

3', 4'-Dideoxykanamycin B (DKB) にかんする研究

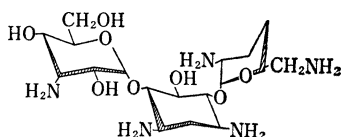
深谷 一太・真下 啓明

東大医科研内科

まえがき

KM の不活化機構の研究により、梅沢博士らは 3' 位の水酸基を磷酸エステル化されない水素に置換した 3', 4'-dideoxy-KMB が KM 耐性菌に対して抗菌力を有し、かつ緑膿菌に対しても有効であることを見出し、DKB として提供した^{1,2)}。その化学構造は Fig. 1 のようなもので、分子量 451.5 である。このものについて 2, 3 の基礎的検討を行ない、臨床に使用する機会をえたので報告する。

Fig. 1.



1. 方法ならびに成績

1) 感受性検査

日本化学療法学会標準法により、臨床分離の 2, 3 の菌種についての DKB に対する感受性を測定した成績は Table 1 のとおりである。黄色ブドウ球菌の MIC は 0.4 mcg/ml を中心に分布し、大腸菌では 3.1、緑膿菌では 0.8~1.6 を中心に分布してよい感受性を示し、耐性菌は見出されなかった。

緑膿菌について、臨床材料分離株と病室の流しからの分離株の両者の感受性を比較した成績は Table 2 のと

Table 1. Sensitivity of clinical isolates against DKB by standard plate method of JSC

MIC (mcg/ml)	<i>Staphylo. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudo- monas</i>	<i>Klebsiella, Entero- bacter</i>
0.1				
0.2	2*		1	
0.4	7		3	
0.8	1		6	1(Kl.)
1.6		1	5	1(Ent.)
3.1		6	1	
6.3		1		
12.5			1	
Total	10	8	17	2

* Including 209 P

Table 2. Comparison of sensitivities of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens and sinks in ward

MIC (mcg/ml)	No. of strains	
	Clinical isolates	Isolates from sinks
0.4	1	1
0.8	9	3
1.6	12	17
3.1	10	0
6.3	1	0
Total	33	21

おりで、MIC は臨床材料分離株で 0.8~3.1 mcg/ml に、流しからの分離株では 1.6 mcg/ml を中心に分布し、臨床材料分離株のほうが感受性がやや低いようであった。

Table 3 は DKB と GM の MIC を常法にて測定し比較したもので、黄色ブドウ球菌・大腸菌では同等また

Table 3. Comparison of MIC between DKB and gentamicin

Genera	DKB	GM	No. of strain
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	0.1	1
	0.2	0.2	1
	0.4	0.2	4
	0.4	0.4	3
	0.8	0.2	1
<i>E. coli</i>	1.6	1.6	1
	3.1	1.6	6
	6.3	6.3	1
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.2	0.2	1
	0.4	0.4	2
	0.4	0.8	1
	0.8	0.8	4
	0.8	1.6	2
	1.6	1.6	3
	1.6	3.1	2
	3.1	6.3	1
	12.5	6.3	1
<i>Enterobacter Klebsiella</i>	1.6	0.8	1
	0.8	0.4	1

は DKB が平板 1 枚の差で劣るものが多かつたが、緑膿菌では同等か逆に DKB が平板 1 枚だけすぐれているものがかなりの数にみられた。

Table 4 は接種菌量の比較を行なった成績で、常法のブイヨン 1 夜培養液をそのまま用いたときと、その 100 倍希釈液を用いたときの MIC 値の比較で、両者の数値

Table 4. Influence of inoculum size on MIC of organisms to DKB

Genera	Inoculum size		No. of strain
	Original	100-Fold dilution	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	0.1	1
	0.2	0.2	1
	0.4	0.1	4
	0.4	0.2	2
	0.4	0.4	1
	0.8	0.2	1
<i>E. coli</i>	1.6	0.8	1
	3.1	0.8	3
	3.1	1.6	2
	3.1	3.1	1
	6.3	6.3	1
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.2	0.1	1
	0.4	0.4	3
	0.8	0.2	1
	0.8	0.4	4
	0.8	0.8	1
	1.6	0.4	1
	1.6	0.8	4
	3.1	1.6	1
	12.5	12.5	1
<i>Enterobacter</i>	1.6	0.4	1
<i>Klebsiella</i>	0.8	0.4	1

