

Enduracidin に関する検討

とくに寒天平板拡散法による濃度測定ならびに感受性測定について

金 沢 裕 倉 又 利 夫

新潟鉄道病院

抗グラム陽性菌性新抗生物質 Enduracidin についての基礎的検討として、寒天平板拡散法による体液中濃度測定、ならびにディスクによる感受性測定法、および一部臨床的検討を行なったので報告する。

I. 薄層平板法による濃度測定法

実験材料ならびに実験方法

さきに私ども^{1),2),3),4)}が多くの化学療法剤の体液中濃度測定法として、微量の検体 (0.05 ml 程度) で、しかも低濃度まで測定しうることを報告した薄層平板カップ法を用いた。

検定菌：多くの薬剤に高感受性を有し、しかも芽胞浮遊液として長期保存に耐えるので、操作の便利な *B. subtilis* PCI 219 (ATCC 6633) を型のごとく調製し、 10^8 /ml 程度の芽胞を含むようにして用いた。

検定平板用培地：検定平板用基礎培地として感性ディスク用培地 (白水) pH 7.4, NaCl 濃度 0.8% を基礎培地として用いた。

実験方法：検定菌芽胞浮遊液を 1% の割合に溶解、培地に混和接種し、その 5 ml ずつをプラスチックシャーレに分注して机の上で水平に固めた。平板上にカップをおいて、被検体をカップに入れ、4 時間冷所放置後、14 時間程度培養した。

力価測定：出現した阻止円直径を垂直 2 方向から計測し、その平均値を求めた。

実験成績

培地 pH の影響：培地 pH を 6.4~7.8 に調製して阻止円直径におよぼす影響を検討した。Fig. 1 に示すようにアルカリ側で阻止円が増大し、鋭敏度の向上する傾向がうかがわれた。

サンプル pH の影響：ついで培地 pH を 7.8 に調製した平板上に、各種 pH の Buffer および Plasma に標準濃度を含有させ、サンプル pH の阻止円におよぼす影響を観察した。Fig. 2 に示すように、サンプルの pH もアルカリ側で阻止円の増大がみられた。

検定平板中 NaCl, KCl 濃度の阻止円におよぼす影響：Colistin, Polymyxin B などの Polypeptide 系抗生剤は NaCl, KCl などの無機塩により、その抗菌力および培地中の拡散が影響されることが知られているので、同様 Polypeptide 系の本剤のこの点についても検討を加えた。培地中 NaCl 濃度の規定されている感受性ディスク用培地 (NaCl 0.8%) に NaCl, KCl を追加して、阻止円におよぼす影響を検討した。Fig. 3 に示すように、NaCl 濃度の増加につれて阻止円は拡大し、2.0~3.0% で最大に達する傾向がみられた。また KCl についても Fig. 4 に示すように阻止円におよぼす影響がみられたが、NaCl ほど著しくないようであった。

薬剤濃度と阻止円直径の関係：pH 7.8, NaCl 濃度

Fig. 1 Effect of pH of assay medium on the diameters of inhibition zones

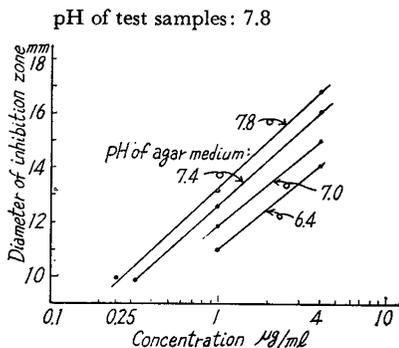
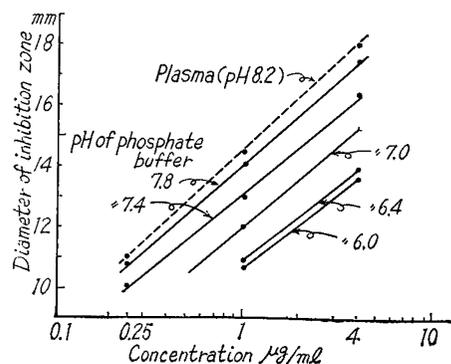


Fig. 2 Effect of pH of samples to be tested on the diameters of inhibition zones

Assay medium: Sensitivity disc (modified MUELLER-HINTON) agar pH 7.8



2.0% の検定用培地に、 Buffer 7.8 および Plasma に標準濃度を含有させ、上述の方法を行ない、薬剤濃度と阻止円直径の関係を検した。Fig. 5 にみられるように、薬剤の対数濃度と阻止円の直径の間にはほぼ直線関係が成立することがみられた。また血清中、Buffer pH 7.8 中の測定可能下限は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 程度であつた。

