

原 著

Amikacin(BB-K8) の抗結核作用に関する基礎的研究

山本和男・桜井 宏
井上幾之進・山上 清

大阪府立羽曳野病院

受付 昭和 50 年 6 月 20 日

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE ANTI-TUBERCULOUS
EFFECT OF BB-K8Kazuo YAMAMOTO*, Hiroshi SAKURAI, Ikunoshin INOUE and
Kiyoshi YAMAGAMI

(Received for publication June 20, 1975)

Experimental studies were made on the anti-tuberculous effect of BB-K8, a new semisynthetic antibiotic derived from kanamycin A. This report presents results obtained from the experimental studies.

1) The minimal inhibitory concentration (MIC) of BB-K8 was determined for various drug-resistant strains of *M. tuberculosis* and *bovis*. As shown in the tables 1 and 3, the MIC of BB-K8 ranged from 0.3 to 0.6 mcg/ml in Dubos' liquid broth and from 25 to 50 mcg/ml in 1% Ogawa's egg medium. In this case, there was no difference in comparison between the MICs of BB-K8 and Kanamycin (KM). As shown in the table 2, however, the MIC of BB-K8 was 1.2 mcg/ml in Kirchner's semisolid medium and there were some strains, against which BB-K8 was somewhat more active than KM. H₃₇Rv strains highly resistant to SM, PAS, INH and RFP were sensitive to BB-K8, whereas H₃₇Rv strains highly resistant to KM and VM were similarly resistant to BB-K8 where cross-resistance between BB-K8 and the other two drugs was found.

2) Comparative studies between the MICs of BB-K8 and KM to *M. tuberculosis* strains isolated from patients were made using Kirchner's semisolid medium and 1% Ogawa's egg medium. As shown in the tables 4 and 5, the strains slightly resistant to KM were comparatively highly sensitive to BB-K8, but most of the strains highly resistant to KM were resistant to this drug as well.

3) In comparison between the effects of BB-K8 and KM on the survival days of mice experimentally infected with lethal doses of tubercle bacilli, BB-K8 at a concentration of 10 mcg/g had almost the same effect as that of KM at a concentration of 20 mcg/g, as shown in the figure 2.

4) In comparison between the serum concentration levels of BB-K8 and KM in man at 2, 4 and 6 hours after intramuscularly administered at a single dose of 0.5 g, the serum concentration level of BB-K8 was at all times higher than that of KM as shown in the table 6, though individual differences were considerably noted.

* From the Osaka Prefectural Habikino Hospital, Habikino-shi, Osaka 583 Japan.

緒 言

Amikacin (BB-K8) は Bristol-Banyu 研究所の川口らにより半合成された薬剤で、その構造式は、図 1 に示すごとく、Kanamycin A の 1 の位置の NH₂ に L(-)- γ -amino- α -hydroxy butyric acid を結合させたものである。

すでに、人の病巣由来の KM 耐性ブドウ状球菌、グラム陰性桿菌、あるいは緑膿菌等で解明されている KM 耐性の機作よりみると、本剤はアセチル化を受ける 6' の NH₂、ATP の存在下でリン酸化される 3' の OH、またアセチル化される 2' の OH が存在するにもかかわらず、Price ら²⁾によると、これらの菌の KM 耐性株にも優れた抗菌力を示すと報告されている。結核菌の KM 耐性の機作はまだ十分解明されるにいたっていないが、本剤に KM 耐性の結核菌にも同様の抗菌力を期待し、その抗結核作用を従来の KM と比較検討したので、その成績を報告する。

実験方法および成績

I. 試験管内抗菌力

1) 結核菌保存株に対する抗菌力

H₃₇Rv 株および増量継代培養法によつて得た同株の SM, PAS, INH, KM, VM, RFP 各剤に対する高度耐性株、人型結核菌黒野株、牛型結核菌ラベネル株に対する

BB-K8 の抗菌力を、Dubos 液体培地、Kirchner 半流動培地、1%小川培地を用いて KM と比較検討した。各培地中の BB-K8 および KM の濃度は、Dubos 液体培地では 0.05, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 mcg/ml、Kirchner 半流動培地では 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 mcg/ml、1%小川培地では 10, 25, 50, 100 mcg/ml とし、使用菌株は小川培地上の菌を Dubos 液体培地に移植増菌して、その 10⁻² mg 相当の菌量を各培地に接種した。

