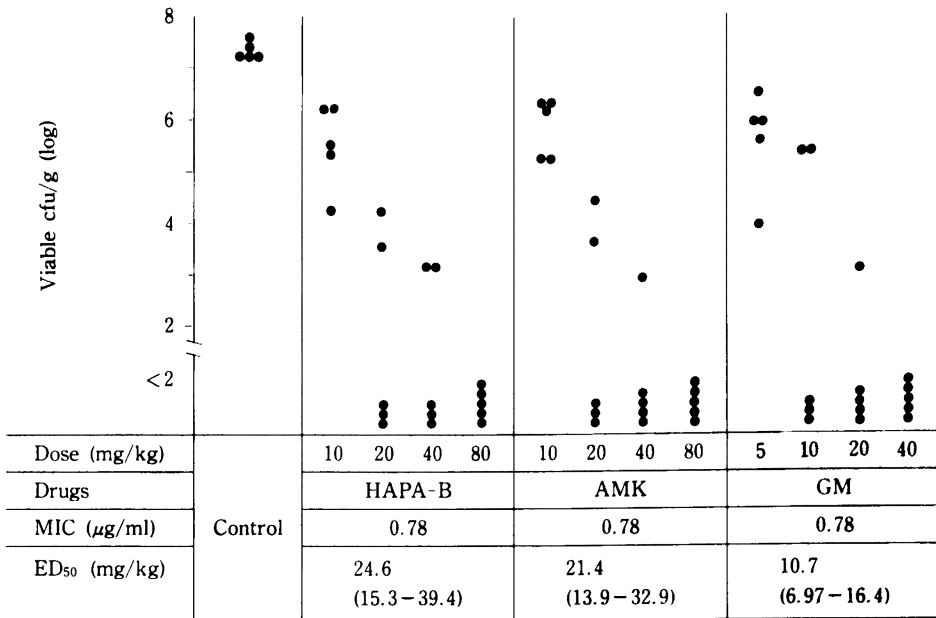
HAPA-B は、グラム陽性菌、グラム陰性菌に対し、広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を示すことが明らかとなった。嫌気性菌には他のアミノ配糖体系抗生物質と同様にほとんど抗菌力を示さなかった。近年臨床材料より分離された菌株に対する感受性分布を見ると、*S. epidermidis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* の 3 菌種を除く総ての菌種において HAPA-B の MIC₉₀ は AMK, GM, TOB よりも低く、MIC₉₀ が 25 $\mu\text{g/ml}$ を越えた菌種は認められなかった。特に GM 耐性 *S. marcescens*, GM 耐性 *P. aeruginosa* において HAPA-B は高い感受性率を示した。

HAPA-B の作用は殺菌的で MBC は多くの菌種で、1 ~ 2 MIC を示した。また、増殖曲線に及ぼす影響は AMK より強力に GM に匹敵した。

各種アミノ配糖体系抗生物質耐性の *S. marcescens*, *P. aeruginosa* における耐性パターンを検討した結果、両菌種とも GM, DKB, TOB の組合せ交叉耐性パターンを示す株が最も多く、HAPA-B を含む組合せ耐性株は最も少なかった。さらに、AMK, GM, DKB, TOB 耐性で HAPA-B のみに感受性を示す菌株が認められた。このことはアミノ配糖体系抗生物質の不活化酵素のうち、HAPA-B はわずかに AAC (6')-4¹⁾ および AAD (4')²⁾ により不活化されるだけで他の不活化酵素に対しては極めて安定なことを示している。また、我々が最近報告した *Serratia* 属の産生する AMK の 6' 位のアミノ基をアセチル化する新しいタイプの不活化酵素にも HAPA-B は安定であった¹⁾。

HAPA-B の抗菌作用機序は無細胞蛋白合成系における実験の成績から、他のアミノ配糖体系抗生物質と同様に蛋白合成阻害作用によると考えられた。

Fig. 22 Therapeutic effect of HAPA-B, AMK and GM against experimental urinary tract infection with *P. aeruginosa* in mice



Mice : Slc : ICR strain, femal, 5 weeks old, 5 animals/group.

Challenge : Transurethraly inoculated, *P. aeruginosa* 0844 5×10^5 cfu/0.05 ml

Administration : i.m., 24 hrs. after challenge from twice daily for 5 days.

