

Lividomycin の抗結核作用に関する基礎的研究

五味二郎・青柳昭雄・鳥飼勝隆
山田幸寛・藤野忠彦

慶応義塾大学医学部五味内科

受付 昭和46年3月24日

THE FUNDAMENTAL STUDIES ON ANTITUBERCULOUS
ACTIVITIES OF LIVIDOMYCIN*

Jiro GOMI, Teruo AOYAGI, Katsutaka TORIKAI,
Yoshihiro YAMADA and Tadahiko FUJINO

(Received for publication March 24, 1971)

Lividomycin (LVM) is a new antibiotic agent which was produced from *Streptomyces lividus* n-sp ATCC 21178 isolated in Nagoya city. LVM was highly active in vitro against Gram-positive and negative organisms, as well as *Mycobacterium*. This paper presents the results of fundamental studies of antituberculous activities of LVM.

1. The minimal inhibitory concentration of LVM against $H_{37}Rv$ was 0.6 mcg/ml in Dubos albumin medium and 40 mcg/ml in Ogawa medium. This MIC was almost as same as that of Kanamycin. Against eight wild strains isolated from tuberculous patients, MIC of LVM was 1.25~20 mcg/ml in Dubos-albumin medium, and MIC of LVM was higher for KM resistant strains than for KM sensitive strains.

2. The elevation of the resistance of $H_{37}Rv$ in vitro to LVM was examined by the Step-by-Step method, and the maximal resistance at the ninth generation was 25 mcg/ml. The elevation of the resistance of $H_{37}Rv$ in vitro to Ethambutol was also examined by the same method, and maximal resistance at the ninth generation of the culture was 50 mcg/ml. By adding 0.2~0.3 mcg/ml LVM to EB, the resistance of EB remained at 2.5 mcg/ml after ninth generation.

3. There was no cross resistance between LVM and Viomycin. Strains highly resistant to LVM were also resistant to KM. Strains resistant to KM were partially resistant to LVM.

4. The binding capacity with horse serum was measured by the equilibrium dialysis method using the cellophane membrane. The results was 1.9~3.8% in case of 100 mcg/ml LVM and 12.9% in 50 mcg/ml.

5. The blood level of LVM in tuberculous patients after intramuscular injection were examined by Torii's diffusion method, using *Bacillus subtilis* (PCI-219 strain). The mean values of the blood level after one hour and six hour were 42 mcg/ml and 8 mcg/ml, respectively.

6. Therapeutic effects of LVM on the experimental tuberculosis of mice were recognized, but were slightly inferior to those of KM and VM.

It was proved by these fundamental studies that LVM had the antituberculous activities, but the therapeutic effects were slightly inferior to those of KM. But considering the partially cross resistance between LVM and KM, LVM may be clinically applied in some cases after

* From the Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan.

making clinical investigations.

緒 言

Lividomycin (以下 LVM) は興和株式会社東京研究所において、新しく研究開発された新抗生物質であり、名古屋市の土壌から分離された *Streptomyces lividus* n-sp ATCC 21178 より生産された。種々の基礎実験から、LVM はグラム陽性菌、陰性菌ならびに結核菌に広く感受性を示すといわれている。われわれは LVM の抗結核作用について基礎的研究を行なつたので、その成績をここに報告する。

実験は ① 試験管内抗菌力、② 試験管内耐性上昇の状況ならびに Ethambutol に LVM を添加したさいの Ethambutol (EB) 耐性上昇に及ぼす LVM の影響、③ Kanamycin (KM), Viomycin (VM), Capreomycin (CPM) ならびに LVM との交叉耐性、④ 馬血清蛋白と LVM の結合率、⑤ 血中濃度、⑥ マウス実験的結核症に対する LVM の治療効果からなる。以下実験方法ならびに実験成績を述べ、考案する。

① 試験管内抗菌力

菌株は H₃₇Rv 株 (No.1) ならびに患者新鮮分離株 (No.2~9) を用い、培地は Dubos-Albumin 半流動培地および 1% 小川培地を使用した。菌の接種法は小川培地より、Dubos-Albumin 液体培地に 2 代継代して 1 mg/ml の菌液を作製し、この菌液を希釈して 10⁻² mg を接種した。判定は Dubos-Albumin 半流動培地では第 3 週目に、1% 小川培地では第 5 週目に行ない、その結果は Table 1 に示す通りである。