H₃₇Rv 原株およびその SM, PAS, INH, RFP の各耐性株、人型結核菌黒野株および牛型結核菌ラベネル株に対する BB-K8 の抗菌力は、Dubos 液体培地においては、表 1 のごとく、本剤の最小発育阻止濃度は 0.3~0.6 mcg/ml で、KM との間には差を認めなかつた。Kirchner 半流動培地においては、表 2 のごとく、本剤の最小発育阻止濃度は 1.2 mcg/ml で、KM より多少感受性の高い菌株が認められた。また、1%小川培地においては、表 3 のごとく、本剤の最小発育阻止濃度は 25~50 mcg/ml で、KM との間には差が認められなかつた。しかし、KM, VM の高度耐性株はいずれの培地においても耐性を示し、本剤と KM, VM との間には明らかに交叉耐性が認められた。

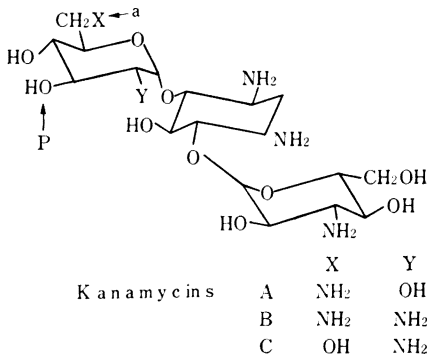
2) 結核菌患者分離株に対する抗菌力

KM 未使用患者、および KM 既使用患者より分離した人型結核菌株に対する本剤の抗菌力を、Kirchner 半流動培地および 1%小川培地を用いて KM と比較検討した。各培地中の本剤および KM の濃度は、Kirchner 半流動培地では 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 mcg/ml、1%小川培地では 25, 50, 100 mcg/ml とし、使用菌株は小川培地上の菌を Dubos 液体培地に移植増菌して、その 10⁻² mg 相当の菌量を各培地に接種した。

患者分離株に対する本剤と KM の最小発育阻止濃度を比較すると、Kirchner 半流動培地では、表 4 のごとく、KM の最小発育阻止濃度 2.5 mcg/ml 以下の菌株については、本剤も 2.5 mcg/ml 以下の最小発育阻止濃度を示したが、KM に対して 5 mcg/ml および 10 mcg/ml の最小発育阻止濃度を示した 6 株は、本剤ではいずれも 2.5 mcg/ml で発育阻止がみられ、KM 10 mcg/ml で発育阻止がみられなかつた 11 株では、9 株が本剤にも 10 mcg/ml 以上の耐性であつたが、2 株は 2.5 mcg/ml で発育が阻止された。1%小川培地では、表 5 のごとく、70 株中 47 株では本剤の最小発育阻止濃度は KM のそれと一致したが、本剤が KM より感受性の高い菌株は 21 株で、とくに、KM 100 mcg/ml で発育阻止をみた 6 株はすべて本剤では 25 mcg/ml で発育阻止がみられ、KM 100 mcg/ml 以上の耐性株 18 株のうち 16 株は本剤にも耐性を示したが、2 株は 25 mcg/ml で発育阻止がみられた。

Fig. 1.

Structure of Kanamycin



Structure of BB-K8

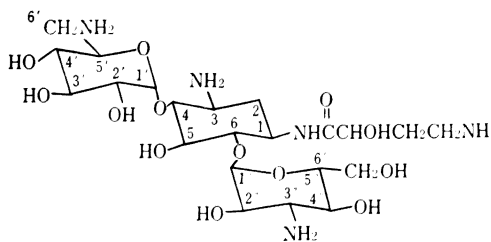


Table 1. Sensitivity to BB-K8 of various Drug-resistant Strains of *M. tuberculosis* and *M. bovis*

(Dubos' liquid medium)

Strain	Drug	Concentration of drugs (mcg/ml)								
		0	0.05	0.1	0.3	0.6	1.2	2.5	5	10
H ₃₇ Rv parent	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-	-
H ₃₇ Rv SM-resist	BB-K8	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-	-
H ₃₇ Rv PAS-resist	BB-K8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	KM	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv INH-resist	BB-K8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	KM	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv KM-resist	BB-K8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv VM-resist	BB-K8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv RFP-resist	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. tuberculosis</i> Kurono	BB-K8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	KM	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i> Lavenel	BB-K8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	KM	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Table 2. Sensitivity to BB-K8 of Various Drug-resistant Strains of *M. tuberculosis* and *M. bovis*

(Kirchner's semisolid medium)

Strain	Drug	Concentration of drugs (mcg/ml)							
		0	0.1	0.3	0.6	1.2	2.5	5	10
H ₃₇ Rv parent	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₃₇ Rv SM-resist	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₃₇ Rv PAS-resist	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	-	-	-	-
H ₃₇ Rv INH-resist	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₃₇ Rv KM-resist	BB-K8	+	+	+	+	+	+	+	+
	KM	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv VM-resist	BB-K8	+	+	+	+	+	+	+	+
	KM	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv RFP-resist	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. tuberculosis</i> Kurono	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. bovis</i> Lavenel	BB-K8	+	+	+	+	-	-	-	-
	KM	+	+	+	+	+	-	-	-

