Cycloserineによるモルモットの実験的結核症の治療実験

立　花　暉　夫

国立予防衛生研究所結核部（部長 柳沢　謙）

受付 昭和31年12月27日

Cycloserine（ＣＳと略）は Harned ら[1] によつて分離された Streptomyces orchidaceus の産生する broad spectrum の抗生物質である。Welch ら[2]はＣＳが比較的弱いがしかし広範囲の抗菌力を有し，Penicillin に類似して種々の実験動物に対し低い毒性を示し，かつ経口投与後他の既知抗生物質に比してより高い血中，尿中濃度を維持することを報告している。Harned ら[1]，Hidy ら[3]の努力によつて，ＣＳの化学構造は D-4-amino-3-isoxazolidoneであることが確認され，また同時に別の独立した研究によつてHarrisら[4]が見出したStreptomyces garyphalusにより産生される新抗生物質Oxamycin[5~7]が全く同一の化学構造を有する物質であることが確認された[3]。さらにまた Streptomyces Javendulae strain 8197-20により産生される新抗生物質PA-94がShull ら[8]により，Streptomyces K-300 により産生される新抗生物質 Orientomycin が東海林[9]により，それぞれ D-4-amino-3-isoxazolidone であると同定された。

ＣＳの抗結核菌作用については，試験管内[5)10)~17)]では有効であり，マウスあるいはモルモットの実験的結核症に対してもある程度有効であり[5)11 18)19)]，Epstein ら[26)~28)]によつて人の肺結核症に対する効果が発表されている。

私は塩野義製薬の好意により入手した Eli Lilly 社製ＣＳを用いて，ＣＳ単独および Streptomycin（ＳＭと略）との併用による下記のような実験を実施した。

実験方法および成績

Ⅰ　試験管内における抗結核菌作用

10%馬血清加 Kirchner Sy-Ser 培地を用い，凍結乾燥して保存した強毒人型結核菌H_2株を0.1*mg*（20×10^5生菌単位）接種し，37°*C* 3週間後の肉眼的判定の結果は表1の如く，ＣＳの最低発育阻止濃度は50γ/*ml* であり，ＣＳはＳＭ0.1γ/*ml*，0.5γ/*ml* の併用により僅かながらＳＭとの協同作用を認めた。

表 1　Cycloserine の試験管内抗結核菌作用
ＣＳ，ＳＭ単独および併用時の抗菌作用

ＣＳ	0	5	10	25	50	100γ/*ml*
	⫼	⫼	⫼	+	−	−
ＳＭ	0	0.1	0.25	0.5	1	5 10γ/*ml*
	⫼	⫼	⫼	+	−	− −

ＳＭ＼ＣＳ	0	5	10	25	50	100γ/*ml*
0γ/*ml*	⫼	⫼	+	−	−	−
0.1	⫼	⫼	+	−	−	−
0.5	+	+	+	−	−	−

Ⅱ　モルモットの実験的結核症に対する治療実験

Ａ）実験方法：Römer 反応陰性，体重400*g* 前後のモルモットの左下腹部皮下に凍結乾燥して保存した強毒人型結核菌H_2株0.1*mg*（16×10^5生菌単位）を滅菌蒸溜水0.5*cc*に浮遊せしめて注射した。感染後4週を経過して，動物を次の4群に分ち，治療を開始した。

第1群：無処置対照群	13匹
第2群：ＣＳ単独治療群	13匹
第3群：ＳＭ単独治療群	12匹
第4群：ＣＳ，ＳＭ併用治療群	14匹

ＣＳは動物1匹当り1日 50*mg*，ＳＭは1匹当り1日2*mg*を，0.5*cc*の滅菌蒸溜水に溶解して腋窩部皮下に日曜日を除き毎日1回注射した。その際，ＣＳは pH の影響を受け易く[5,10,11 25)]，液体培地に添加された時[10,12]，あるいは生理的食塩水に溶解して保存されたとき[25)]，比較的不安定であつて時間の経過と共に分解の傾向を示すとの報告を考慮に入れて，注射に使用するＣＳの溶液は使用直前に新調したものを使用した。

