

## Enduracidin の治療効果

—*Staph. aureus* 静脈内感染マウスの腎内菌数を指標として—

土屋皖司・近藤正熙・大石登喜子

武田薬品工業株式会社, 研究開発本部 生物研究所

## I. 緒 言

化学療法剤の治療効果判定には被検菌をマウスの腹腔内に接種し, 種々な経路から薬剤を投与してその生残率をもつて治療効果を判定している。しかし, *Staph. aureus* 感染症は膿瘍形成が病像の主体をなしているので, *Staph. aureus* の mucin 浮遊液による腹腔内感染は自然の感染病像とはかなり異なつたものである。したがつて河盛ら<sup>1)</sup> や大菌<sup>2)</sup> が述べているように *Staph. aureus* 感染症に対する化学療法剤の治療効果は自然病像により近い膿瘍形成阻止あるいはすでに形成された膿瘍の治療を目安とした検討もなされるべきである。

Enduracidin の実験的グラム陽性菌感染症に対する治療効果については先に報告<sup>3)</sup> した。この治療効果は多くの既知の化学療法剤にくらべかなり強いと思われたので, さらに静脈内感染による *Staph. aureus* の腎における増殖におよぼす影響について検討した。

## II. 実験材料および実験方法

- 1) 動物: CF#1/JCL の4週令, 雌を使用した。
- 2) 感染: 実験室保存の *Staph. aureus* 308 A-1 を Brain Heart Infusion Broth に1夜培養し, その100倍稀釈液 0.2 ml を静脈内に接種した。
- 3) 治療: Enduracidin を HCO-50 2%, glucose 5%, benzyl alcohol 1% 含む溶液 10 mg/ml に溶解し, 投与量が 0.2 ml 中に含まれるように蒸留水で稀釈し, 感染と同時に1回皮下注射した。
- 4) 定量培養: 感染1日, 3日および7日目に各群 3~6 頭のマウ

スの腎を無菌的に採取し 4 ml の蒸留水で乳剤とした後, 適当な菌数の得られるまで10倍稀釈をくり返し, 7.5% NaCl 加普通寒天平板1枚当り 0.1 ml を接種しコンテジ棒で塗り広げ, 48時間後の集落数より腎乳剤 1 ml 当りの生菌数を求めた。

## III. 実験成績

定量培養の結果を Table 1 および Fig. 1 に示した。対照群では1日後に  $10^3 \sim 10^5$ , 3日後に  $10^4 \sim 10^7$ , 7日後に  $10^5 \sim 10^8$  を示し, 時間の経過と共に菌数の増加を示した。

Table 1 Effect of enduracidin on Staphylococcal number per Ml kidney

Time after infection (days)	Doses (mg/kg)					
	0	0.25	0.5	1	2	4
1	$1.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	$3.0 \times 10^5$	$9.4 \times 10^2$	$1.6 \times 10^4$	$6.0 \times 10$
	$2.6 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$8.8 \times 10^4$	$8.0 \times 10^2$	$3.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10$
	$2.5 \times 10^4$	$8.1 \times 10^3$	$6.6 \times 10^3$	$6.2 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$	
	$1.5 \times 10^4$	$7.6 \times 10^3$	$2.8 \times 10^3$	$3.9 \times 10^2$	$7.0 \times 10$	
	$4.0 \times 10^3$	$6.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2$	$6.0 \times 10$	
	$4.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$	$0.9 \times 10^2$	$8.0 \times 10$	$3.0 \times 10$	
3	$4.7 \times 10^7$	$5.6 \times 10^7$	$9.1 \times 10^6$	$5.5 \times 10^7$	$2.0 \times 10$	0
	$3.1 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	$4.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^3$	0	0
	$1.5 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.3 \times 10^6$	$3.3 \times 10^2$	0	0
	$1.1 \times 10^7$	$7.6 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$3.0 \times 10$	0	
	$8.7 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$2.3 \times 10^5$	0	0	
	$3.0 \times 10^4$		$3.0 \times 10^3$	0		
7	$2.3 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$8.7 \times 10^7$	$9.3 \times 10^2$	$5.0 \times 10$	0
	$1.8 \times 10^8$	$6.6 \times 10^7$	$6.7 \times 10^7$	$6.6 \times 10^2$	0	0
	$2.3 \times 10^7$	$5.1 \times 10^6$	$4.8 \times 10^7$	0	0	
	$1.8 \times 10^7$	$2.2 \times 10^6$	$3.9 \times 10^7$	0	0	
	$3.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^6$	$3.8 \times 10^7$	0	0	
		$2.7 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	0	0	