II. マウス実験的結核症に対するAmikacin (BB-K8) の治療効果

平均体重 20g の DD 系マウスの尾静脈内に人型結核菌黒野株の湿菌量 1.0mg を接種し、菌感染翌日より各群 10 匹のマウスに BB-K8, KM の各剤を体重 1g 当り 10mcg, 20mcg を毎日皮下注射し、無治療対照群の半

数が死亡した 26 日目で治療を中止し、45 日後まで各群の生存状況を観察した。その成績は、図 2 のごとく、延命効果よりみた両剤の治療効果は、BB-K8 10mcg 治療は KM 20mcg 治療に匹敵し、本剤 20mcg 治療は同量の KM 治療より優れた効果を示した。

Table 3. Sensitivity to BB-K8 of Various Drug-resistant Strains of *M. tuberculosis* and *M. bovis* (1% Ogawa's egg medium)

Strain	Drug	Concentration of drugs (mcg/ml)				
		0	10	25	50	100
H ₃₇ Rv Parent	BB-K8	††	†	7	—	—
	KM	††	†	8	—	—
H ₃₇ Rv SM-resist	BB-K8	††	†	—	—	—
	KM	††	†	—	—	—
H ₃₇ Rv PAS-resist	BB-K8	††	55	—	—	—
	KM	††	48	3	—	—
H ₃₇ Rv INH-resist	BB-K8	††	†	150	—	—
	KM	††	†	30	—	—
H ₃₇ Rv KM-resist	BB-K8	††	††	††	††	††
	KM	††	††	††	††	††
H ₃₇ Rv VM-resist	BB-K8	††	††	††	††	††
	KM	††	††	††	††	††
H ₃₇ Rv RFP-resist	BB-K8	††	††	95	32	—
	KM	††	††	106	44	—
<i>M. tuberculosis</i> Kurono	BB-K8	††	††	25	7	—
	KM	††	††	27	2	—
<i>M. bovis</i> Lavenel	BB-K8	††	3	—	—	—
	KM	††	7	—	—	—

Table 4. Comparison of Minimal Inhibitory Concentration of BB-K8 and Kanamycin to *M. tuberculosis* Strains Isolated from Patients (Kirchner's semisolid medium)

Concentration of KM (mcg/ml)	Concentration of BB-K8 (mcg/ml)					
	0.6	1.2	2.5	5	10	10<
0.6	3	5	1			
1.2	1		2			
2.5		7				
5			2			
10			4			
10<			2			9

Table 5. Comparison of Minimal Inhibitory Concentration of BB-K8 and Kanamycin to *M. tuberculosis* Strains Isolated from Patients (Ogawa's egg medium)

Concentration of Kanamycin (mcg/ml)	Concentration of BB-K8 (mcg/ml)			
	25	50	100	100<
25	28	1		
50	13	3	1	
100	6			
100<	2			16

Fig. 2. Effect of BB-K8 and Kanamycin on the Survival Days of Mice Experimentally Infected with Lethal Doses of Tubercle Bacilli

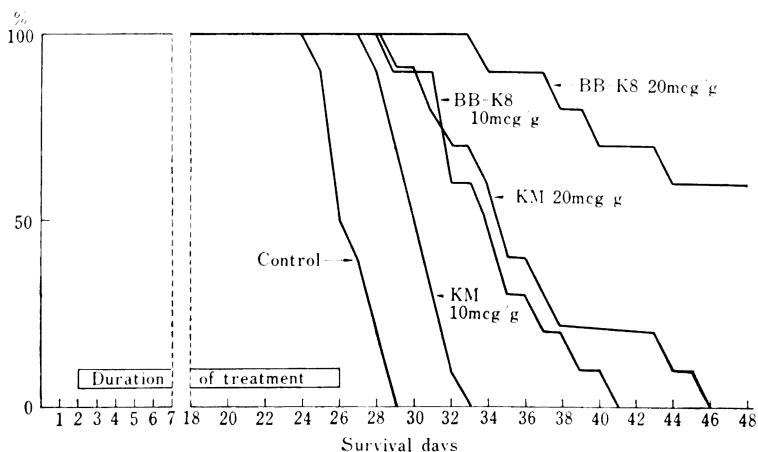


Table 6. Serum Levels of BB-K8 and Kanamycin in Man. after Intramuscular Injection of 500 mg (The thin-layer Cylinder-Plate Method was used, and B. Subtilis ATCC 6633 as a test organism)

