

Enduracidin に関する実験的ならびに臨床的研究

川上保雄・高橋昭三 本多俊晴 後藤 晋・前田克孝

昭和大学医学部 第一内科学教室

I. 緒 言

Enduracidin (EDC) は *Streptomyces fungicidicus* No. B 5477 の菌体から抽出精製された、グラム陽性菌に強い抗菌力を示す新抗生物質である。これはその物理化学的性状から塩基性のポリペプチド物質であることが知られているが、その構造式はまだ確定されていない。われわれはこの抗生物質について血中濃度、尿中排泄率、ポリペプチド性であるということからその抗原性の有無免疫血清の抗菌力に及ぼす影響、臨床効果などの点に関して検討する機会を得たのでその成績を報告する。

II. 実験方法

1) 血中濃度の測定

体重約 50 kg の 2 名の成人男子について Enduracidin 50 mg 力価を筋注射し、投与後 1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に血清を採取し、血中濃度を測定した。

測定法には検定菌として溶血性連鎖球菌 Cook 株を使用し、鳥居・川上による重層法を使用した。

2) 尿中排泄率の測定

血中濃度測定と同じ 2 例について、血中濃度測定と平行して 6 時間、12 時間、24 時間蓄尿の一部をとり、前述の方法で濃度を測定し、各時間毎に排泄量、回収率を求めた。

3) Enduracidin の抗原性に関する検討

成熟家兎に Enduracidin 50 mg 力価相当量 1 cc を Freund's Complete Adjuvant 1 cc と混合し、兎大腿部 4 カ所に、1 週 2 回、計 8 回筋注射し、感作終了後 10 日目に頸動脈より全採血して、抗 Enduracidin 家兎血清を得た。この血清について、Enduracidin の純末の磷酸緩衝溶液を抗原として BDB 処理血球凝集反応、免疫拡散法、PCA 反応を施行した。

i) BDB 処理感作血球凝集反応

抗原は EDC 純末を少量のメタノールに溶解し、それに、pH 7.2, 0.15 M の PBS を加えて濃度 1 mg/ml の溶液としたものを使用し BDB 法にて羊血球に結合せしめたものを感作血球として使用した。条件としては洗滌羊血球 0.05 ml, EDC 1 mg/cc, 溶液 0.5 ml 1 : 15 BDB

溶液 0.1 ml が適当と思われた。

被検血清はすべて非働化、羊血球による吸収操作を完了したものを使用し、10 倍よりの倍数稀釈系列を作成した。対照には正常兎血清の系列をおいた他、第 1 管目と同じ稀釈濃度 (10 倍) のものに非感作羊血球を滴下して反応をみた。

ii) 免疫拡散法

使用寒天は Difco Special Noble Agar で、生食水で 2% 寒天液を作製作用し、抗原濃度を 1 mg/ml として OUCHTERLONG 法で行なつた。

iii) PCA 反応

モルモットの腹部皮内に抗血清、対照として生食水をそれぞれ 0.1 ml ずつ注射して 3 時間放置し、その後 EDC 10 mg/ml 液 0.5 ml と Pontamin Sky Blue 2% 液 0.5 ml を混じ頸静脈より静注、40 分後反応を観察した。

iv) 抗 EDC 血清の抗菌力への影響

Heart Infusion Agar (栄研) 100 ml に対して馬血液 10 ml, 溶連菌の血液ブイヨン 24 時間培養液 0.05 ml の割合で加えたものに等量の抗 EDC 血清を加えて村田試験管に分注し、その上に 10 γ /ml より 2 倍稀釈系列で作成した標準 EDC 稀釈液を重層し、37°C 18 時間培養後生じた阻止帯の長さを測定し、免疫血清の代りに正常兎血清を添加した場合の阻止帯と比較することによって抗 EDC 血清の抗菌力に及ぼす影響を観察した。