Fig. 3 Effect of concentration of NaCl in the assay medium on the diameters of inhibition zones
Basal medium: Sensitivity disc (modified MUELLER-HINTON) agar pH 7.8; NaCl 0.8%

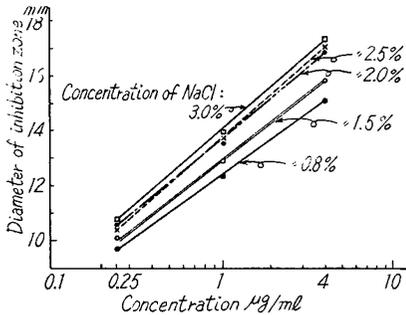


Fig. 4 Effect of concentration of KCl in the assay medium on the diameters of inhibition zones
Basal medium: Sensitivity disc agar

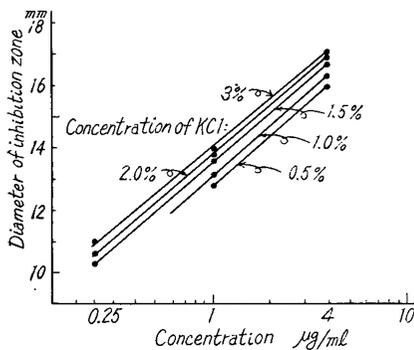
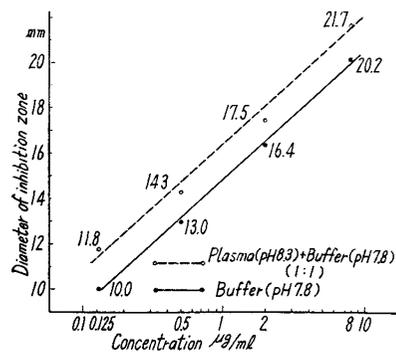


Fig. 5 Relation between concentrations and diameters of inhibition zones



測定法について

以上の成績からつぎの測定法が適当と考えられた。

検定培地：感性ディスク用培地 (NaCl 濃度 0.8%) に NaCl を追加 2.0% にし、pH も 7.8 に調整する。

サンプルの調製：検体は pH 7.8 の M/15 の 磷酸 Buffer に 2 倍以上に希釈 (血漿、血清は 2 倍、尿は 2~4 倍) して被検サンプルとした。標準サンプルも同様に希釈、標準濃度を含有させて調製した。

検定平板調製：前記培地を溶解し、検定菌 *B. subtilis* PCI 219 (ATCC 6633) 芽胞液 (約 $10^8/\text{ml}$ 濃度) を 1% に接種し、5 ml ずつ底の平らなシャーレに分注し薄層平板を作製する。カップを立て、標準ならびに被検サンプル 0.05 ml 以上をその中に滴下する。

培養：4 時間冷所 10°C 以下に放置し 14 時間培養する。

力価測定：出現した阻止円直径を垂直 2 方向から測定して平均値を求める。半対数方眼紙上に阻止円直径を整数目盛で、薬剤濃度を対数目盛でとり、標準サンプルについての座標をプロットして標準曲線を描き、その上に被検体阻止円直径に相当する濃度を求める。

濃度測定成績：実際上記の方法を利用して、本剤注射時の Plasma 中、および尿中濃度を測定した。Fig. 6 に示すように 50 mg または 100 mg 筋注では、2 時間後から血中に出現し、72 時間程度まで測定可能であり、最高は 1.0~1.2 $\mu\text{g/ml}$ 程度であつた。尿中濃度も

Fig. 6 Plasma levels after intramuscular administration in 3 adults

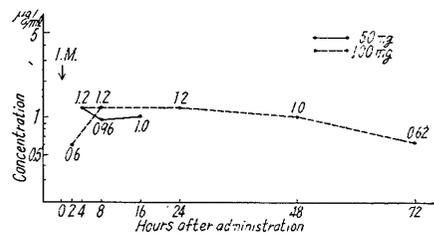


Fig. 7 Urinary levels and urinary excretions after intramuscular administration in 2 adults