Table 5. Bacteriostatic and-cidal MIC against DKB

Genera & strains		MIC (mcg/ml) of	
		Bacteriostatic	Bactericidal
<i>Staph. aureus</i> No.	1	0.2	0.8
	2	0.4	0.8
	3	0.8	1.6
<i>E. coli</i> No.	1	6.3	6.3
	2	25	50
	3	1.6	3.1
<i>Ps. aeruginosa</i> No.	1	1.6	3.1
	2	0.8	3.1
	3	0.8	1.6

の間には 2~4 倍の差のあるものが多かつたが、ときに差をみとめないものもみられた。

Table 5 は DKB の静菌的 MIC 値と殺菌的 MIC 値との比較を、型のとおり液体培養にて判定したのち、24 時間 subculture を行なつてみた成績である。その差は被検 3 菌種とも同等ないし 2 倍希釈 2 段階の間にあり、その殺菌的作用は強力と思われた。

Table 6 は HI ブイヨン培地中へ馬血清、各種金属イオン溶液を正常ヒト血清中濃度に近い濃度に (Ca), ま

Table 6. Influence of various substances upon activity of DKB against *Ps. aeruginosa*

Substances added to broth	(mcg/ml)	
	MIC	MBC
25% horse serum	0.8	1.6
10% horse serum	0.8	0.8
10 mM CaCl ₂	1.6	>3.1
1 mM CaCl ₂	0.4	0.8
0.5 mM CaCl ₂ +0.25 mM EDTA	≤0.2	0.4
10 mM MgSO ₄	0.8	1.6
1 mM MgSO ₄	0.4	1.6
5 mM MgSO ₄ +0.25 mM EDTA	0.4	0.8
1 mM FeSO ₄	>3.1	>3.1
5 mM FeSO ₄ +0.25 mM EDTA		>3.1
1 mM K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄	>3.1	>3.1
5 mM K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄ +0.25 mM EDTA	≤0.2	≤0.2
None	0.2	0.8

MBC : Minimum bactericidal concentrations

Table 7. Change of concentration of DKB after overnight incubation with *Pseudomonas aeruginosa*

Concentration predicted : 3.1 mcg/ml

Substances added to broth culture	Concentration measured (mcg/ml)
25% horse serum	4.3
10% horse serum	2.7
10 mM CaCl ₂	0.95
1 mM CaCl ₂	4.3
0.5 mM CaCl ₂ +0.25 mM EDTA	4.2
10 mM MgSO ₄	4.3
1 mM MgSO ₄	3.2
5 mM MgSO ₄ +0.25 mM EDTA	3.2
1 mM FeSO ₄	1.0
5 mM FeSO ₄ +0.25 mM EDTA	0.3
1 mM K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄	0.3
5 mM K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄ +0.25 mM EDTA	2.4
None	4.0

た濃厚な Mg, さらに濃い Fe を添加したさいの DKB の緑膿菌に対する抗菌力の変動をみたもので、無添加のさいの MIC は 0.2 mcg/ml であったものが、種々の値に増加を示し、とくに Fe, Ca, Al イオン添加時に著るしかつた。殺菌的 MIC 値もこれらの場合と同様に増大した。EDTA 添加では力価低下がみとめられないことが多かった。

Table 7 はこの実験のさいに菌の発育の有無に拘らず、予測値 3.1 mcg/ml を示す試験管の系列について、1 分間沸騰水浴に入れたのち遠沈した上清について、DKB の濃度を測定した成績である。菌の発育した試験管では、DKB 濃度が大幅に低下していることが認められた。

2) 実験的感染治療成績

Table 8 はマウスの背部皮下感染を型のとおりに黄色ブドウ球菌と緑膿菌についてそれぞれ行なったのち、DKB および GM を 5 日間筋注した治療実験の成績である。6 日目に屠殺して残存膿瘍の大きさを計測し、その面積の近似値の平均値をとって比較した。被検菌は両者にひとしい MIC 値を示すものを選んで接種した。結果

Table 8. Comparison of effect of DKB with GM against experimental subcutaneous infection to mice