さらにもう 1 つの方法として、抗 EDC 血清あるいは正常兎血清を培地中には添加せずに、標準 EDC 稀釈液に等量添加し 37°C 30 分温浴後村田試験管に分注した培地上に重層し、37°C 18 時間培養後阻止帯を比較した。

v) EDC 感作モルモットのアナフィラキシー反応

モルモット 3 匹に EDC 10 mg を Freund's Complete Adjuvant 0.5 ml と混合して 4 日間隔で 2 回感作して、感作終了後 7 日目に EDC 10 mg (PBS 溶液 1 cc) を静注してアナフィラキシー誘発試験を行なつた。

また同上のごとく感作したモルモットの腸管を用いて SCHULTZ-DALE 反応を行なつた。使用抗原濃度は EDC 5 mg, 10 mg, 15 mg で、対照として Histamin 3 γ を使用した。

4) 臨床的検討

気管支喘息に慢性気管支炎を合併する症例7例に1日100 mg 力価の EDC を筋注投与し、1週間投与前後の細菌学的検査、白血球数赤沈値、自覚症状の変化、副作用の有無について検討した。

III. 実験成績

1) 血中濃度

血中濃度測定の結果を表1、図1に示す。2例の平均値でみると、投与後3時間で最高値 2.1 γ /ml に達し、以後の漸減は比較的ゆるやかであり、EDC の有効濃度としている 1 γ /ml は 12 時間前後まで存続していた。

2) 尿中排泄

尿中排泄の結果は表1および図2に示すが、投与後6時間までの排泄率平均値は 5.3% で、12時間までで 12.4%、24 時間後で 19.1% であった。尿中排泄濃度が最も高いのは投与後6時間から 12 時間までの間で投与量の 9.1% がこの間に排泄されている。尿中濃度は 0~6 時間蓄尿で 4.3 γ /ml、6~12 時間で 14 γ /ml、12~24 時間で 4.5 γ /ml であった。

表 1 50 mg 筋注投与後の血中濃度および尿中排泄量

時 間										
	血中 濃度 (γ /ml)	尿 中 排 泄 値				血中 濃度 (γ /ml)	尿 中 排 泄 値			
		排 泄 量		累 積 排 泄 量			排 泄 量		累 積 排 泄 量	
		総量 (γ)	排泄率	総量 (γ)	排泄率		総量 (γ)	排泄率	総量 (γ)	排泄率
1	1.2					0.85				
3	2.1					2.1				
6	1.7	2550	5.1%	2550	5.1%	2.1	2700	5.4%	2700	5.4%
12	1.2	4200	8.4%	6750	11.5%	0.6	4900	9.8%	7600	13.2%
24	0.6	2700	5.4%	9450	19%	0.22	2015	4.03%	9615	19.2%

表 2 BDB 処理感作血球凝集反応

稀釈倍数 血清	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	対照
	EDC 感作血清	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	正常 兎 血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 3 抗 EDC 血清の抗菌力におよぼす影響

EDC 濃度 (γ /ml)		10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156
阻止帯 (mm)	抗 EDC 血清添加	4.4	3.2	2.8	2.2	1.4	1.0	0.6
	正常血清添加	4.5	3.2	2.8	2.4	1.5	1.0	0.8

3) EDC の抗原性

表2に示すように BDB 処理感作血球凝集反応では抗 EDC 血清で160 倍まで凝集を示し、正常血清では陰性であり、対照も陰性であった。

図3に示すように OUCHTERLONG 法でも Center の EDC 磷酸緩衝溶液 (1 mg/ml) と抗 EDC 血清との間に特異的沈降線を認めた。正常兎血清、生食水との間には沈降線は生じなかった。

PCA 反応では EDC 感作血清注射部位に相当して弱くはあるが明らかに特異的な色素斑を認め、対照の生食水注射部位では陰性であった(図4)。

図 1 血中濃度 (50 mg 筋注投与)