Name (Body weight)	hours after injection	serum levels (mcg/ml)	
		BB-K8	KM
■ (75 kg)	2	49.5	20.0
	4	22.0	10.0
	6	5.7	3.5
■ (58 kg)	2	25.0	20.0
	4	18.0	12.0
	6	10.0	3.5
■ (68 kg)	2	59.0	29.0
	4	25.0	10.0
	6	17.0	4.9
■ (55 kg)	2	49.5	24.0
	4	17.5	8.4
	6	5.9	2.1

Ⅲ. Amikacin (BB-K8) の血中濃度

健康男子4名に BB-K8, KM おおの 0.5g を1週間の間隔をおいて筋肉内注射し、各注射後2時間、4時間、6時間後の血清中の濃度を B. Subtilis ATCC 6633 を用いて平板 cup 法で測定した。成績は、表6のごとく、かなりの個人差がみられたが、同一人における両剤の血清中の濃度を比較すると、いずれの時点においても BB-K8 の血清中濃度は KM のそれよりも高値を示した。

考 案

Amikacin (BB-K8) の一般細菌に対する抗菌力等については、すでにかなりの報告がなされているが、結核菌についての報告は少なく、わずかに岡ら⁴⁾、河盛ら³⁾⁵⁾の基礎的実験の成績が報告されているのみである。私どもは、BB-K8 の抗結核作用について検討を行ったが、その成績を総括すれば、次のごとくである。

1) BB-K8 の結核菌保存株に対する最小発育阻止濃度は、Dubos 液体培地では 0.3~0.6 mcg/ml、1%小川培地では 25~50 mcg/ml で、KM と差がみられなかつたが、Kirchner 半流動培地では 1.2 mcg/ml で KM よりも多少感受性の高い菌株がみられた。H₃₇Rv 株の SM, PAS, INH, RFP 各高度耐性株にも原株と同様の感受性を示したが、KM, VM 高度耐性株には同程度の耐性を

示し両剤の間には交叉耐性が認められた。また、患者分離株に対する本剤と KM の感受性を、Kirchner 半流動培地、1%小川培地を用いて比較した成績では、KM 軽度耐性菌に対しては、本剤の感受性の比較的高い菌株がみられたが、KM 高度耐性菌の大部分は本剤にも高い耐性を示した。

本剤の結核菌に対する抗菌力については、河盛ら³⁾は Dubos 液体培地での最小発育阻止濃度は 0.2 mcg/ml、岡ら⁴⁾は 0.195~0.39 mcg/ml であると報告し、KM との感受性の比較では、岡ら⁴⁾は Dubos 液体培地で本剤が KM よりも多少感受性の高い菌株があると述べ、河盛ら³⁾も、KM 軽度耐性の場合には、本剤に対して比較的感受性の高い事実を認めており、この点、私どもの成績と一致している。

2) マウス実験的結核症に対する BB-K8 の治療効果は、その延命効果よりみると、BB-K8 10 mcg/g 治療は KM 20 mcg/g 治療とほぼ同程度と考えられる。河盛ら³⁾は血清抗菌力(SSAAT)を検査し、BB-K8 の 400 mg 注射と KM 1g がほぼ等しいと報告しているが、これらの成績より、本剤の治療効果は KM の約2倍程度と考えられる。

3) BB-K8 および KM, 0.5 g 筋注2時間後、4時間後、6時間後の血清中濃度を比較すると、かなりの個人差はあるが、いずれの時点においても BB-K8 のほうが高濃度を示した。

以上の基礎的実験より、BB-K8 は KM の約2倍程度の抗結核作用を有する新抗結核剤であり、抗結核剤としては KM との交叉耐性に問題点があるが、KM 感受性患者には本剤の臨床応用が期待しうるものと考えられる。

なお本研究に用いられた Amikacin (BB-K8) は、万有製薬より提供されたものである。

文 献

- 1) Kawaguchi, H., Naito, T., Nakagawa, S. and Fujisawa, K.: J. Antibiotics, 12: 695, 1972.
- 2) Price, K. E., Chisholm, D. R., Misiek, M., Leitner, F. and Tsai, Y. H.: J. Antibiotics, 12: 709, 1972.
- 3) 河盛勇造・西沢夏生・真野大二: BB-K8 の抗結核菌作用, 日結研, 1973.
- 4) 岡捨己・今野淳・大泉耕太郎・佐藤秀雄・宮野文子: H₃₇Rv および患者株に対する BB-K8, DKB および Toburamycin の発育阻止効果, 日結研, 1973.
- 5) 河盛勇造・西沢夏生: BB-K8 投与後血清の抗結核菌作用, 日結研, 1973.