

氏 名(本籍) 佐 藤 清^{きよし}

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 405 号

学位授与年月日 平 成 2 年 12 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 アミノグリコシド系抗生物質マイクロノマイシンおよび関連化合物の生物活性に関する研究

論文審査委員(主査) 教授 伊崎和夫
教授 山下恭平
教授 水野重樹

論文内容要旨

緒 論

抗菌薬の開発とその進歩はまことに目覚ましい。これらの薬剤の普及による成果はヒトの感染症の治療に多大な貢献をしていることは周知のところである。アミノグリコシド系抗生物質は化学的にはアミノ基をもつ塩基性の疑似糖類であって、最初の物質は streptomycin で、1944年 Waksman博士によって発見されたものである。発見の当初は多くのグラム陰性桿菌にすぐれた抗菌力を示し、penicillin G とは著しく異なった性質の抗生物質として注目されたが、間もなく結核菌に対しても画期的な抗菌力のあることがわかり、今日の結核症撲滅の途を開いたことは有名である。その後、1957年には梅沢博士によって kanamycin が発見され結核症を中心に細菌感染症に多くの成果をあげてきた。1963年 Weinstein博士らによって発見された gentamicin の出現は、streptomycin, kanamycin などのもつアミノグリコシド系抗生物質の印象を一変させ細菌感染症の化学療法における本系薬剤の地位を著しく向上させ、抗緑膿菌作用などの広域スペクトルをもつ抗生物質の一つとして臨床応用の範囲を一段と広げ、今日では一般細菌感染症、特にグラム陰性桿菌感染症の化学療法には欠くことのできない抗生物質になっている。また、今日の化学療法での抗生物質の中心は β -ラクタム系抗生物質とアミノグリコシド系抗生物質である。後者の系統の薬剤のうちの優れたものの幾つかが日本人の手によって発見・開発されてきた。

micronomicin (MCR)は、1974年協和発酵工業(株)が神奈川県相模原の土壌から分離した新種放線菌 *Micromonospora sagamiensis* var. *nonreducans* の生産する新しいアミノグリコシド系抗生物質である。化学構造は 図1 に示す通り gentamicin C₁ の 6'-NH₂ が 6'-NHCH₃ になった構造を有している。この 6'-NH₂ がメチル化されていることが、アミノグリコシド系抗生物質のある種の不活化酵素にも安定で、本酵素保有の耐性緑膿菌に有効性を示す構造的特性になっている。全国的規模での基礎的・臨床的検討の結果、薬効および安全性の点から有用性が確認され、1982年に上市され現在临床上広く使用されている。

本研究では、micronomicin および関連化合物の生物学的活性に関する知見を述べる。第1章では micronomicin の薬理学的特性、第2章では micronomicin と gentamicin 3 components との差別化、第3章では数個の特徴ある誘導體研究および臨床分離株の薬剤耐性機構の解明とその対策について論ずる。

第 1 章 Micronomicin の 薬理学的研究

1-1. 細菌学的検討

MCRはグラム陽性・陰性菌に広範囲の抗菌スペクトルを有し、特にグラム陰性桿菌に優れた抗菌力を示した(表1, 2)。臨床分離株のMIC 累積分布は、*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*属, *Pseudomonas aeruginosa* などにおいて優れた感受性分布を示した。またcefoperazone, cefmetazole などのβ-ラクタム系抗生物質との併用により協力効果が認められた。アミノグリコシド系抗生物質は一般に殺菌的に作用するが、*P. aeruginosa* に対してMCRは殺菌速度がはやい点で tobramycin(TOB), dibekacin(DKB)など他のアミノグリコシド系抗生物質より優れていた。MCRの作用を受けて菌が溶菌する抗菌像が電子顕微鏡下で明瞭に観察された。薬剤不活化酵素によるアミノグリコシド系抗生物質の耐性機構については三橋ら(群馬大)によって、詳細に報告されている。アミノグリコシド系抗生物質に耐性な臨床分離株には、これらの抗生物質の特定の水酸基やアミノ基をリン酸化したり、アセチル化したり、アデニル化して抗生物質を不活化してしまう不活化酵素が存在する。これら不活化作用がアミノグリコシド系抗生物質耐性臨床分離株の主要な耐性機構となっている。Kanamycin系, gentamicin系の不活化を支配する酵素の名称と不活化部位を図2, 3 にそれぞれ示した。このような臨床分離株には腸内細菌(*E. coli*など), *P. aeruginosa*, *Proteus*属, *Serratia*属のようなグラム陰性菌や *S. aureus*などのグラム陽性菌が含まれる。不活化作用による耐性の遺伝子は、細胞質性遺伝子である plasmid に支配されていることが知られている。表3 にはアミノグリコシド系抗生物質の不活化酵素を産生する各種耐性菌に対するMCRの抗菌力を示した。MCRはAPH(3')-I, II, AAC(6')-4をもつ耐性菌には抗菌力を発揮するが、AAD(2''), AAC(3)-I, AAC(2')の耐性菌には抗菌力が弱いが無効であった。MCRは構造上6'-NH₂ がメチル化されていることにより、この側鎖をアセチル化して不活化する菌AAC(6')-4 (*P. aeruginosa* や *S. marcescens*) にも抗菌力を示した。ところで、清水(東京女医大)は、各種不活化酵素の中でも GM, DKB, TOB, amikacin(AMK), sisomicin (SISO) などほとんどのアミノグリコシド系抗生物質を不活化するAAC(6')-4 型が *Serratia* に急増していることを疫学調査の結果報告している。今後、他の菌種についても同様の現象がみられる可能性もあり、臨床上における本剤のメリットは大きい。