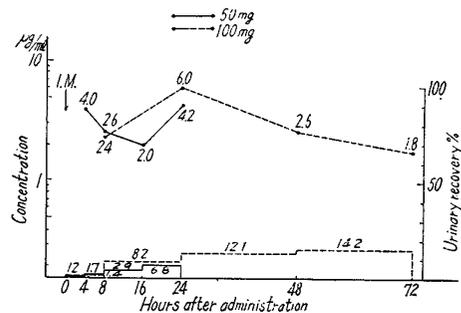


Fig. 7 に示すように 50, 100 mg 筋注で 2~6 µg/ml を示し、回収率は 24 時間 6~8%, 72 時間 14% 程度であつた。

II. 単一ディスク法 (Single disc method) による感受性測定法

ついで感受性測定法として多くの薬剤についてさきに検討を加えてきた単一ディスク法^{5), 6), 7), 8), 9)} (Single disc method) による本剤の感受性測定法に検討を加えた。

実験材料

培地：つぎのような組成の培地 (感受性ディスク用培地) を用いた。

Heart infusion	300 ml
Casamino acid	16.5 g
Starch	1.5 g
Glucose	2.0 g
L-Tryptophane	0.05 g
L-Cystine	0.05 g
Biotine	0.000005 g

Fig. 8 Organisms used in the experiment and their minimum inhibited concentrations (MIC)**

Organisms	No. of strains	$\frac{\log \text{MIC} - \log 0.0713}{\log 2}$									
		9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18					∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7					∴ ∴ ∴ ∴ ∴					
*β-Hemolytic streptococci (Group A)	9							∴ ∴ ∴ ∴ ∴			
*α-Hemolytic streptococci	10		∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴ ∴								
<i>Enterococci</i>	8			∴ ∴ ∴ ∴ ∴							
* <i>Diplococcus pneumoniae</i>	5						∴		∴ ∴		
* <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1										
* <i>Neisseria katarrhalis</i>	2										
* <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6							∴ ∴			
* <i>Hemophilus influenzae</i>	2				∴						
* <i>Bordetella pertussis</i>	1					∴					
<i>Escherichia coli</i>	3 ∴										
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 ∴										
<i>Klebsiella</i>	3 ∴										
<i>Salmonella</i>	3 ∴										
<i>Citrobacter</i>	1										
<i>Serratia</i>	2 ∴										
<i>Shigella</i>	2 ∴										
<i>Arizona</i>	1										
		8.8	4.4	2.2	1.1	0.55	0.27	0.137	0.067	0.034	0.017
	Total 86										

Inoculum size: approximately $1 \sim 10 \times 10^3 / \text{cm}^2$ cells
 * // $1 \sim 10 \times 10^4 / \text{cm}^2$ cells on 5% blood agar

** MIC: $\frac{1}{\sqrt{2}}$ of geometrical mean of the so-called MIC obtained by the two-fold agar dilution method repeated 6 times

Table 1 Influence of adding 5% sheep blood to the test medium on the MIC values obtained by the agar dilution method

Medium used: Sensitivity disc medium (modified MUELLER-HINTON agar, pH 7.4)

Bacterial strains employed: *Staph. aureus*28
Staph. epidermidis18
 α -Hemolytic *Strept.* ...10
Enterococci10
 Total66

Ratio of MIC ($\frac{\text{with blood}}{\text{without blood}}$)	Number of data obtained
4	2
2	26
1	36
1/2	2

Geometrical mean=1.34

Agar (Nissui) 15.0 g

Distilled water 1,000 ml

pH 7.3~7.4 NaCl 濃度は 0.8% に調製, 5%

にメン羊血液添加または非添加

供試菌株: Fig. 8 に示すような, 臨床検査の対象となることの多いと考えられる 19 種 86 株を用いた。

実験方法ならびに実験成績

希釈法による MIC 値の測定: 100, 50, $\mu\text{g/ml}$ と EDC の 2 倍希釈薬剤濃度含有の寒天平板培地上に, 発育のよいコロニー形成の比較的早い菌は cm^2 ずつ $10^3 \sim 10^4$ 程度に, コロニー形成のやや遅い菌は cm^2 ずつ $10^4 \sim 10^5$ 程度にそれぞれ接種した。37°C に 16~24 時間培養し, 肉眼的に発育阻止濃度を測定し, 6 回繰返してえた値の平均 (幾何) の $\frac{1}{\sqrt{2}}$ を最も信頼すべき MIC 値とした。

血液添加の影響: Table 1 に示すような菌株を用いて, メン羊血液 5% 添加, 非添加の際の MIC 値の変動を検し, 5% 血液添加で平均 1.34 程度の MIC 値の上昇がみられた。