Staphylococcus aureus: Original 24-hr culture

Pseudomonas aeruginosa: 5-Fold dilution of original

Treatment: 10 mg/kg/day I. M. for 5 days

Groups	Area of abscess (mm ²)				Level of*	
	<i>Staph. aureus</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>		Skin (mcg/g)	Serum (mcg/ml)
	Each	Mean	Each	Mean		
DKB	5.5×6		0			
	5×6.5		0			
	5×6	33	0	6.3	8.0	10.8
	6×8		3×3			
	5×4		4.5×5			
GM	6×8		0			
	5.5×6		0			
	5×4	34	0	11.3	7.5	13.5
	4.5×5		3×3			
	6.5×7.5		5×9.5			
Control	7.5×9.5		12×9			
	8×9.5	73	Died			
	8.5×8.5		Died			

* at 30 min. after I. M. injection

MIC to each: *Staph.* 0.2 mcg/ml

Pseudo. 0.8 mcg/ml

は同等で、対照群に比較し、著るしい膿瘍の縮小ないし消失をみとめた。最終日屠殺前 30 分に 1 回治療量の筋注を行なつておき、膿瘍形成部位周辺の皮膚濃度と血中濃度を測定したが、DKB の皮膚濃度は血中濃度の 74%, GM では 56% となり、ともに薬剤の移行をみとめた。

3) 濃度測定法

B. subtilis PCI 219 を指示菌として、heart infusion agar (栄研) を用いた薄層カップ法にて行ない、標準曲線は pH 7.4 磷酸緩衝液にて薬剤を希釈して作製した。

4) 血清蛋白結合率

セロファン透析法による馬血清蛋白結合率は Table 9 のとおりで、平均値は 12.5% と低率であり、KM と類似した値であつた。

5) 赤血球吸着性

めん羊血球を用い、型のように検討した赤血球吸着率は Table 10 のとおりで、著るしい低値を示した。

6) 胆汁中濃度

家兎に 50 mg/kg を筋注したのちの胆汁中濃度と血中濃度の検討は Table 11 のとおりで、血中濃度に対する

Table 9. Serum protein binding rate of DKB against horse serum using cellophane bag dialysis

Exp.	Concentration after dialysis (mcg/ml)		Rate (%)
	Against buffer	Horse serum	
I	1.7	1.5	11.7
II	5.8	4.7	18.9
III	14.3	13.3	7.0
Average rate		12.5%	

Table 10. Adsorption of DKB to sheep red blood cells

Ht (%)	Concentration of supernatant (mcg/ml)				
	0	12	24	36	48
I	5.5	—	12.5	13.0	16.5
II	8.3	14.5	24	24.5	26.5
III	26	32	43	37	38
Average rate of adsorption					—1.82

Table 11. Serum and bile level following DKB intramuscular injection to rabbit at dose of 50 mg/kg (mcg/ml)

Time after injection	20 min.	1 hour	Bile/Serum
Bile level	1.3	3.6	0.14
Serum level	25	9.5	

Fig. 2.

Organ level of DKB following intramuscular injection to mice at dose of 80 mg/kg.

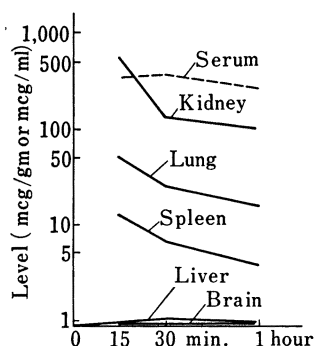


Table 12. Reduction of activity of DKB by mixing with homogenate of mice organs etc.

Materials	Rate of activity remaining after mixing (%)
Liver	2
Kidney	31
Lung	83
Spleen	78
Brain	62
Intestinal contents	3
Serum	>100

Original level : 10 mcg/ml

胆汁中濃度のピーク値の比は 0.14 となり、胆汁中への移行は少ないものと思われた。ただ 1 時間以後の観察を行なっていないので、さらにこの値よりいくぶん上昇したのかも知れないと思われる。

7) 臓器内濃度

マウス 1 群 3 匹に DKB 80 mg/kg を筋注したのち 15 分、30 分、1 時間にて型のとおり測定した臓器内濃度は Fig. 2 のとおりで、ピーク値は多く 15 分後にあり、その順序は腎、血清、肺、脾、肝となり、脳からは検出しえなかつた。