P. aeruginosa KY8510 由来のAAC(6')-4 粗酵素による各種アミノグリコシド系抗生物質の不活化の結果を図4 に示した。MCRは力価の低下は殆どみられなかったが、試験した大部分のアミノグリコシド系抗生物質は30分後に完全に失活した。GMは残存力価約30% まで活性が減少した。PPC のbioautogram の結果から、GMは3成分中C₁、C₂ が順次消失し C₁ だけが残存していることが観察された。一方、*in vivo* 感染 防御効果は、マウス実験の全身感染症やラット尿路感染症で検討したが、*in vitro*の抗菌力とよく相関し、GMと大差は認められなかった(表4)。

1-2. 体内動態

表5 にはマウス、ラット、イヌの各種実験動物に皮下あるいは筋肉内投与した時の血中濃度の薬動学的パラメーターを示した。MCR の血中濃度推移はほぼGMと同様であった。ラットに筋肉内投与した時の体内分布は腎>血>肺>心>肝の順であった。同時にGMについても検討しているが、MCR はGMに比べ、腎内濃度がやや低いのに反して、肺をはじめとする他の臓器においては高い成績であった。排泄経路は主に腎一尿型でイヌでは24hrで約80% が未変化体のまま尿中に回収された。

1-3. 毒性

マウス、ラットに対するMCRの急性毒性はGMと比較し静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下投与いずれの投与方法においてもGMより軽度であった(表6)。秋吉ら(東京医歯大)は、モルモットを用いて、MCR の聴器毒性はGMの1/4 程度と評価している。また腎毒性について、武田ら(新潟大)は、GMの1/4 程度としている。著者らはラットを用いて薬剤の腎蓄積性を調べた結果、MCR の腎からの消失はGMよりはやく、MCR の腎障害がかなり弱いことが示唆された。

以上、MCR は、従来のアミノグリコシド系抗生物質の抗菌力・殺菌力に加えて、聴器・腎毒性を軽減した点で優れた薬剤といえる。

第2章 Micronomicin と Gentamicin componets との差別化

MCRは、GMに類似した化学構造を有している。GMは、単一物質ではなく GM-C₁、C₂、C₁。3成分からなる混合物である。本章では、MCR, GM-C₁、C₂、C₁。それぞれの *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用、体内動態、急性毒性等を詳細に比較評価し、生物学的諸性状と化学構造との相関性を考察した。文献的には、GMの各成分の生物活性に関する

報告は余り見当らず、MCR, GM-C₁, C₂, C_{1a}の4つの関連化合物を同一レベルでの比較実験は新知見と考えられる。

2-1. 抗菌作用

標準株に対して、GM各成分はMCRと殆ど同じ抗菌力を示した。臨床分離株に対する抗菌力の強さは、*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*ではC_{1a} > C₂ > MCR > C₁、*S. marcescens*では、C₂ > C₁, MCR > C_{1a}の順の傾向がみられた。アミノグリコシド不活化酵素を産生する各種耐性菌のうち AAC(6')-4 産生菌に対して、cell free系の酵素反応において、C_{1a}, C₂は完全に失活するのに対しMCR, C₁が安定であったことは注目に値した(図5)。その他の耐性菌に対しては、MCRとGM各成分間に交差耐性の関係がみられた。このような*in vitro*での抗菌作用の成績は、マウスを用いた*in vivo*の実験的感染症においてもほぼ平行した成績が得られた。

2-2. 体内動態

ラットに10mg/kg 筋肉内投与した時、MCR, GM各成分は速やかに血中に吸収され、臓器では腎、肺への移行がみられたが、肝へは検出限界以下であった。肺については、MCRはどのGM成分よりも良好な分布を示し、MCRの特徴といえる。腎半減期は長い方からC_{1a} > C₂ > MCR, C₁となり明らかに差異が観察された(図6)。