Antibiotic is given subcutaneously as a single dose at the time of infection.

Female CF#1/JCL mice were infected intravenously with 0.2 ml of brain heart infusion broth culture (100 fold dilution) of *Staph. aureus* 308 A-1.

Fig. 1 Effect of enduracidin on Staphylococcal number per MI kidney.

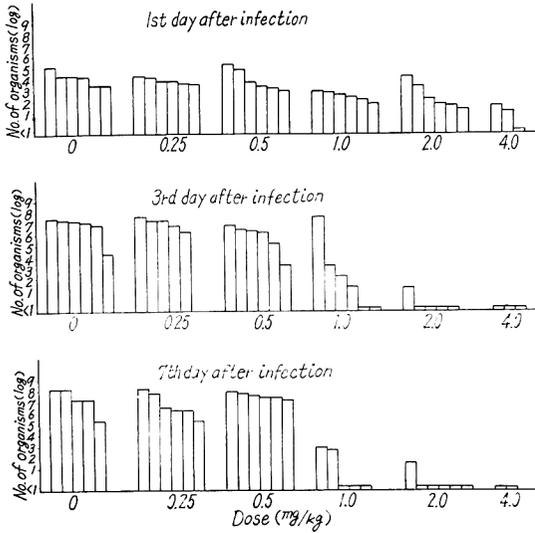


Fig. 2 Mouse kidney, 10 days after infection of *Staph aureus* 308 A-1. Abscess is seen at the corticomedullary zone, and interstitial immigration of neutrophile leucocytes appears. H.E.  $\times 120$ .

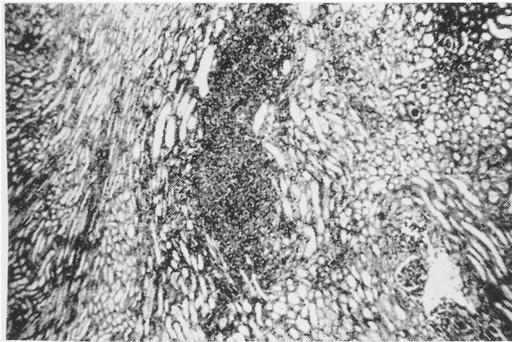
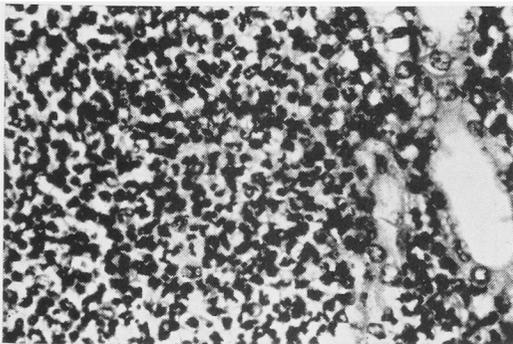


Fig. 3 Higher magnification of Fig. 2. A part of the abscess. Large mass of neutrophile leucocyte. H.E.  $\times 1200$ .