8) 臓器ホモジネートからの回収率

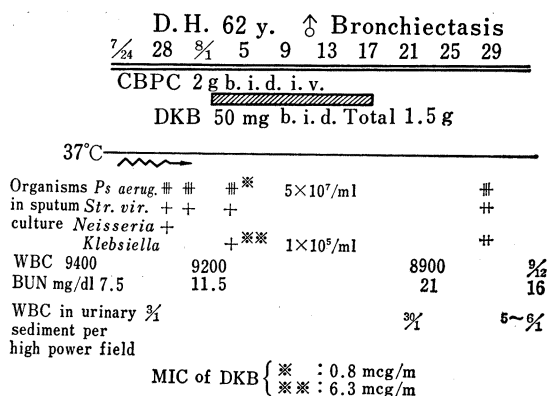
Table 12 のとおりで、肝、腸内容との混合により著しい力価の減少をみとめ、腎がこれに次ぎその他の各臓器においても少しずつの減少をみとめた。

9) 臨床使用成績

症例 1 D.H. 62 才、男 (Fig. 3)

気管支拡張症・肺気腫にて慢性に咳嗽・喀痰・呼吸困難のあつた患者で、長期間 CBPC 1 日 2 g ずつ 2 回静注

Fig. 3.



していたが、喀痰量多く、喀痰中から緑膿菌の検出が続くので、DKB 1 日 50 mg ずつ 2 回筋注を併用した。しかし喀痰量不変で、喀痰中の緑膿菌も同様の程度に出現し続け、無効と判定された。この例では DKB 投与前 BUN 11.5 mg/dl、尿沈渣中白血球が強拡大にて 1 視野 3 個程度であつたものが、投与終了 4 日目に BUN 21 mg/dl、白血球 1 視野 30 個程度とやや腎機能の低下を示唆する成績を示した。これは約 20 日後の検査では軽快していた。

症例 2 Y.I. 78 才、女 (Fig. 4)

脳卒中後遺症の意識障害にて、自発排尿なく膀胱洗滌を行なっており、慢性の細菌尿を呈している例であるが、*Proteus vulgaris* > 10⁵/ml であつたため CL を DKB にかえ 1 日 50 mg 2 回筋注を開始したところ、直ちに *Streptococcus faecalis* > 10⁵/ml と菌交代をみた。その後 DKB の連続注射が行なわれ、腸球菌が出現し続けた。尿所見その他にはとくに異常はみられなかつた。

症例 3 T.K. 49 才、男 (Fig. 5)

左下腿に静脈炎があり、該部に膿瘍を生じた。内容は血膿性で、緑膿菌を認めたので、先ず DKB 1 日 150 mg を分 3 にて筋注したが、なお証明されたので、CBPC 10 g

Fig. 4.

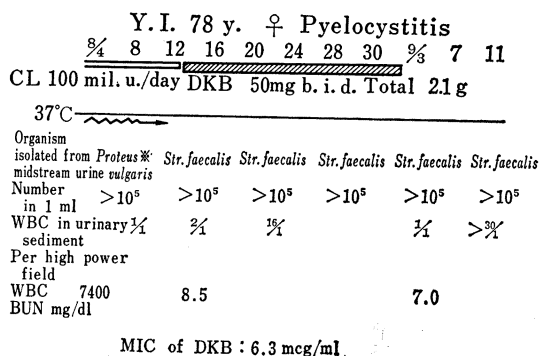


Fig. 5.