2-3. 急性毒性

MCRのマウスに対する急性毒性は、GMのどの成分よりも軽度であった。

以上、極めて構造の類似したMCRとGM構成成分間の生物活性を比較検討した結果、MCRは耐性菌、腎半減期、LD₅₀に特徴ある成績が得られた。GM3成分同士では、生物学的活性の面でC_{1a} > C₂ > C₁の序列がみられ、MCRはC₁に比較的近かった。これらの結果は、purpurosamine 6'位の構造に起因するものと推論された。

第3章 Micronomicin誘導体の構造活性相関

3-1. メチル誘導体

アミノグリコシド系抗生物質は、分子内に数個のアミノ基を持っている。そのアミノ基をメチル化した各種の誘導体が合成された。また、MCR生産菌の培養液から新規なアミノグリコシド系抗生物質が単離された。ここでは、MCRに派生する構造類似の誘導体について抗菌力と毒性の生物活性と化学構造との相関性を明らかにした。ア

ミノ基にメチル基が結合した場合、その物質の抗菌力は一般的に低下する傾向にあった。その程度は、結合するメチル基の数と結合する部位により左右された。3N-メチル体が最も抗菌力の低下が激しく、次いで2'N-メチル体、6'N-メチル体の順序であった。逆に3''N-メチル体は抗菌力の増強がみられた(図7)。一方、メチル体は急性毒性も低下する傾向にあったが、一部のメチル体には抗菌力を低下させるが、毒性はむしろ増強し相反する生物活性を示した(3N-メチル体)。耐性菌に対する挙動の点では被不活化部位のアルキル化はその部位の不活化耐性菌に抗菌力の改善を示した(表7)。興味あることに、XK62-3(3N-メチル体)はAAC(3)-I, IIの他にAAD(2'')耐性菌まで広い有効性を示した。このことは、置換基の立体効果による不活化の阻害機構が推定された。

3-2. MCR-HABA

MCRの2-deoxystreptamine部分の1位-アミノ基が4-amino-2-hydroxybutyryl(HABA)基で修飾された構造をもつ半合成誘導体MCR-HABA(図8)について細菌学的評価、体内動態および急性毒性を検討した。MCR-HABAは、ほぼ親物質MCRの抗菌活性を保持していた。しかしながら、MCRおよびGMが無効である数種類のアミノグリコシド系抗生物質不活化酵素を産生する耐性菌に有効であったことは特筆すべき点と考えられる(表8および図8のBlock Sites参照)。MCR-HABAは、すべての耐性菌まで抗菌域が拡大した完成したMCR誘導体であると結論される。

3-3. 耐性機構の解明とその対策

感染症の臨床の場から分離される*P. inconstans*はβ-ラクタム系、アミノグリコシド系、ペプタイド系等数多くの各種抗生物質に対する感受性が鈍く、治療上難治性の原因菌になると予想されている。*P. inconstans*のアミノグリコシド系抗生物質の耐性機構は明確にされていない。そこで*P. inconstans*のアミノグリコシド系抗生物質の耐性機序を解明し、この耐性理論に基づいて本菌に有効な誘導体を合成した。試験菌株を用い、アミノグリコシド系抗生物質の基質特異性を検討し、その成績を表9に示した。GM components, MCR, MCR-HABA, TOB, DKB, fradiomycin(FRM)などを基質とし、KT2811, KM, AMK, astromicin(ASM)を基質としなかった。不活化機構を解明する目的で、GM-C₁を基質として反応不活化物を取得し、その化学構造を明らかにした。TLC, IR, Mass および

NMR(図9) の分析の結果、不活化物の構造は2' N-acetyl体と判明し、2' N-acetyl GM-C₁ であると確認された(図10)。この結果、*P. inconstans* のアミノグリコシド系抗生物質に対する耐性機構は、2' N-NH₂をアセチル化するAAC(2')であることが明らかにされた。KT2811は 2'-NH₂基が 2'-NHCH₃ 基となったMCR 誘導体で本耐性菌に抗菌力を示した。

総 括

MCRは放線菌から生産されるアミノグリコシド系抗生物質に属する新しい抗生物質である。化学構造はGMによく類似しており、GMはGM-C₁, C₂, C₁₀から成る混合物であるのに対しMCRは単一物質である。MCRの生物学的活性を既存アミノグリコシド系抗生物質と比較検討し、MCRは有効性、安全性の点など総合的にみて優れた薬剤であることを明らかにした。現在ヒト感染症の治療薬として使用されている。MCRとGM構成成分との生物活性を比較検討した結果、AAC(6')-4に対する安定性、毒性などの点でMCRはGM各成分とを差別化する特徴をもつことを見出した。この差異はpurpurosamine 6'位の構造の違いに起因するものと推論された。誘導体研究では、まず合成法あるいは発酵法から得られた幾つかのメチル誘導体を基に構造活性相関を検討し、2,3の興味ある新知見を得た。MCR-HABA誘導体はアミノグリコシド系抗生物質のあらゆるタイプの耐性菌まで抗菌域を拡大し、薬剤耐性理論の上で興味のあるユニークな物質であった。最後に、感染症の治療で临床上問題になっている *P. inconstans*の耐性菌について、その薬剤耐性機構を解明し、耐性理論に基づいてその対策を考察した。