H₃₇Rv 株に対する最小発育阻止濃度は、Dubos-Albumin 半流動培地では 0.6 mcg/ml であり、1% 小川培地では 40 mcg/ml であつた。同時に施行した KM の最小発育阻止濃度は Dubos-Albumin 半流動培地では 0.6 mcg/ml であり、1% 小川培地では 10 mcg/ml であつ

た。次に患者新鮮分離株については、Dubos-Albumin 半流動培地では 1.25~20 mcg/ml であり、1% 小川培地では 40~400 mcg/ml であつた。それぞれの菌株について同時に KM の最小発育阻止濃度も求めてあるが、Dubos-Albumin 半流動培地にて最小発育阻止濃度 5~10 mcg/ml を示す菌株の LVM の最小発育阻止濃度は 1.25 mcg/ml であり、KM 5 mcg/ml では 2.5 mcg/ml, KM 100 mcg/ml では 10 mcg/ml, KM 200 mcg/ml を示すものに対する LVM の最小発育阻止濃度は 20 mcg/ml であつた。このように KM に高度耐性を示す菌株に対しては、LVM の抗菌力は減弱している。また 1% 小川培地では 40~400 mcg/ml と Dubos-Albumin 半流動培地に比べてかなり減弱した値を示す。

② 試験管内耐性上昇の状況ならびに EB に LVM を添加したさいの EB 耐性上昇に及ぼす LVM の影響について

Fig. 1. The Pattern of Resistance in Vitro (Step by step method)

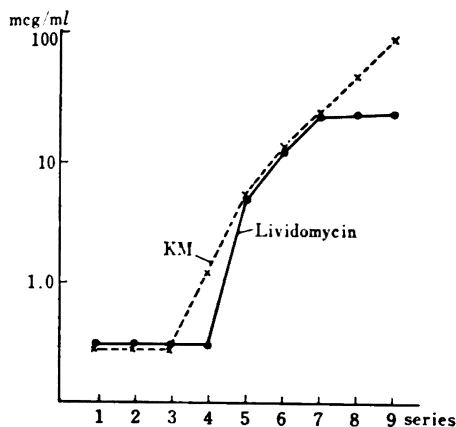


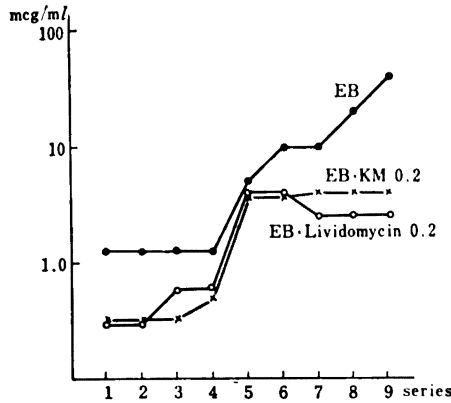
Table 1. In Vitro Study

Drug	Medium	Strains								
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
Lividomycin	Dubos-Albumin semiliquid	0.6	20	20	20	10	2.5	1.25	1.25	1.25
	1% Ogawa	40	400	400	400	400	80	40	40	40
	Inactivated rate	66.6	20	20	20	40	32	32	32	32
Kanamycin	Dubos-Albumin semiliquid	0.6	200	200	200	100	5.0	10	20	5
	1% Ogawa	10	400	~400	~400	~400	80	400	400	80
	Inactivated rate	16.6	2	2~	2~	4~	16	40	20	16

Drug concentration of the examination

	Dubos-Albumin semiliquid medium	1% Ogawa medium
H ₃₇ Rv strain (No.1)	0.6, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, mcg/ml	2.5, 5, 10, 20, 40, mcg/ml
Strain isolated from patients (No.2~9)	1.25, 2.5, 5, 10, 20, 100.	10, 20, 40, 80, 400.