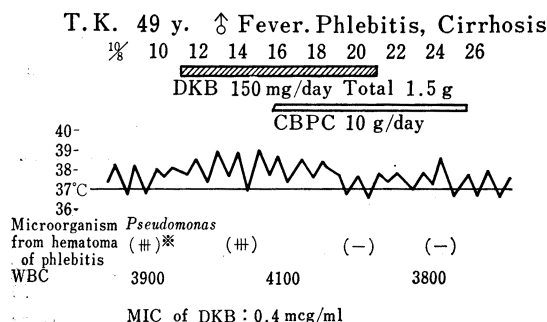
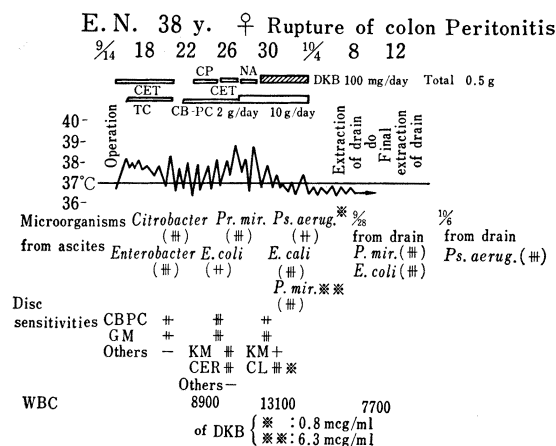


Fig. 6.



分2の静注を追加したところ菌は消失し、局所も治癒に赴いた。しかし発熱はほとんど影響をうけることなく終始した。基礎疾患として肝硬変がみられ、急激に悪化を辿った。

症例4 E.N. 38才、女 (Fig.6)

手術後大腸穿孔、腹膜炎を起した外科の症例で、腹水から種々の菌種を交代性に証明し、種々の抗生剤が組合わされて投与されたが、DKB 1日 100mg 分2筋注と、CBPC 1日 10g 分2静注の併用により始めて下熱、白血球数正常化、腹水減少をみとめ、ドレーンの抜去が可能となった。ただ緑膿菌は下熱後おそくまで証明されていた。症例1~4の分離菌のDKBに対するMIC値を液体培養・倍數希釈法にて測定した成績をFig.3~6に記入する。

2. 考 察

DKBは国産の新抗生剤であり、最近問題となつている緑膿菌・変形菌などのグラム陰性桿菌に抗菌力を有するので、その登場は大きな価値を有するといえよう。GMとの比較では、緑膿菌に対する抗菌力がややGMより優る菌株が多いとの成績をえたところからみると、

GMをしのぐ利点を有するともいえよう。体内分布にかんしては甲乙をつけ難い。副作用の点では、聴力障害が恐れられたが、GMより弱いという報告がみられる。腎毒性もGMと同程度とされている。GMより優るとも劣らない抗生剤と考えられる。

私共の臨床成績からみると、慢性症に対しての使用のため、DKB単独では尿路感染症以外はなかなか除菌効果を達成し難く、CBPCとの併用によりはじめて目的を達した例を経験した。しかもCBPCの10g以上の大量投与との併用例において成功したことは、DKBの緑膿菌に対する抗菌力が如何にすぐれていても、その1日使用量がmgの単位に押えられ、除菌の目的を達成しえないのであろうか。GMについても同様のことがいえ、共通の難点といわざるをえない。SM、KMのレベルまでの使用量が可能となれば、単独投与で、緑膿菌の全身感染症を適確に治癒せしめうる望みも出てくるものと思われる。

DKBは耐性機構の研究により、KMBから耐性菌にも有効な物質としてつくり出されたものであつたが、DKBもまた細菌由来の酵素により不活化され、mono-adenylate, guanylate, inosinate となることが見出されている^{3,4)}。またDKBの100mcg/mlで生育を阻止されない緑膿菌も見出されており、Mono-N-acetyl誘導体を生ずると報告されている⁵⁾。かく細菌類にはDKBをも不活化する酵素が種々存在することが示唆され、さらにこれに乗越え、同様の考察の下に、不活化されない新しい誘導体が生み出されて来ることを期待しえよう。なお当分の間はDKBが充分の偉力を発揮し続けると予想される。

3. 結 論

新しい国産の抗生物質DKBについて、2,3の基礎的臨床的検討を行ない、次の成績をえた。

1. DKBの抗菌力をGMと比較したところ、緑膿菌の感受性は同等またはGMより2倍希釈1段階すぐれ、黄色ブドウ球菌・大腸菌に対しては同等または1段階劣る成績であつた。
2. DKBの作用は主として殺菌的と考えられた。
3. DKBの抗菌力は馬血清、Ca, Mg, Fe, Alイオンの添加により弱められ、EDTAを加えると回復を示すことが多かつた。
4. マウス黄色ブドウ球菌および緑膿菌皮下感染におけるDKBの治療効果をGMと比較したところでは、同等であつた。
5. 馬血清を用いるセロファン囊透析法による血清蛋白結合率は低く、めん羊血球を用いる赤血球吸着率も著るしく少なかつた。