Abbreviations

MCR : Micronomicin	GM : Gentamicin	DKB : Dibekacin
KM : Kanamycin	TOB : Tobramycin	AMK : Amikacin
NTL : Netilmicin	RSM : Ribostamycin	SISO : Sisomicin
FRM : Fradiomycin	ASTM : Astromicin	
MIC : Minimal Inhibitory Concentration		
cfu : colony forming units		
ED ₅₀ : Effect Dose 50%	LD ₅₀ : Lethal Dose 50%	

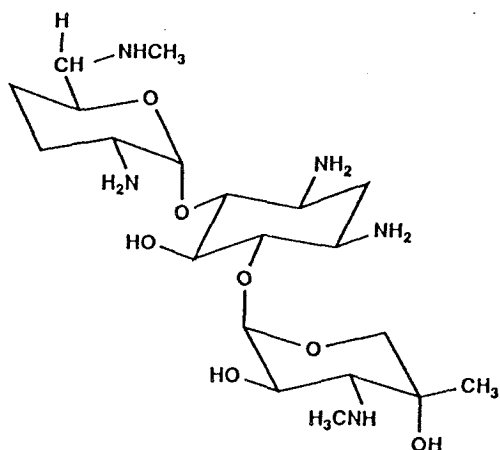


图1 Chemical structure of micronomicin (MCR)

表1 Antibacterial spectrum of MCR against gram positive bacteria

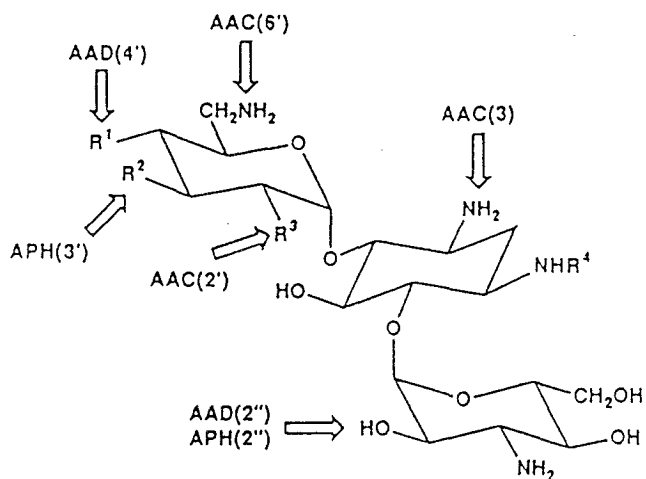
Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	MCR	GM	DKB	KM
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	0.1	0.1	0.2	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.2	0.2	0.39	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.2	0.1	0.2	0.78
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	1.56	3.13	12.5	25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type III	3.13	3.13	50	50
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	50	>100	>100
<i>Micrococcus luteus</i> PCI-1001	0.39	0.39	3.13	6.25
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	0.1	0.1	0.1	0.78
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.2	0.39	0.39	0.39

Agar dilution method, inoculum size 10^8 cfu/ml.

表2 Antibacterial spectrum of MCR against gram negative bacteria.

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	MCR	GM	DKB	KM
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.78	0.78	1.56	3.13
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.78	0.78	1.56	1.56
<i>Escherichia coli</i> NIH	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.39	0.78	0.78	1.56
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0.39	0.39	0.39	3.13
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.78	1.56	1.56	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.39	0.39	0.78	1.56
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	1.56	1.56	0.78	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.78	1.56	0.78	1.56
<i>Morganella morganii</i> Kono	1.56	1.56	0.78	3.13
<i>Serratia marcescens</i> T-55	0.78	1.56	6.25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No.12	0.39	0.39	0.39	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nc-5	1.56	1.56	0.78	25

Agar dilution method, inoculum size 10^8 cfu/ml.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Kanamycin A	OH	OH	OH	H
Bekanamycin	OH	OH	NH ₂	H
Dibekacin	H	H	NH ₂	H
Tobramycin	OH	H	NH ₂	H
Amikacin	OH	OH	OH	HABA
Habekacin	H	H	NH ₂	HABA