Fig. 2. The Influence of LVM and KM against the Elevation of EB Resistance in Vitro



菌株は H₃₇Rv 株を用い、前述均等浮遊菌液を作製し、培地は Dubos-Albumin 液体培地を用いて、増量継代法により LVM の試験管内耐性上昇の状況を調べた (Fig. 1)。LVM は継代 5 代目より耐性上昇開始し、継代 7 代目にて 25 mcg/ml に達するが、7 代目より 9 代目まではさらに耐性上昇を示すことなく、耐性獲得は 25 mcg/ml である。同時に KM の試験管内耐性獲得状況を調べたが、KM は継代 4 代目より耐性上昇し、継代 9 代目では 100 mcg/ml であった。次に EB に LVM を添加したさいの EB の耐性獲得状況について調べた²⁾。菌株は H₃₇Rv 株を、培地は Dubos-Albumin 液体培地を用い、増量継代法によつた (Fig. 2)。EB 単独の場合には耐性獲得は継代 5 代目より耐性上昇開始し、継代 9 代目には 40 mcg/ml である。そこで EB に LVM 0.2 mcg/ml および 0.3 mcg/ml 添加して同じくその耐性獲得を調べると Fig. 2 の通りである。継代 3 代目より耐性上昇開始し継代 5 代目には 5 mcg/ml に達するが、第 7 代目より 2 mcg/ml となる。LVM 0.2 mcg/ml または 0.3 mcg/ml 添加したさいの差は認められなかつた。同時に EB に KM を添加したさいの EB 耐性獲得状況も調べた。KM 0.2 mcg/ml または 0.3 mcg/ml 添加したさいには、継代 4 代目より耐性上昇し、継代 9 代目では 5 mcg/ml であった。

③ KM, VM, CPM ならびに LVM との交叉耐性について

実験方法は Dubos-Albumin 半流動培地を用い、前述の方法により作製した各種菌株の均等浮遊菌液より 10⁻² mg を接種し 3 週目にて判定した。

患者より新鮮分離した菌株 8 株について、KM と LVM との交叉耐性を調べた (Fig. 3)。KM 100 mcg/ml 耐性を示す菌株は 4 株あり、そのうち 1 株は LVM 10 mcg/ml 耐性、3 株は LVM 20 mcg/ml に耐性であった。他の菌株については図に示す通りである。

Fig. 3. Cross Resistance between KM and LVM

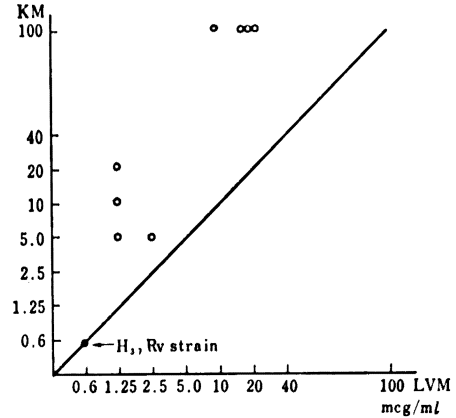
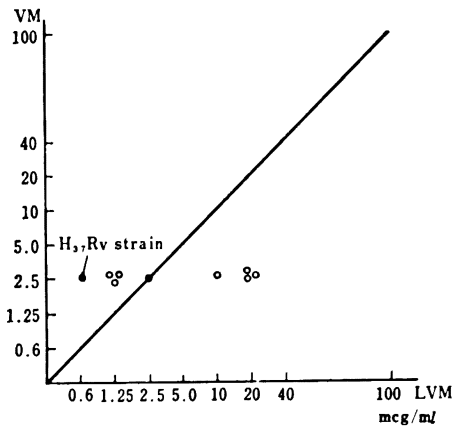


Fig. 4. Cross Resistance between VM and LVM



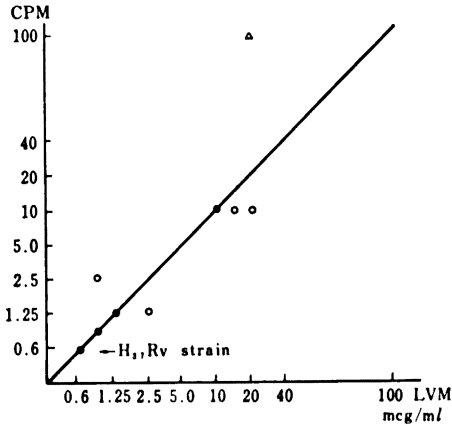
次に VM と LVM との交叉耐性である (Fig. 4)。同じく 8 菌株について調べたが、VM に単独耐性を示す菌株がなく、すべて VM の抗菌力は 2.5 mcg/ml であり、そのうち 3 株が LVM 20 mcg/ml 耐性であり、他の株は LVM に感性であった。なお LVM に 2.0 mcg/ml の感受性低下を示した菌株はいずれも KM に高度耐性の菌株であった。

CPM と LVM との交叉耐性は Fig. 5 に示すごとくである。CPM 単独耐性株が存在せず、図に示すごとく、CPM 感受性が低下している菌株に対しては、LVM の感受性もやはり減弱していることが認められた。