ディスク法の実施: 内径 85~90 mm の規格型シャーレに培地を 20 ml ずつ分注し, 水平に固めた。ブドウ球菌, 腸内細菌およびその類似菌の場合は菌苔 1 白金耳程度を, 淋菌, ヘモフィルス, レンサ球菌, 肺炎球菌などの場合は, その数~10 白金耳を 1 ml の滅菌水または broth に懸濁し, その 1 白金耳を寒天平板上におとし, 20 個程度の小ガラス玉をゆりうごかして均等に拡げる。この際の接種菌量は前者では cm^2 ずつ $10^3 \sim 10^4$, 後者では $10^4 \sim 10^5$ 程度のことながたしかめられている。デ

ィスクをおいて直ちに培養し, 16 時間ならびに 24 時間後に判定した。さらに寒天平板上 cm^2 ずつ $10^6 \sim 10^7$ 程度に濃厚に菌を接種して 4 時間, 6 時間後にも測定した (迅速法)。

ディスクの薬剤含有量: EDC を 50, 30, 20, 10 μg 含有ディスク (直径 8 mm) を作製し, 普通法 (16 時間培養) による阻止円直径と MIC の関係を回帰曲線で求めてみた。Fig. 9 に示すように 50, 30 では曲線の彎曲が著しく, したがって MIC 推定の標準曲線としては測定精度の点で不適當であり, 一方 10 μg ディスクでは阻止円が小さく中等感受性菌を見逃すおそれがあると考えられたので, その中間 20 μg ディスクを用いることにした。

阻止円の計測 上述のそれぞれの方法によつて現われた阻止円直径を直角 2 方向から計測し, 平均値を求めた。また迅速法では 4 時間以内, 6 時間以内に肉眼的判定に充分な阻止円の現われた場合の 2 つのグループに分けて計測した。

標準曲線の調製: 普通法は 6 回, 迅速法は 2 回ずつ繰返して実施し, それぞれの菌株の阻止円を求めた。ついで阻止円直径と MIC 値の関係を示す回帰曲線を求めた (Fig. 10, Fig. 11)。

感受性測定法: 普通法で 1) 16 時間培養で測定に充分な阻止円が出現した場合 (普通法), 2) 16 時間培養で充分な阻止円が出現せず 24 時間で出現した場合は遅延法判定の曲線を用いて, ある程度 MIC を推定できるわけである。また迅速に感受性をしるために, たとえば 0.1 ml に 10 白金耳程度の菌を濃厚に浮游し, その 1~2 白金耳を寒天平板上にガラス玉法で接種して, 37°C 4 時間以内に計測に充分な阻止円が出現した場合には, 3) 迅速 3~4 時間の判定基準で, 5~6 時間で阻止円が出現した場合は, 4) 迅速法 5~6 時間の基準で感受

Fig. 9 Effect of drug content of disc on the regression curves correlating MIC with the diameters of inhibition zones

Disc: 8 mm in diameter; water absorption; 0.027 ± 0.004 ml

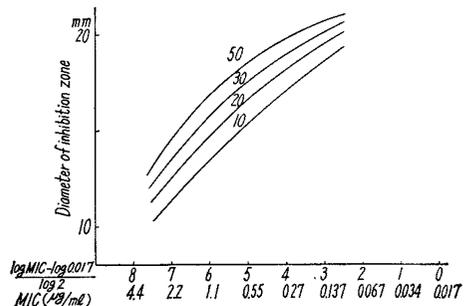


Fig. 10 Relation between MIC obtained by the dilution method and diameter of inhibition zone by the single-disk method

Enduracidin disc content: 20 µg
Conventional method: 16 hours incubation

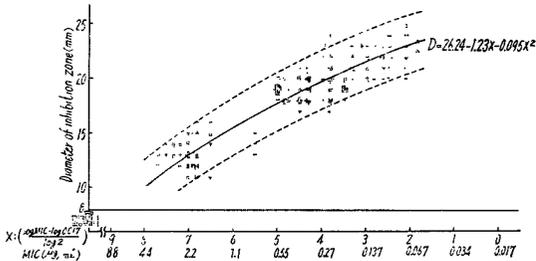
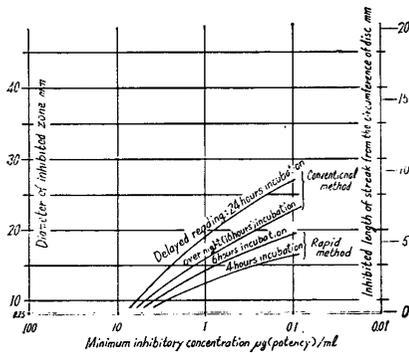