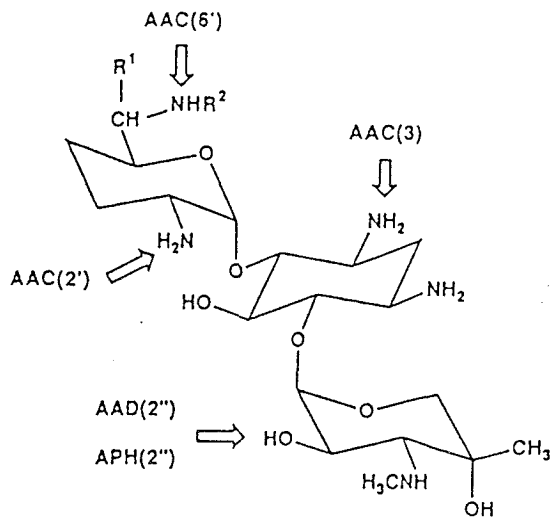
HABA : -CO-CHOH-CH₂-CH₂NH₂

图2 Sites of modification of the kanamycins by inactivating enzymes.
 AAC: Aminoglycoside Antibiotic Acetyltransferase
 AAD: Aminoglycoside Antibiotic Adenylyltransferase
 APH: Aminoglycoside Antibiotic Phosphotransferase

表3 Antibacterial activity of MCR against aminoglycoside resistant organisms.

Organism	Inactivating Enzyme	MIC (μg/ml)				
		MCR	GM	TOB	DKB	KM
<i>E. coli</i> 57R/W677	AAD(2'')	100	50	50	>100	>100
<i>E. coli</i> 76-2	AAD(2'')	100	50	50	100	>100
<i>E. coli</i> KY8348	AAC(3')-I	12.5	6.25	0.78	0.39	1.56
<i>E. coli</i> KY8349	APH(3')-I	0.39	0.39	0.39	0.39	>100
<i>P. aeruginosa</i> KY8510	AAC(6')-4	1.56	3.13	25	50	>100
<i>P. aeruginosa</i> KY8516	AAC(6')-4	3.13	6.25	100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> KY8511	AAC(3')-I	100	50	0.78	0.78	100
<i>P. aeruginosa</i> KY8512	APH(3')-I II	0.78	0.78	0.78	0.78	12.5
<i>Providencia</i> sp.164	AAC(2')	100	25	25	100	>100
<i>S. marcescens</i> 1065	AAC(6')	3.13	1.56	50	100	100
<i>K. pneumoniae</i> Y-58	AAD(2'')	25	12.5	25	50	>100

Agar dilution method, inoculum size 10⁶ cfu/ml.



	R ¹	R ²
Micronomicin	H	CH ₃
Gentamicin C ₁	CH ₃	CH ₃
Gentamicin C ₂	CH ₃	H
Gentamicin C _{1a}	H	H

Fig 3 Sites of modification of the gentamicins by inactivating enzymes.

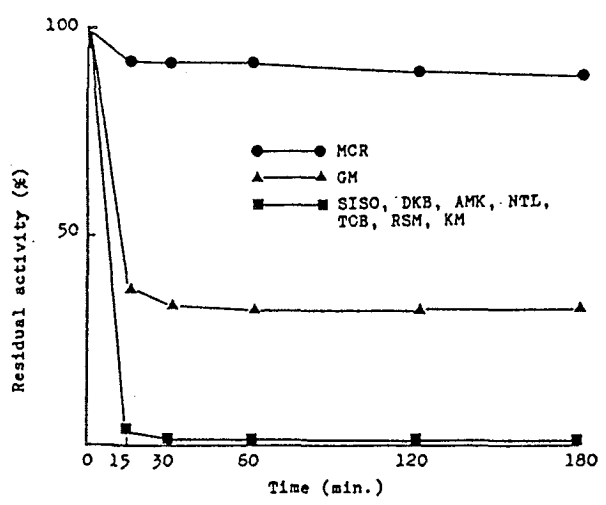


Fig 4 Enzymatic inactivation of aminoglycoside antibiotics by *P. aeruginosa* KY8510 ; AAC(6')-4.

表4 Protective effects of MCR and GM against experimental infections in mice.

Organisma	ED ₅₀ (mg/kg)		MIC (μg/ml)	
	MCR	GM	MCR	GM
S. aureus Smith	0.3	0.2	0.1	0.1
S. pyogenes S23	17.7	11.8	3.13	3.13
S. pneumoniae III	6.6	7.7	3.13	3.13
E. coli GN2411-5	10.8	10.7	0.39	0.39
K. pneumoniae 8045	5.7	7.7	0.2	0.2
P. mirabilis 1287	10.4	10.7	1.56	1.56
S. marcescens T-26	2.1	1.9	3.13	1.56
S. marcescens T-55	10.6	10.8	0.78	1.56
P. aeruginosa BMH 1	15.0	21.4	0.78	0.78
P. aeruginosa Nc-5	1.0	1.1	1.56	1.56
P. aeruginosa No.12	0.5	0.7	0.39	0.39
P. aeruginosa E-2	0.4	0.4	3.13	3.13
P. aeruginosa KY8512	15.4	13.8	1.56	0.78
P. aeruginosa KY8510	7.2	17.8	0.39	1.56
P. aeruginosa KY8516	42.0	76.6	0.78	3.13

Challenge : intraperitoneally, Therapy : subcutaneously
 ED₅₀ : LITCHFIELD-WILCOXON method Mouse : ddY, ♂, 5W

表6 Acute toxicity of MCR and GM in mice and rats.