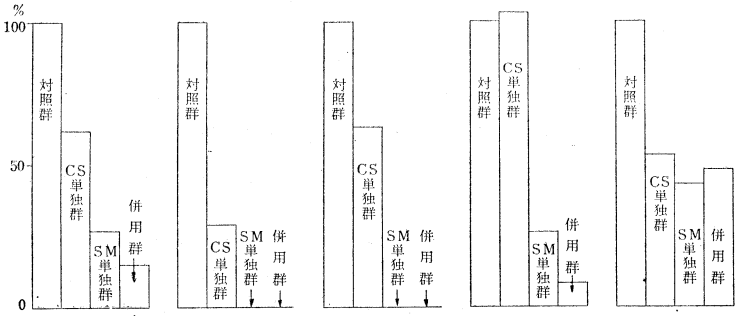
かくて，10週間治療後，すなわち感染後14週目に全群を屠殺剖見し，肺，肝，脾，局所リンパ腺について，1%KH_2PO_4加小川培地を用いて，組織乳剤の稀釈定量培養法により結核菌の分離培養を行つた。ただしこの際，肺，肝，脾，局所リンパ腺のそれぞれについて，各群において2匹ないし3匹の組織を混合し，一つの組織乳剤として処理した。

Ｂ）実験成績：剖見時の肉眼的結核性病変は表2に，また組織内結核菌の定量培養成績はすべて組織10*mg* 中の分離生菌数で表3に示した。表2に見る如く，第2群は第1群に比して病変の程度がやや軽度であるが，第3群には劣つている。第4群は第3群に比してさらにやや軽度であつた。またこのことは，表3の分離生菌数を比較してもいえるようである。

考　　察

ＣＳの試験管内における抗結核菌作用については，Cummings ら[10)]，Cuckler ら[5)]，Steenken ら[11)]および Renezetti ら[12)]は液体培地において人型結核菌$H_{37}Rv$株

表 2　剖見時肉眼的結核性病変および脾重のヒストグラム



〔注〕棒の高さは対照群の病変を100とした場合の各治療群の病変の程度を示す。脾重に就ても同じ。

表 3　剖見時の定量培養成績

群別	モルモットNo.	組織10mg中の分離生菌数			
		肺	肝	脾	局所リンパ腺
対照	1～2	79	2100	800	780
	3～4	0	0	9	60
	5～6	0	0	113	460
	7～8	>500	75	230	880
	9～10	1	1	58	430
	11～13	0	20	190	130
CS単独	14～15	80	0	30	1770
	16～17	2	0	1	160
	18～19	0	0	2	140
	20～22	0	20	210	65
	23～24	0	0	14	110
	25～26	50	20	14	170
SM単独	27～28	0	0	2	10
	29～30	0	0	0	
	31～32	0	0	0	10
	33～34	0	1	16	40
	35～36	0	0	110	80
	37～38	0	0	61	20
CS＋SM	39～40	0	0	0	1
	41～42	0	0	0	6
	43～44	0	0	2	6
	45～46	0	0	27	18
	47～49	0	0	2	39
	50～52	0	0	0	0

の最低発育阻止濃度は 10γ/ml 前後であり，SM耐性結核菌，INH耐性結核菌に対しても同程度に有効なりと報告している。わが国の報告[13)~17)]を見ても，使用した培地の種類，接種菌株，接種菌量等の差違によつて多少の差違はあるが液体培地での人型結核菌の最低発育阻止濃度は10γ/ml ないし50γ/ml であるとされている。私の実験では10%馬血清加 Kirchner Sy-Ser 培地を使用したが，Cummings ら[10)]，Steenken ら[11)]の報告する如く10%馬血清の添加によつて抗菌力の低下を見たのかも知れぬ。

また試験管内でのCSと他の抗結核剤との併用効果については，Cummingsら[10)]はINHとの間に協同作用を認め，SMとの間に協同作用も拮抗作用も認めず，五味ら[13)]は DHSM と軽度の併用効果を示すが著明な相乗効果とはいい難いとし，堂野前ら[13)]はINHとの間に協同作用を認めずとしているが，私の実験では僅かながらSMとの併用効果を認めるようである。

さてモルモットの実験的結核症に対するCSの治療効果については，Patnode ら[18),19)]，Steenken ら[11)]の報告があるが，前者はH_{37}Rv株0.1mgをモルモットに皮下接種して感染後7日目より約10週間治療した後全群を屠殺して肉眼的，組織学的および細菌学的所見を検索した。この際CSの1日の投与量は体重 kg 当り150mg，75mg および 37.5mg であつたが，肉眼的にはこの最高の投与量でごく僅かな治療効果を示したのにとどまり対照に比して著明な治療効果を認めず，脾臓よりの菌検出においても同様であつた。しかしながら組織学的にはCS治療群にある程度の治療効果を示していた。後者はH_{37}Rv株0.1mgを心臓内接種して感染後1週を経て治療を開始し最初の18日間は1匹当り1日の投与量を10mg，20mg および 40mg とし，続く10日間はそれぞれ15mg，25mg および 50mg とし，最後に続く20日間は全治療群に対して100mgとして感染後55日目に全群を屠殺し，各群の生存日数を比較したところ，どの投与量においても著明な治療効果を認めえなかつた。私の実験では感染方法は前者と同じであり，CSの投与量は1匹当り1日 50mg であつたが，大体前者の成績に近いかあるいはやや良い成績を示した。