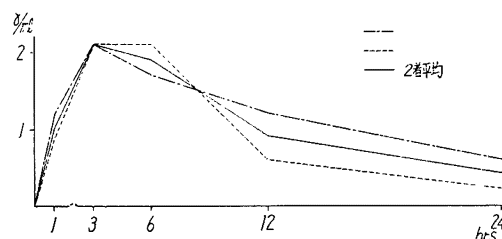
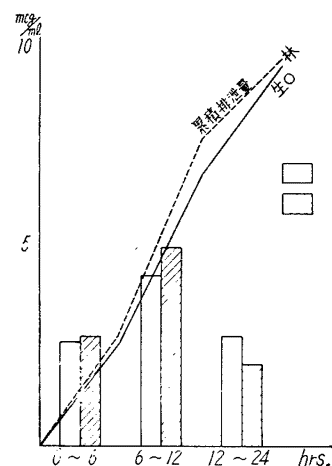


図 2 尿中排泄量 (50 mg 筋注投与)



4) 抗 EDC 血清の抗菌力に及ぼす影響

表3に示したように、培地中に抗 EDC 血清を添加した場合も、正常兎血清を添加した場合も重層した標準 EDC 稀釈液の各濃度において阻止帯長に差異を認めなかった。また抗血清をあらかじめ標準 EDC 稀釈液に添加し反応させてから重層した場合も、正常兎血清を添加した場合

図3 ゲル内沈降反応

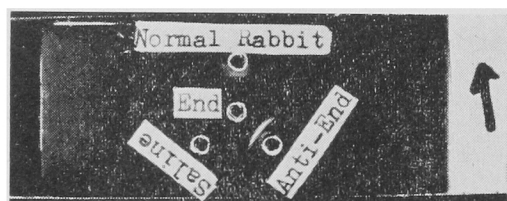


図4 PCA 反応

写真ではあまり明らかでないが、肉眼的には明らかに色素斑を認めた

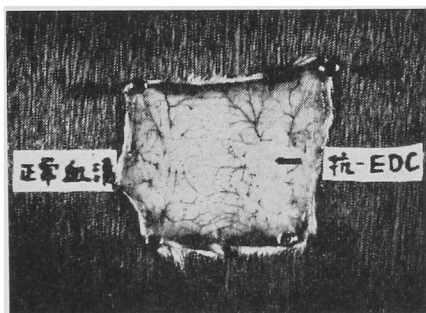


表4 EDC 感作モルモットのアナフィラキシー試験

モルモット	呼吸促迫 口辺をかく	横臥	痙攣	死亡
感作モルモット No. 1	+	-	-	-
No. 2	+	-	-	-
No. 3	+	-	-	-
非感作 正常モルモット	+	-	-	-

と比較し、阻止帯に差異を認めなかった。

図5 EDC 感作モルモットにおける SCHULTZ-DALE 反応



5) EDC 感作モルモットのアナフィラキシー試験

表4に示したごとく、抗原静注後、多少の呼吸促迫等の症状を認めたが、非感作モルモットにおいても同様の症状を認め有意の差を認めなかった。図5に SCHULTZ-DALE 反応の結果を示したが、5 mg, 10 mg, 15 mg の各濃度において明らかな腸管の収縮は認められなかった。

6) 臨床成績

投与した7例の成績を表5に示した。本剤投与後起炎菌とみなされる細菌の陰性化したものは7例中3例で、そのうち2例は溶連菌1例は肺炎双球菌であった。菌陰性化が認められなかった4例のうち1例は起炎菌が肺炎双球菌であったが、他の3例はすべてグラム陰性菌であった。投与後喀痰量減少等の自覚症状の改善を認めたものは7例中3例で、この3例についてはいずれも細菌検査で起炎菌の陰性化が認められており、この3例を7例中の有効例と認めた。副作用の点では1例に注射部位硬結を認めたのみで他の重篤な副作用は認められなかった