Animal	Route	LD ₅₀ (mg/kg)	
		MCR	GM
Mice	IV	74.7	57.2
	IP	279.6	279.6
	IM	244.5	233.9
	SC	365.9	312.6
Rats	IV	111.5	93.4
	IP	898.9	559.1
	IM	683.5	511.4
	SC	1397.6	893.3

IV : Intravenous IP : Intraperitoneal
 IM : Intramuscular SC : Subcutaneous

表5 Pharmacokinetic parameters calculated on basis of the one-compartment model from plasma data in mice, rats and dogs.

Animal	Dose	Antibiotic	Pharmacokinetic parameters			
			C _{max} (μg/ml)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)	AUC (μg/mlx hr)
Mice	10 mg/kg sc	MCR	15.0	0.25	0.54	13.6
		GM	15.2	0.25	0.51	15.2
Rats	10 mg/kg im	MCR	21.1	0.25	0.75	28.0
		GM	18.4	0.25	0.71	26.4
Dogs	10 mg/kg im	MCR	17.3	0.5	0.63	31.2
		GM	17.8	0.5	0.79	28.6

C_{max} : Peak plasma concentration
 T_{max} : Time of peak plasma concentration
 T_{1/2} : Half life
 AUC : The area under the plasma concentration-time curve

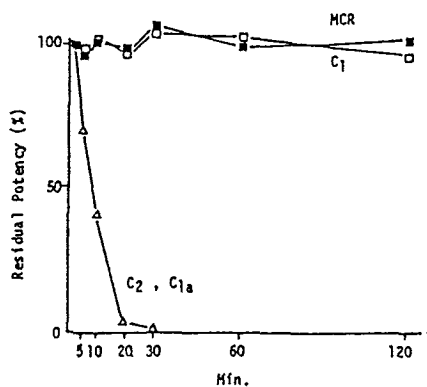
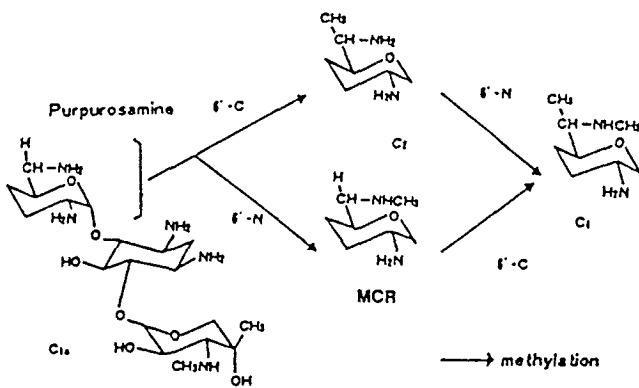


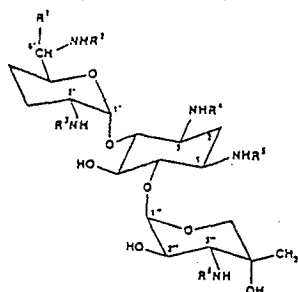
图5 Enzymatic inactivation of MCR and GM components by *P. aeruginosa* KY8510; AAC(6')-4.



Antibiotic	6'-CH ₃			T 1/2 (hr) Kidney 10 mg/kg
	NO.	C-CH ₃	N-CH ₃	
C1a	0	0	0	134
C2	1	1	0	110
MCR	1	0	1	84
C1	2	1	1	77

图6 Relationship between chemical structure and renal accumulation in rats.

图7 Structure-activity relationship of MCR related compounds.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	No. of CH ₃	Mean of MIC *
	6'C	6'N	2'N	3N	1N	3''N		
Cl _a	H	H	H	H	H	CH ₃	1	0.21
C ₂	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	2	0.26
C ₁	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	3	0.36
MCR	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	2	0.37
KT1915	H	H	H	H	H	H	0	0.43
XX62-4	H	Me ₂	H	H	H	CH ₃	3	0.59
KT2962	H	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	3	0.80
KT1654	H	CH ₃	H	H	H	H	1	0.82
KT1916	CH ₃	H	H	H	H	H	1	0.82
XX62-3	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	2	0.85
KT2972	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	4	1.03
KT2811	H	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	3	1.36
KT2970	CH ₃	Me ₂	H	H	H	CH ₃	4	2.18
KT2966	H	Me ₂	H	H	CH ₃	CH ₃	4	3.04
KT2854	H	Me ₂	CH ₃	H	H	CH ₃	4	3.49
KT2971	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	4	3.90
KT2973	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	4	5.91
KT2963	H	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	3	8.02
KT2968	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	4	36.86
KT2965	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	4	51.41
KT2964	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	5	94.61
KT2967	H	Me ₂	H	CH ₃	H	CH ₃	4	121.42
KT2969	H	Me ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	6	200.00

Me₂ = (CH₃)₂ * Geometric mean of MIC (n=25 strains)

表7 Antibacterial activity of MCR related compounds against resistant organisms.