Fig. 11 Standard curve representing the relation between the size of inhibition zone and the minimum inhibitory concentration of enduracidin
Content of disc: 20 µg (potency)



性をスクリーニングすることができると思われる。
測定精度について、本ディスク法の測定精度を検討するために、各方式ごとにすべての成績の標準曲線からのへだたりの存在範囲を棄却限界の式 ($\alpha=0.05$) を適用して計算し Table 2 の値がえられた。また一方参考として寒天平板 2 倍希釈法の実験誤差を検討するために、2 倍希釈法の値を同一菌株について 6 回行なつた成績を集計して、各菌株ごとに 6 回の重複検査とみなして、その値の存在範囲の棄却限界を求めて Table 3 の成績がえられた。両者の比較にあつてはディスク法評価の基準となる MIC 値が、希釈法の実験誤差を必然的に含んでいるので厳密な比較はやや困難と思われるが、測定値の存在範囲の幅から推定する本ディスク法 (普通法) の測定精度は、多くの場合 2 倍希釈法にはおよばないが、ある程度それに近く、3~3.5 倍希釈法の精度にほぼ比適し、臨床的感性測定法としては充分用いられると考えられた。しかし迅速法では精度はやや低く、スクリーニング検査としての成績を示すにとどめるべきであろう。

Table 2 Range of deviation of MICs obtained by the single-disc method from the ones obtained by the agar dilution method expressed as rejection limit **, ** ($\alpha=0.05$)

Method	Range of diameter of inhibition zone in mm			
	9	15	20	25
Conventional over-night (approx. 16 hrs)	2.2-0.42	3.0-0.33		
		2.4-0.42	3.0-0.27	
delayed (approx. 24 hrs) incubation	3.0-0.33	3.3-0.30		
		3.2-0.31	4.1-0.24	
Rapid 3-4 hrs	4.1-0.24			
		4.8-0.21		
5-6 hrs	3.4-0.29			
		4.3-0.29		

* Rejection limit was obtained by the formula:

$$Y \pm T_{0.05} \sqrt{S^2_{yx} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{Sx^2} \right)}$$

where y = diameter of inhibition zone

$$x = \frac{\log \text{MIC} - \log 0.017}{\log 2}$$

S = variance from regression line

** Where MIC obtained by the agar dilution method is taken as 1.0; $\alpha=0.05$

Table 3 Range of deviation of MIC values obtained by the two-fold agar dilution method
Enduracidin

No. of organisms employed	No. of multiplicative test (N)	Rejection limit* ($\alpha=0.05$)
61 strains	61 $\left(\frac{366}{6} \right)$	2.3-0.48

* Where sample mean is taken as 1.0

$$\text{Rejection limit: } \pm St_{0.05} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

$$S: \text{ sample standard deviation: } \sqrt{\frac{\sum R^2}{N-1}}$$

$$R: \text{ differences of MIC values in the multiplicative test repeated 6 times } \left(\sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{5}} \right)$$

Table 4 Drug-sensitivity of β -hemolytic streptococcus (A group) isolated from tonsil (by single-disc method)

Drug	PC-G u/ml	SM μ g/ml	KM "	TC "	CP "	EM "	EDC "
MIC	0.06	26	60	1.2	8.2	0.12	0.25
Sensitivity	卅	+	+	卅	卅	卅	

III. 臨床使用経験

さらに1例ではあるが臨床的に使用し、また血中尿中濃度測定例をも含めて副作用についても観察した。

症例：32才女性、急性扁桃炎（溶連菌感染）3日前発熱、咽頭痛あり、最高38.5℃。42.9.20初診、咽頭発赤、扁桃腫脹し、膿栓多数附着、直ちにEDC 100mg筋注を3日間連続して行なつた。注射翌日から平熱となり、2日目から咽頭痛は消失、3日目来院時には咽頭は全く正常となつていた。初診時の咽頭膿栓から培養によりA群溶連菌を純培養のように検出した。分離A群溶連菌の薬剤感受性はTable 4のようであつた。