次に H₃₇Rv 株を用いて増量継代法により作製した KM, VM ならびに LVM のそれぞれに単独に耐性を示す菌株について交叉耐性を調べた (Table 2)。VM 50 mcg/ml 耐性に対し LVM は 5 mcg/ml 耐性、LVM 25 mcg/ml 耐性に対し VM 10 mcg/ml 耐性であり、VM とは交叉耐性は認められない。

次に KM 100 mcg/ml 耐性菌株に対しては、LVM 25 mcg/ml であり、LVM 25 mcg/ml 耐性に対しては、

Fig. 5. Cross Resistance between CPM and LVM



KM 100 mcg/ml 耐性であり, KM 100 mcg/ml 耐性に対しては LVM 25 mcg/ml 耐性であった。したがって KM 耐性菌株に対しては, LVM の感受性も減弱し, すなわち部分耐性であり, LVM 耐性には KM 耐性であると結論されよう。

④ 馬血清蛋白と LVM との結合率

Visking Tube を用いた平衡透析法により, 馬血清蛋白と LVM との結合率を測定した³⁾⁴⁾。測定条件は透析温度 10°C, 透析時間 72 時間, 内液は本剤を含む馬血清 4 ml, 外液は pH 7.4 リン酸緩衝液 16 ml とし, 透析膜は Visking Tube を用いた。Table 3 に示すごとく, 本剤 100 mcg/ml では 1.9~3.8% であり, 50 mcg/ml では 12.9% であった。同時に施行した KM では 8.7% であった。

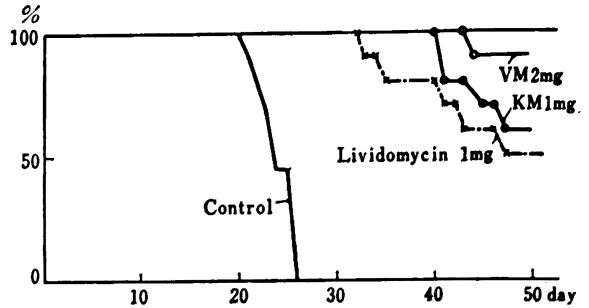
⑤ LVM の血中濃度

体重 50 kg 前後の成人男子ならびに女子 1 名ずつに本剤 1 g を筋肉内注射し, 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間後の血中濃度を Bacillus subtilis PCI-219 株を用い, 鳥井重層法により求めた (Table 4)。1 時間後に最高血

Table 2. In Vitro Study against Drug Resistant Strains Made in Vitro

	Drug mcg/ml	Drug concentration						Control
		100	50	25	10	5	1	
VM resistant bacilli	VM	-	±	+	+	+	+	+
	KM	+	+	+	+	+	+	+
	LVM	-	-	-	-	+	+	
KM resistant bacilli	KM	+	+	+	+	+	+	+
	LVM	-	-	±	±	+	+	
LVM resistant bacilli	LVM	-	±	+	+	+	+	+
	KM	+	+	+	+	+	+	
	VM	-	-	-	±	+	+	
	CPM	-	+	+	+	+	+	

Fig. 6. Survival Rate



中濃度に達し, その値は 2 例平均 42 mcg/ml であり, 次第に下降し 6 時間後には 8.0 mcg/ml となり, 2 例ともにはほぼ同等の値を示した。

⑥ マウス実験的結核症に対する LVM の治療効果について

平均体重 15 g の D-D 系マウス (雌雄混合) を 1 群 10 匹とし, 感染は Dubos-Albumin 液体培地に 10 日間培養した黒野株 7×10^8 コ/ml 浮遊菌液を尾静脈内より静脈内接種感染させ, 治療は感染翌日より開始し, 週 6 日間計 21 日間行なつた。治療は LVM 1 mg, KM 1 mg, VM 2 mg を用い, それぞれ皮下投与した。生存率より検討すると (Fig. 6) 感染コントロールに比べれば明らかに優れた効果を示したが, KM または VM 治療群に比べるとやや劣つた成績である。次に生存せるマウスを 7 週目に屠殺剖検し, ルート比肺重をみると, LVM は 101 であり, KM 108 または VM 107 治療群に比べれば優れた成績を示した。