6. 家兎筋注後の胆汁中濃度の血中濃度に対する比率は 0.14 と低かった。

7. マウス筋注後の臓器内濃度は腎にもつとも高く、血清、肺、脾、肝の順で、脳からは検出不能であつた。マウス臓器ホモジネートによる DKB の不活化は、肝で著るしく、腎がこれに次いだ。

8. 気管支拡張症の緑膿菌感染例に CBPC と併用して除菌不能、変形菌による慢性腎盂膀胱炎に単独筋注して菌交代をみた。また緑膿菌による下腿静脈炎化膿では CBPC と併用して除菌に成功し、治癒をもたらした。術後の穿孔性腹膜炎で、緑膿菌・変形菌・大腸菌などの混合感染の 1 例でも、CBPC との併用により臨床症状消退し、有効であつた。1 例に腎障害を一時的に示唆する検査成績をえた。

文 献

- 1) UMEZAWA, S., TSUCHIYA, T., MUTO, R., NISHIMOTO, Y. & UMEZAWA, H.: Synthesis of 3'-deoxykanamycin effective against kanamycin-resistant *E. coli* and *Ps. aeruginosa*.

J. Antibiotics 24 : 274~275, 1971

- 2) UMEZAWA, H., UMEZAWA, S., TSUCHIYA, T. & OKAZAKI, Y.: 3',4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *E. coli* and *Ps. aeruginosa*. *ibid.* 485~487, 1971
- 3) YAGISAWA, M., NAGANAWA, H., KONDO, S., HAMADA, M., TAKEUCHI, T. & UMEZAWA, H.: Adenyldideoxykanamycin B, a product of the inactivation of dideoxykanamycin B by *E. coli* carrying R factor. *ibid.* 911~912, 1971
- 4) YAGISAWA, M., NAGANAWA, H., KONDO, S., TAKEUCHI, T. & UMEZAWA, H.: Inactivation of 3',4'-dideoxykanamycin B by an enzyme solution of resistant *E. coli* and isolation of 3',4'-dideoxykanamycin B 2''-guanylate and 2''-inosinate. *ibid.* 25 : 492~494, 1972
- 5) YAGISAWA, M., NAGANAWA, H., KONDO, S., TAKEUCHI, T. & UMEZAWA, H.: 6'-N-Acetylation of 3,4'-dideoxykanamycin B by an enzyme in a resistant strain of *Ps. aeruginosa*. *ibid.* 495~496, 1972

STUDIES ON 3',4'-DIDEOXYKANAMYCIN B (DKB)

KAZUFUTO FUKAYA and KEIMEI MASHIMO

Department of Internal Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo

On a new antibiotic of home product, 3',4'-dideoxykanamycin B (abbreviated as DKB), several basic and clinical investigations were performed, and the following results were obtained.

1. The mean antibacterial activities of DKB against *Pseudomonas* strains compared with those of gentamicin (GM) were the same or superior to GM in one degree of two-fold dilution. In cases of *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, those of DKB were the same or inferior to GM in the same manner.

2. The mode of action of DKB was considered to be mainly bactericidal.

3. The antibacterial activity of DKB was weakened by the addition of horse serum, or Ca, Mg, Fe or Al ion and generally recovered again by the association of EDTA with each agent.

4. The comparison of the therapeutic effect of DKB with GM against experimental subcutaneous infection of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* to mice proved similar to each other.

5. The protein binding rate by cellophane bag dialysis using horse serum was low. The adsorption rate to red blood cells was also markedly low.

6. The ratio of biliary level to serum level after intramuscular injection into rabbit was as low as 0.14.

7. The organ level after intramuscular injection into mice ranked in order of kidneys, serum, lungs, spleen and liver, being undetectable in brain. The inactivation of DKB by organ homogenate of mice was the greatest in liver, being followed by kidney.

8. DKB was administered to 4 cases clinically, either with carbenicillin or alone. In 3 cases, causative organisms disappeared at any rate. In one case, slight elevation of BUN and increase of white blood cells in the urinary sediment were observed temporarily soon after the discontinuation of treatment.