Bacterial recovery : kidneys, 6 days after challenge.

マウス感染実験における治療効果は *in vitro* 抗菌力と相関した結果が得られた。すなわち HAPA-B は多くの菌種で AMK より強力な治療効果を示したが、GM には劣る成績であった。しかし、AMK, GM 耐性菌の感染に対し HAPA-B は強い *in vivo* 抗菌力を示した。*E. coli* と AMK, GM 耐性 *S. marcescens* の混合感染における治療効果は AMK, GM には見られず、HAPA-B のみに認められた。死亡マウスの心血培養をみると無治療群および各薬剤低投与量群では *E. coli* 単独あるいは両菌種混合分離例が多くみられたが、AMK および GM のそれぞれ中および高投与量群では菌交代によると思われる *S. marcescens* 単独分離例が多く認められた。近年、*Serratia* 感染症および *Serratia* の臨床材料からの検出頻度が増加する一方、各種抗生剤とも耐性株の増加傾向が顕著である^{12,13}。*Serratia* 感染症の多くは二次感染あるいは抗生剤投与の経過に伴って発症する例が多く、菌交代および耐性菌に対する対策が重要と考えられ、HAPA-B の耐性菌に対する特異的な性質は注目に値する。

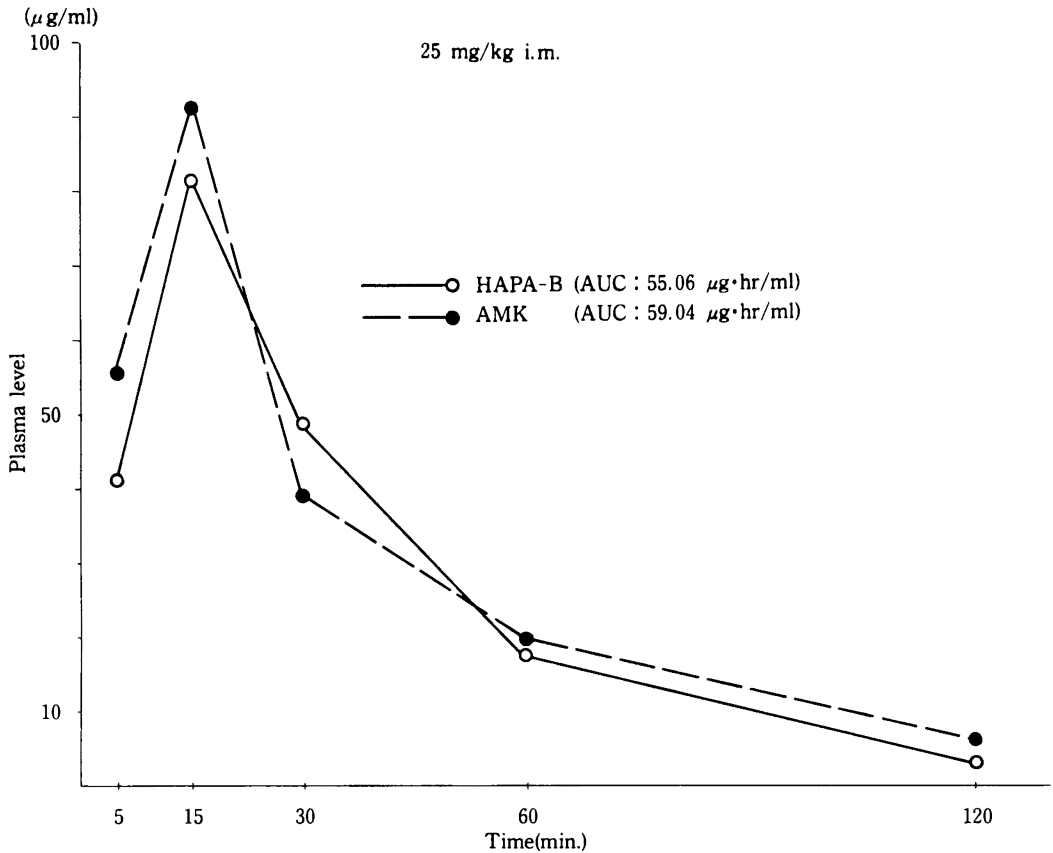
以上のことから、HAPA-B はグラム陽性菌、グラム陰性菌、特に種々のアミノ配糖体系抗生物質耐性の諸菌種に有