実験成績総括

1. Dubos-Albumin 半流動培地における, LVM の H₃₇Rv 株に対する最小発育阻止濃度は 0.6 mcg/ml であり, KM とほぼ同等の抗菌力を有する。

2. 患者より新鮮分離せる菌株に対する LVM の最小発育阻止濃度は 1.25~20 mcg/ml であり, KM 高度 Table 3. Binding Rate with Horse Serum Protein

Drug concentration	Binding rate	
	No. 1	No. 2
100 mcg/ml	3.8%	1.9%
50 mcg/ml	12.9	

Equilibrium dialysis method
Dialysis time 72 hours

Table 4. Blood Concentration

Patients	Time	mcg/ml			
		30 min.	1 hour	3 hours	6 hours
Y. F. 20 y. ♀		30	44	26	9.1
T. O. 58 y. ♂		34	40	32	7.0
Average		32	42	29	8.0

耐性菌株に対しては、LVM の抗菌力は減弱する。

3. LVM の試験管内耐性上昇は増量継代法では、9代目に 25 mcg/ml 耐性である。

4. EB 単独の試験管内耐性上昇は増量継代法 9代目に 50 mcg/ml であるが、LVM を 0.2 または 0.3 mcg/ml 添加すると、継代 9代目で 2.5 mcg/ml の耐性におさえることができる。

5. LVM と VM の交叉耐性は認められない。LVM と KM との間には、LVM 耐性菌株に対しては、KM 耐性、KM 耐性に対しては LVM は部分耐性の関係にある。

6. 馬血清蛋白と LVM との結合率は、LVM 100 mcg/ml では 1.9~3.8% であり、50 mcg/ml では 12.9% である。

7. 体重 50 kg 前後の成人の血中濃度は、最高血中濃度は 1 時間後に平均 42 mcg/ml であり、6 時間後には 8 mcg/ml である。

8. マウス実験的結核症に対する LVM の治療効果は生存率では、対照群に比べれば優れた成績であるが、KM または VM 治療群に比べるとやや劣った成績である。

考 案

LVM の試験管内抗菌力は KM とほぼ同等の優れた抗結核作用を示す。試験管内耐性上昇の実験により LVM は高度耐性になりにくいことが認められた。さらに LVM を EB と併用すると、EB 単独使用時に比べて、EB の耐性上昇をおさえることができ、このことは臨床的応用に意義深いと考えられる。

LVM は KM の低または中等度耐性菌株には感性であるが、KM 高度耐性菌株には耐性である。したがって KM を使用して低または中等度耐性を示す場合あるいは予測される場合には、速やかに LVM を使用することができるであろう。しかし LVM 中等度耐性菌に対しては KM は高度耐性を示すので、KM に先だつて LVM を

使用することは不合理であると考えられる。

馬血清蛋白と LVM との結合率はやや低値を示した。このことは人の血中においても、同様に血中の遊離活性濃度が高く、局所組織内濃度が高いことが推察される。

マウス実験的結核症に対する治療効果から検討すると次のように考えられよう。ルート比肺重は病巣中の生菌数を比較的よく反映すると考えられている。しかし抗生物質の動物実験効果を判定するさいには、生存率のほうが比較的正確であると考えられる。今回の実験ではルート比肺重を検査した生存せるマウス数が少なくかつ必ずしも一定でないことから、マウス実験的結核症に対する治療効果については、生存率の結果を重じて、KM より劣る成績と考えるほうがよりよいであろう。

以上 LVM は優れた抗結核作用を有するが、KM にはやや劣るものと推察される。しかしながら LVM が純国産品であることは、現在なお長期治療を要する結核治療には経済的には有利である。またアレルギーあるいは中等度以下の KM 耐性のために KM を使用しえない症例に対して臨床応用の道が開けているものと推定されるが、臨床的応用可能であるや否やは今後さらに副作用等に関するいつそうの検討を要するであろう。

本研究の概要は、第 17 回日本化学療法学会東日本支部総会において報告した。

本研究に用いた Lividomycin は興和株式会社より提供を受けた。記して謝意を表する。

文 献

- 1) Lividomycin の研究, 興和株式会社。
- 2) 五味二郎: EB の耐性に及ぼす Lividomycin Tuberculin の影響 (日結研報告), 昭 45. 6.
- 3) 五味二郎 他: 化学の領域, 143, 増刊 91 号, 昭 45.
- 4) 山田幸寛: Keio J. Med., 19: 1, 昭 45.
- 5) 青木正和 他: 結核, 36: 355, 昭 36.