Enduracidin 0.25 mg および 0.5 mg/kg 投与群では対照群と同様な経過を示した。

1 mg/kg 投与群では1日後には全例  $10^1 \sim 10^3$  の菌数を示し、3日後には6例中2例に菌が認められず、1例は  $30$ 、3例は  $10^2 \sim 10^7$  の菌数を示した。7日目には6例中4例に菌を認めず、2例は  $10^2$  の菌数を示した。すなわちいずれの時期においても対照群より明らかに少ない菌数を示した。

2 mg/kg 投与群では1日後に  $10^1 \sim 10^4$  の菌数を示し、3日後には5例中4例に菌が認められなくなり、1例に20見出されたにすぎなかった。7日後にも6例中5例に菌が認められず、1例に50見出されたのみであった。

4 mg/kg 投与群では1日後に3例中1例に菌が認められず、2例に10および50の菌が認められた。しかし3日後、7日後には全例に菌が認められなかった。

IV. 総 括

*Staph. aureus* に対する化学療法剤の効果を、臓器内菌

Fig. 4 Mouse kidney, 10 days after infection of *Staph. aureus* 308 A-1 and simultaneously treatment with enduracidin, 2 mg per kg. No abscess is seen. H.E.  $\times 120$ .

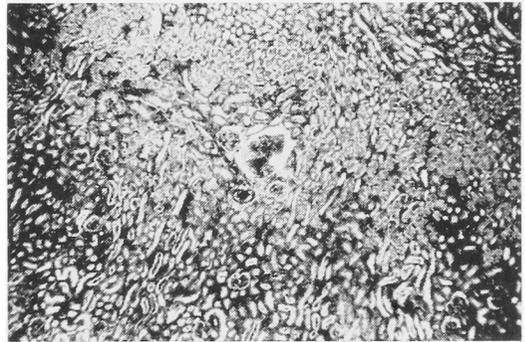
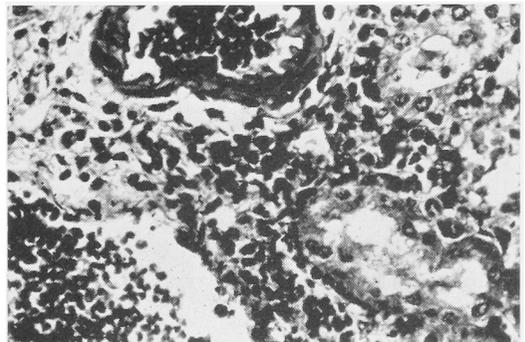


Fig. 5 Higher magnification of Fig. 4. Only perivascular infiltration of lymphocytes, mononuclear cells and histiocytes are seen. H.E.  $\times 1200$ .



数<sup>4-7</sup>、あるいは膿瘍の大きさ<sup>8-11</sup>などにより判定しようとする試みはすでにいくつか報告されている。*Staph. aureus* 感染症の多くの自然病像を考慮するとき、*Staph. aureus* の mucin 浮遊液の腹腔内感染に対する治療効果よりは膿瘍形成あるいは膿瘍形成臓器における菌数の消長を指標とするほうがより合理的な治療効果の判定方法であると考えられる。ただ膿瘍形成の判定は主観的になりやすく、判定に誤りを犯すおそれがないとはいえない。

*Staph. aureus* をマウスの静脈内に感染すると菌は腎のみで増殖し、腎に多数の膿瘍が形成されることはよく知られている。土屋ら<sup>12</sup>も先に *Staph. aureus* 308A-1 を用いて同様な成績を報告した。さらに病理組織学的にも菌の増殖部位と膿瘍とが一致することを確認している。

*Staph. aureus* のマウスの生死による病原性の判定と、腎膿瘍形成能あるいは腎における感染菌の増殖の程度とは関連しないことが知られているが<sup>6,13,14</sup>、同一菌株についてみれば、これらの関係はかなり相関する。*Staph. aureus* の静脈内感染によつて腎に生ずる膿瘍が自然病像をどの程度反映しうるかは明らかではないが、mucin 浮遊液の腹腔内感染による病像よりは自然病像に近い。したがつて *Staph. aureus* を静脈内に感染したマウスの腎内菌数に対する化学療法剤の影響を検討することにより自然病像に対する化学療法剤の効果により近い評価をなしうると考える。