効であり、各種感染症に対し臨床効果の期待できる薬剤と思われる。

文 献

- 1) 第 31 回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム, HAPA-B, 1984
- 2) NAGABHUSHAN, T. I. ; A. B. COOPER, H. TASAI, P. J. L. DANIELS & G. H. MILLER : The syntheses and biological properties of 1-N-(S-4-amino-2-hydroxybutyryl)-gentamicin B and 1-N-(S-3-amino-2-hydroxypropionyl) gentamicin B. *J. Antibiotics* 31 : 681 ~ 687, 1978
- 3) MILLER, G. H. ; P. J. S. CHIU & J. A. WAITZ : Biological activity of SCH 2140, the 1-N-S- α -hydroxy- β -aminopropionyl derivative of gentamicin B. *J. Antibiotics* 31 : 688 ~ 696, 1978
- 4) GOERING, R. V. ; C. C. SANDERS & W. E. SANDERS : *In vivo* analysis of structure-activity relationships among four aminoglycosides : gentamicin, netil-

Fig. 23 Plasma levels of HAPA-B and AMK in mice



micin, 1-N-HAPA gentamicin B and amikacin. *Curr. Ther. Res.* 26 : 329 ~ 341, 1979

- 5) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29 : 76 ~ 79, 1981
- 6) 嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会：嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。 *Chemotherapy* 27 : 559 ~ 560, 1979
- 7) NIRENBERG, M. W. : Cell free protein synthesis directed by messenger RNA. "Method in Enzymology" ed. by S. P. Colowick & N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, vol. VI, pp 17 ~ 23, 1963
- 8) 諸星俊郎, 西野武志, 谷野輝雄：新マクロライド抗生物質 TMS-19-Q に関する細菌学的研究。 *Chemotherapy* 32 (S-6) : 12 ~ 25, 1984
- 9) NISHI, T. & K. TUSHUCHIYA : Experimental urinary

tract infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 22 : 508 ~ 515, 1978

- 10) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島聡智子：各種グラム陰性菌による実験的尿路感染に関する基礎的研究。 *Chemotherapy* 30 : 1237 ~ 1249, 1982
- 11) MOROHOSHI, T. ; M. TORIYA, S. YOKOIYAMA, K. FUJIMOTO, K. HAYANO, S. GOTO & A. TSUJI : The acetylation of 6'-amino group of amikacin by a new enzyme prepared from *Serratia* sp.. *J. Antibiotics* 37 : 1687 ~ 1691, 1984
- 12) 上田 泰, 他 (15施設) : *Serratia marcescens* に関する基礎的研究第1報。 *Chemotherapy* 27 : 841 ~ 847, 1979
- 13) 上田 泰, 他 (15施設) : *Serratia marcescens* に関する基礎的研究第2報。 *Chemotherapy* 28 : 1 ~ 8, 1980

IN VITRO AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HAPA-B,
A NEW AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC

SHIGEYUKI YOKOYAMA, MINORU TORIYA, TOSHIRO MOROHOSHI, YOSHINORI SIRITANI,
AKIKO TAKASHIMA and KAZUO HAYANO
Research Laboratories, Toyo Jozo Co., Ltd.,

SACHIKO GOTO and AKIYOSHI TSUJI
Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of HAPA-B, a new aminoglycoside, were investigated in comparison with those of amikacin, gentamicin, dibekacin and tobramycin. The following results were obtained.

HAPA-B showed a broad antibacterial spectrum against both gram-positive and gram-negative bacteria. Among them, *S. marcescens*, *C. freundii* and *E. cloacae* were extremely susceptible.

HAPA-B was active against most of aminoglycoside-resistant bacterial strains. It acted bactericidally and the activity was stronger than that of amikacin.

On the protective effects in experimental infections with various bacteria, HAPA-B showed excellent therapeutic effects as obtained in *in vitro*. Furthermore, HAPA-B was effective in experimental infections caused by various aminoglycoside-resistant bacteria including amikacin-resistant strains.

The peak value of the serum level of HAPA-B in mice gave almost same features as that of amikacin.