Organism	Inactivating Enzyme	MIC (μg/ml)				
		XX62-4	XX62-3	KT2811	MCR	Cl _a
<i>P. aeruginosa</i> KYZ444	AAC(6')-3	1.56	100	100	50	12.5
<i>P. aeruginosa</i> KYZ445	AAC(6')-3	1.56	25	100	25	3.13
<i>P. aeruginosa</i> KY8510	AAC(6')-4	3.13	3.13	6.25	1.56	6.25
<i>P. aeruginosa</i> KY8516	AAC(6')-4	3.13	12.5	6.25	1.56	12.5
<i>Providencia</i> sp.164	AAC(2')	100	50	6.25	100	25
<i>E. coli</i> KY8348	AAC(3) - I	25	0.78	12.5	12.5	6.25
<i>P. aeruginosa</i> KY8511	AAC(3)- I	100	3.13	50	25	12.5
<i>P. aeruginosa</i> KY8563	AAC(3)- II	>100	3.13	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> KY8970	AAD(4')	0.2	0.2	0.2	0.1	0.05
<i>S. epidermidis</i> KY4149	AAD(4')	0.1	0.05	0.1	0.05	0.05
<i>E. coli</i> 57R/W677	AAD(2'')	100	3.13	50	50	25
<i>K. pneumoniae</i> Y-58	AAD(2'')	100	3.13	50	50	12.5
<i>P. aeruginosa</i> KY8512	APH(3')- I II	1.56	1.56	3.13	0.78	0.2
<i>S. aureus</i> KY8969	APH(2'')	50	50	100	25	12.5

Agar dilution method, inoculum size 10⁸ cfu/ml.

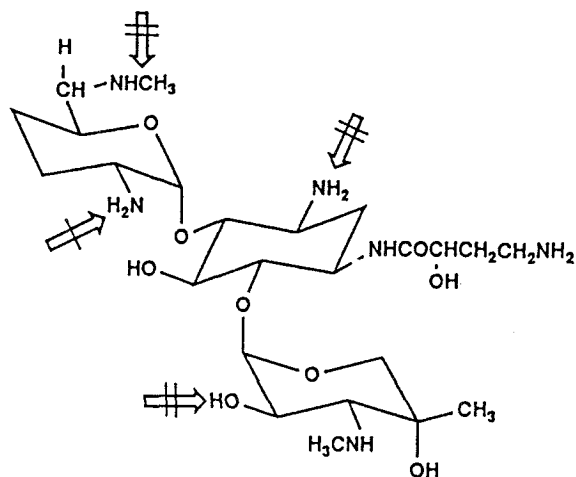


图8 Chemical structure of MCR-HABA and sites of resistance against inactivating enzymes.

表8 Antibacterial activity of MCR-HABA against resistant organisms.

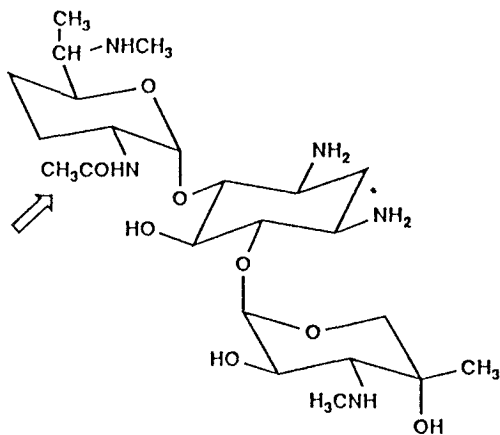
Organism	Inactivating Enzyme	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
		MCR-HABA	MCR	GM	DKB	AMK
<i>E. coli</i> 57R/V677	AAD(2 ^{''})	1.56	100	50	>100	12.5
<i>E. coli</i> 76-2	AAD(2 ^{''})	0.39	100	50	100	1.56
<i>E. coli</i> KY8348	AAC(3)-I	0.2	25	6.25	0.39	0.39
<i>E. coli</i> KY8349	APH(3')-I	0.2	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>P. aeruginosa</i> KY8510	AAC(6')-4	3.13	1.56	3.13	50	25
<i>P. aeruginosa</i> KY8516	AAC(6')-4	6.25	3.13	6.25	>100	100
<i>P. aeruginosa</i> KY8511	AAC(3)-I	6.25	100	50	0.78	1.56
<i>P. aeruginosa</i> KY8512	APH(3')-I II	1.56	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>Providencia</i> sp.164	AAC(2')	12.5	100	25	100	6.25
<i>S. marcescens</i> 1065	AAC(6')	1.56	3.13	1.56	100	25
<i>K. pneumoniae</i> Y-58	AAD(2 ^{''})	0.39	25	25	50	1.56

Agar dilution method, inoculum size 10^6 cfu/ml.