臓器内菌数の消長におよぼす化学療法剤の影響を検討した報告の多くは薬剤を連日投与している。しかし、著者らの実験によれば、感染直後に1回投与した場合と連続投与した場合とで腎内菌数におよぼす影響が特に変わらないので今回の実験では感染直後に1回のみ薬剤を投与した。最近、HARRISON and ZYGMUNT<sup>9</sup> は著者らと同様に1回のみ薬剤を投与し腎内菌数におよぼす影響を種々な化学療法剤と比較し、lysostaphin, cephaloridine, ampicillin, propicillin, penicillin G は腎内菌数を減少させるが、その他の合成ペニシリン, kanamycin, lincomycin などは腎内菌数を減少させないことを報告している。著者らも chlortetracycline および erythromycin について感染直後に1回皮下注射し腎内菌数の消長を追求したが明瞭な治療効果を示さなかつた。すなわち、感染7日後についてみれば chlortetracycline (武田薬品工業株式会社製) では 100 mg/kg 投与群で 2/6, 10 mg/kg 投与群で 4/6, erythromycin (塩野義製薬株式会社製市販品より再結晶した) では 100 mg/kg 投与群で 3/6, 10 mg/kg 投与群で 4/6 に対照群とはほぼ同程度の菌数を認めた。しかし、Enduracidin では 4 mg/kg 投与群で全例, 2 mg/kg 投与群では 5/6, 1 mg/kg 投与群では 3/5 に菌が検出できず、菌を検出した例でも対照群にくらべ著しく少なか

つた。このことはさらに病理組織学的にも確認され、感染 10 日目の対照群の腎では各所に好中球の集簇巣(化膿巣)がみられたが、2 mg/kg 投与群ではわずかに血管周囲間質にリンパ球、単球および組織球の結節がみられたにすぎない。

*In vitro* における Enduracidin, chlortetracycline, erythromycin の *Staph. aureus* 308A-1 に対する最少発育阻止濃度はそれぞれ 0.78, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  で、*Staph. aureus* 308A-1 の静脈内感染—薬剤の皮下注射による治療効果 ( $\text{ED}_{50}$ ) はそれぞれ 1.76, 1.47, >100 mg/kg であり、いずれも各薬剤の腎内菌数を指標とした治療効果と相関を示さなかつた。

先に  $\text{ED}_{50}$  を求めた実験<sup>3</sup>と、本報告の実験とは感染量が異なる以外に感染経路ならびに治療方法には相違がないにもかかわらず、効果判定の方法が異なると各薬剤の治療効果はかなり異なつてくる。この治療効果の相違がいかなる機序によるか明らかでない。

松本<sup>6</sup>はマウスの皮下に薬剤を投与すると、tetracycline では数時間、腎に薬剤が認められるが erythromycin では速やかに消失することを報告している。一方、Enduracidin は血中濃度の持続が長く、腎ではさらに長時間、薬剤が持続する<sup>15</sup>。また chlortetracycline, erythromycin は静菌的に作用するが Enduracidin は著明な殺菌作用を示す。

薬剤の治療効果は *in vitro* における抗菌力ばかりでなく、生体内、特に標的臓器における消長、その他種々な要因によつて変化するものと思われる。

## 結 言

*Staph. aureus* を静脈内に感染したマウスの腎における感染菌の消長を指標として Enduracidin の治療効果を検討した。

Enduracidin の 4 mg/kg 投与群では *Staph. aureus* は腎に認められなくなり、2 mg/kg 投与群でも腎に感染菌はほぼ認められなくなつた。1 mg/kg 投与群では菌の消失したものは約 1/2 で、残りの動物では菌が認められたが、その数は対照群より明らかに少なかつた。0.5 mg および 0.25 mg/kg 投与群では対照群と変わらない消長を示した。