IV. 考按ならびに結語

われわれは Enduracidin について 50 mg 筋注投与時

表5 臨床成績

	細菌検査		白血球数		赤沈		自覚症状の変化	投与量 (mg/日)	副作用
	前	後	前	後	前	後			
K.K.	溶連菌(卅)	溶連菌(-)	10900	7200	15	3	喀痰量減少 発作軽減 (有効)	100×7	注射部硬結
M.H.	<i>Hemophilus</i> (卅)	<i>Hemophilus</i> (卅)	14500	6100	24	24	Leukocytose は改善されるも喀痰量減少せず (無効)	100×7	無し
S.A.	肺炎双球菌(卅)	肺炎双球菌(-)	7400	6500	15	7	投与後 喀痰量減少 発作軽減 (有効)	100×7	無し
Y.T.	溶連菌(卅)	溶連菌(-)	5400	7400	20	15	喀痰量減少 発作軽減 (有効)	100×7	無し
T.H.	肺炎双球菌(卅)	肺炎双球菌(卅)	8400	4400	7	50	喀痰量減少せずまた下熱せず(無効)	100×7	無し
K.N.	緑膿菌(卅)	緑膿菌(卅)	6200	4600	3	3	喀痰量減少せず 発作頻発(無効)	100×7	無し
Y.I.	<i>Neisseria</i> (卅)	<i>Neisseria</i> (卅)	4500	9300	8	4	喀痰量減少せず 発作頻発(無効)	100×7	無し

の血中濃度, 尿中排泄率, 抗原性の問題, 臨床成績等の点につき検討した。血中濃度は 50 mg 投与ではあまり高値を示さず最高濃度は 2.1 γ /ml にとどまり, 投与後 3 時間で peak に達する。しかし以後の漸減は比較的ゆるやかで, 12 時間目でも有効血中濃度に近い 0.9 γ /ml を示した。このことは有効血中濃度の長期持続という点で有利である。また尿中排泄率は比較的悪く 24 時間の累積回収率で 19.1% を示したにすぎないが, 尿中濃度は約 6.3 γ /ml となり, 有効濃度の点から考えると, 尿路疾患にも有効であろうと思われる。臨床成績の点では本剤はグラム陽性菌に強い抗菌力をもつことは明らかであり, われわれの成績でもグラム陽性菌感染症 4 例のうち 3 例に有効であった。グラム陰性菌感染症 3 例に投与してみましたが全例無効であった。またわれわれは本剤がポリペプ

タイド性抗生物質であることから重篤な副作用であるアナフィラキシーショックとも関連して, 本剤の抗原性ということの問題にした。われわれは Enduracidin をもつて兔を免疫することによつて兔血清中に Enduracidin と特異的に反応する抗体が生ずることを数種の免疫学的方法によつて証明した。そこでこの抗体が抗菌力に影響を与えるか否かについて検討したが, 今回のわれわれの成績では抗菌力に対する影響は認められなかった。またアナフィラキシー試験では, 陰性であったが, これは感作期間, 感作量の問題もあり今後検討を要する点であると思われる。しかし前述のごとく兔の免疫により簡単に特異的抗体が生ずることからも, Enduracidin の再度の使用時には, 重篤なアレルギー症状を生ずる可能性があり, 注意を要するものと思われる。

CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES ON ENDURACIDIN

Y. KAWAKAMI, T. TAKAHASHI, T. HONDA, S. GOTO & K. MAEDA

First Department of Internal Medicine, Showa University, School of Medicine

The results of some studies on enduracidin (EDC) were summarized as follows:

1. The levels of EDC in the blood and the urine were determined in two adult men who received 50 mg of EDC by intramuscular injection. The mean peak level of EDC in the blood was 2.1 mcg per ml and occurred about 3 hours after the injection. The urinary excretion rate was 19.1% in 24 hours.
2. EDC treatment was effective in 3 of 7 patients with respiratory infections. The bacteria cultured from the sputum of 3 patients who improved were gram-positive cocci; *Streptococcus hemolyticus* and *Diplococcus pneumoniae*, and disappeared after the treatment.
3. Anti-EDC-antibodies were found in the sera of rabbits sensitized with EDC. These antibodies were revealed by some immunological methods; agar diffusion method and BDB hemagglutination method, but these antibodies had no influences on the antibacterial activities of EDC. In our experiments, the provocations of anaphylactic shock and the SCHULZ-DALE reaction with EDC were not successful in the sensitized guinea pigs.