副作用について・本例を含めて体液中濃度測定例50mg 2回、100mg 5回（計7回、5ケース）の筋注で、いずれも注射局所痛は軽度で硬結発赤はみられなかつた。

IV. 考案ならびに結語

新抗生剤としてのEuduracidinの基礎的検討として、寒天平板拡散法による濃度測定を検討したが、本剤はPolypeptide系薬剤であるので、培地中拡散は必ずしも良好ではないが、培地およびサンプルのpHをアルカリ側に、また培地食塩濃度を2%程度に調製することにより測定感度をあげ、他の多くの抗生剤と同様に薄層平板拡散法で体液中濃度を充分測定しうることをたしかめえた。

さらに感受性測定法として検討を加えたが、とくにEDCのように新たに出現した薬剤の臨床的感性、耐性の限界に相当するMIC値の基準は全く不明で、起因菌に対するMIC値と薬剤投与による臨床効果の多くの集計の上に将来定められるべきものであり、必ずしも根拠の明らかでない十、一などの成績が検査室から天降り式に臨床家におしつけられるべきものではなく、適当に規定された実験条件でのMICを推定することが、臨床的感性検査の目的であると考えられる。この目的にそう意味で私どもは、単一ディスク（Single-disc）法についてもたびたび検討を加えてきたが、今回はEDCについ

ても本法が適用されることがたしかめられた。

本剤はPolypeptide系薬剤であるので培地中の拡散速度がおそく、MIC推定の標準曲線がやや彎曲し、したがつて測定精度もColistin, Polymyxinなどをのぞく他の多くの薬剤に比しやや劣る傾向がみられたが、2倍希釈法の測定精度の幅を考慮すれば、臨床検査としてはある程度用いられるものと考えられた。

以上、EDCについての基礎的検討を行ない、

- 1) 体液中濃度測定法として薄層平板拡散法が適用され、その測定下限は血漿中0.1 μ g/mlであつた。
- 2) 感受性測定法として単一ディスク（Single disc）法が適用されることがたしかめられ、測定精度についても2倍希釈法のそれと対比しつつ検討を加えた。
- 3) 臨床的にはまだ充分な検討を行なっていないが、今後検討の要ある薬剤との印象をうけた。

文 献

- 1) 宮村定男, 金沢裕：カップ法による体液中抗生物質濃度測定法について。臨床4(7)：678~689, July 1951
- 2) 金沢裕, 宮村定男, 倉又利夫：カップ法による体液中 Kanamycin 濃度測定法。J. Antibiotics, Ser. B 15(5)：295~296, Oct. 1960
- 3) 金沢裕, 倉又利夫：サルファ剤の生物学的活性濃度測定法ならびに2,3サルファ剤についての測定成績。Chemotherapy 8(5)：478~485, Sept. 1960
- 4) KANAZAWA, Y. & KURAMATA, T.: Assay method for biologically active isoniazid in body fluid by agar diffusion method using saprophytic mycobacterium as test organism. Chemotherapy 11(3)：176~179, 1963
- 5) 金沢裕：細菌の化学療法剤感受性測定法としての感受性ディスク法。Chemotherapy 9(1)：50~57, Jan. 1961
- 6) KANAZAWA, Y.: Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1961: 926~942, 1962
- 7) 金沢裕, 倉又利夫, 七里義雄：Lincomycinの体液中濃度測定法, 感受性ディスク法ならびに臨床経験。J. Antibiotics, Ser. B 18(2)：64~69, Apr. 1965
- 8) 金沢裕, 倉又利夫：臨床応用を目的とした感受性ディスク法の研究, 統報, とくに接種菌量ならびに直接法に関する検討。J. Antibiotics, Ser. B 17(5/6)：256~263, Dec. 1964
- 9) KANAZAWA, Y.: Single disc method for minimum inhibitory concentration (MIC) determination. J. Antibiotics, Ser. A 19(4)：175~189, July 1966

LABORATORY AND CLINICAL STUDIES ON ENDURACIDIN

YUTAKA KANAZAWA & TOSHIO KURAMATA

Niigata Railways Hospital

On a new antibiotic, enduracidin, some laboratory and clinical studies were performed and the results were summarized as follows:

- 1) Plasma level of enduracidin was assayed to the lower limit of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ by the thin-layer cylinder-plate method.
- 2) Employing 86 strains of 19 species of microorganisms, single-disc method was performed in parallel with the two-fold agar dilution method. As the results the standard curves representing the relationship between MICs and sizes of inhibition zones in the single-disc method were constructed.
- 3) No side effect was observed in 5 cases of intramuscular injections.