終りに臨み病理組織学的検索に御尽力下さつた生物研究所 白居敏仁博士に感謝する。

## 文 献

- 1) 河盛勇造：ブドウ球菌の実験的マウス感染症——特に化学療法剤の効果判定への応用——。モダンメディア, 8, 321, (1962)
- 2) 大藪卓：ブドウ球菌症の実験的解析, 皮下感染を利用する抗生物質の評価。日本細菌学雑誌, 22,

- 200, (1967)
- 3) KANJI TSUCHIYA, MASAHIRO KONDO, TOKIKO OISHI and TOSHIYUKI YAMAZAKI: Enduracidin, a new antibiotic III. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity J. Antibiotics 21, 147, (1968)
  - 4) McCUNE, R., DINEEN, P. and BATTEN, J. C.: The influence of antimicrobial agents on total populations of staphylococci in animal tissues. J. Immunol., 85, 44 7, (1960)
  - 5) McCUNE, R., DINEEN, P. and BATTEN, J. C.: The effect of antimicrobial drugs on an experimental staphylococcal infection in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci., 65, 91, (1956)
  - 6) 松本卓司 ブドウ球菌感染マウスを用いた実験的  
化学療法に関する研究。Chemotherapy, 11, 312,  
(1963)
  - 7) 野田俊策: ブドウ球菌感染マウスに対する各種抗  
生物質の併用効果に関する研究。Chemotherapy,  
13, 412, (1965)
  - 8) THOMPSON, R.E.M., WHITBY, J.L. and HARDING,  
J.W.: The treatment of experimental penicillin-  
resistant staphylococcal lesions with BRL 1241.  
Brit. Med. J. 2, 706, (1960)
  - 9) BROWN, D.M. and ACRED, P.: Chemotherapeutic  
studies on a new antibiotic BRL 1241, Lancet,  
1960 II, 568.
  - 10) SHILO, M.: The use of levan-enhanced dermal  
infections in rabbits in the study of *in vivo* activity  
of antibiotic substance. Brit. J. Exp. Path. 45, 187,  
(1964)
  - 11) HARRISON, E.F. and ZYGMUNT, W.A.: Lysostaphin  
in experimental infections. J. Bact. 93, 520, (1967)
  - 12) 土屋鏡司, 山崎俊幸: 抗酸性菌による非特異的感  
染抵抗性に関する研究. III. BCG 石炭酸死菌前処  
置マウス体内における *Staph. aureus* の運命につい  
て。日本細菌学雑誌, 20, 493, (1965)
  - 13) 滝沢隆安, 小口房子, 田嶋嘉雄: マウスにおける  
実験的ブドウ球菌症静脈内接種, I, 菌株間の毒力  
の比較。日獣誌, 22, 381, (1960)
  - 14) 滝沢隆安, 小口房子, 田嶋嘉雄: マウスにおける  
実験的ブドウ球菌症, II, 三菌株とマウス反応との  
関係。日獣誌, 23, 307, (1961)
  - 15) 棚山薫晴, 山崎俊幸, 畚野豪, 荒蒔義知: Endura-  
cidin の生体内運命, I, ウサギにおける血中濃度,  
体外排泄および体内分布。日本化学療法学会東日  
本支部総会で発表

## EFFECT OF ENDURACIDIN AGAINST EXPERIMENTAL RENAL STAPHYLOCOCCAL INFECTION IN MICE

KANJI TSUCHIYA, MASAHIRO KONDO & TOKIKO OISHI

Biological Research Laboratories, Research and Development Division,  
Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka

Single subcutaneous dose of enduracidin ranging from 1 to 4 mg per kg was effective in reducing the number of bacteria in the kidneys of a intravenous Staphylococcal infection in mice. The result of this study recomfirmed that enduracidin was useful in Staphylococcal infection.