表9 Substrate specificity of *P. Inconstans* acetyltransferase.

Antibiotics	Inactivation (%)		
	PI-10	PI-11	PI-12
GM-C1	100	100	100
GM-C2	100	100	100
GM-C1a	98	98	97
GM complex	97	99	96
MCR	100	100	100
MCR-HABA	96	95	93
KT2811	0	0	0
TOB	99	98	99
DKB	100	100	100
FRM	90	100	94
KM	0	0	0
AMK	0	0	0
ASTH	0	0	0

Substrate : 500 μ g/ml
 Enzyme protein : 5 mg/ml
 Incubation time : 37 $^{\circ}$ C 10 minutes



2'-N-acetyl GM C₁

图10

Structure of the Inactivated GM C₁ by *P. Inconstans*

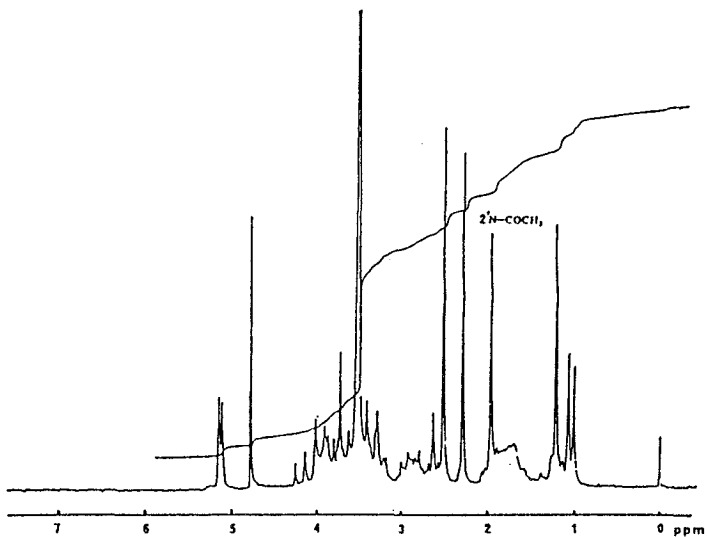


图9 NMR spectrum of GM C₁-inactivated product in D₂O. (free base)

審査結果の要旨

マイクロマイシン (MCR) は1974年協和発酵工業株式会社において分離された新種の放線菌 *Micromonospora sagamiensis* var. *nonreducans* の生産する新しいアミノグリコシド系抗生物質である。化学構造はゲンタミシン (GM) によく類似しているが、GMはGM-C₁, C₂, C_{1a}から成る混合物であるのに対し、MCRは単一物質である。MCRは著者の研究をも含めて、全国的規模での基礎的、臨床的検討の結果、薬効および安全性の点から有用性が確認され、1982年上市され現在临床上広く使用されている抗生物質である。本研究はMCRおよび関連化合物の生物学的活性について詳細に検討し、MCRの有効性を明確にしたものである。

著者はまずMCRがグラム陽性・陰性菌に対して、他のアミノグリコシド抗生物質、 Tobramycin, Zibekacin, Gentamicin (GM) と同等またはより秀れた殺菌効果があることを示した。また、MCRは構造上6'-NH₂がメチル化されている為に、この側鎖をアセチル化して不活化する緑膿菌やセラチア菌にも抗菌力を示す特徴をもっていることを示した。In vivo感染試験においても in vitro抗菌力とよく相関し、GMとの差は認められなかった。またマウス、ラットを使用した毒性試験において、聴器、腎毒性が従来のアミノグリコシド抗生物質より軽度である点で優れた薬剤と判定された。さらに、著者はGM成分GM-C₁, C₂, C_{1a}の各成分とMCRとの生物活性について比較試験を行い、薬効、毒性においてMCRが優れていることを明らかにした。次に発酵法または合成法で得られた幾つかのMCRのメチル誘導体を基に構造活性相関を検討し、2, 3の興味ある新知見を得た。またMCRの2-デオキシストレプトアミン部分の1位-アミノ基が4-アミノ-2-ヒドロキシブチル基 (HABA) 基で修飾された構造をもった誘導体は、アミノグリコシド系抗生物質のあらゆるタイプの耐性菌まで抗菌力を示し、薬剤耐性理論上で興味のあるユニークな薬剤であることを明らかにした。最後に、感染症の治療で临床上問題になっている *P. incostants* の耐性菌についてその薬剤耐性機構を解明し、その対策を考察した。

以上のように、本論文は新アミノグリコシド抗生物質マイクロマイシン及びその誘導体について、薬効・安全性に関して学問的新知見を加えただけでなく、本薬剤の臨床薬としての応用に寄与した点は高く評価されるもので、審査員一同は著者に農学博士の学位を授与するに値するものと判定した。