in vivoでのCSと他の抗結核剤との併用については，マウスの実験的結核症に対して，Cuckler ら[5)]，五味ら[13)]はCS単独ではほとんど効果が見られなかつたが，DHSM と併用した場合には DHSM 単独の場合よりも優れた効果を示したと報告している。しかしモルモットの実験的結核症に対してはかかる報告はない。

さて，モルモットの実験的結核症に対する2種あるいは3種の抗結核剤の併用効果を研究するに当つては，Karlson, Feldman[20)]が主張する如く，それらの薬剤のうちの一つのみが maximumの治療効果を示すようなことのないように各薬剤の投与量は充分低いことが必要である。この見地から，彼等はモルモットの実験的結核症に対するPAS，TB1，INHのそれぞれとSMとの併用効果を検討する実験[21)~23)]においてはSMのsubeffective

doseである1匹当り2*mg*の投与量[18]を採用して，$H_{37}Rv$株 0.1*mg*皮下接種，3ないし4週後治療を開始し，6ないし10週間治療後屠殺剖見するという一定の実験方式で実験を行い，ある薬剤とSMとの併用効果を検討する際にはこの投与量が妥当であることを実証している。私は，岡，柳沢ら[24]の提唱した実験方式にしたがつて実験をすすめんとしたが，この方式は大体Karlson, Feldmanらの提唱する上述の方式にひとしく，したがつて私の実験についてもSMの投与量を1匹当り2*mg*とすることはCSとの併用効果を見るのに妥当であると考え，この投与量を採用した。しかし実験成績に見る如く，この投与量でのSM単独治療は充分な治療効果を示し，より少量の投与量の方がCSの併用効果を見るのによかつたのではないかと思われる。ともかく，CS 50*mg*単独治療群でもある程度の効果を示し，CS50*mg*とSM2*mg*との併用治療群は単独治療群に比してやや良好な成績を示しているようであるが，SMの投与量がより少量であつたならばより判然とした結果がえられたのではないかと推論される。

結　論

1) 試験管内において，Cycloserineの最低発育阻止濃度は50γ/*ml*であり，僅かながらSMとの協同作用を認める。

2) モルモットの実験的結核症に対して，CS 50*mg*単独治療では，SM 2*mg*単独治療には及ばないけれどもある程度の効果を認める。またCS 50*mg*とSM2*mg*との併用治療でもCSの併用効果は僅少ながら認められるようである。

柳沢部長，金井主任の御指導に深謝する。

文　献

1) Harned, R.L., Hidy, P.H. & Knopp, E.A. : Antib. & Chemo., 4: 204, 1955.
2) Welch, H., Putnam, L.E. & Randall, W.A. : Antib. Med., 1: 72, 1955.
3) Hidy, P.H. et al. : J. Am. Chem. Soc., 77: 2345, 1955.
4) Harris, D.A., Roger, M., Reagan, H.A., Wolf, F.J., Peck, R.L., Wallic, H., Woodruff, H.B.: Antib. & Chemo., 5: 183, 1955.
5) Cuckler, A.C., Frost, B.M., McClelland, L. & Solotorovsky, M. : Ibid., 5: 191, 1955.
6) Kuehl, F.A. Jr. et al. : J. Am. Chem. Soc., 77: 2344, 1955.
7) Stammer, C.H., Wilson, A.N., Holly, W.F., Folkers, K. : Ibid., 77: 2346, 1955.
8) Shull, G.M. & Sardings, J.L. : Antib. & Chemo., 5 : 398, 1955.
9) Jyun-Ichi Shoji : J. Antib., Ser. A., 9: 164, 1956.
10) Cummings, M.M., Patnode, R.A. & Hudgins, P.C. : Antib. & Chemo., 5: 198, 1955.
11) Steenken, W. Jr. & Wolinsky E. : Am. Rev. Tuberc., 73: 539, 1956.
12) Renezetti, A.D., Wright, K.W., Edling, J.H., Bunn, P. : Ibid., 74: 128, 1956.
13) 五味二郎・伊藤信也・栗田棟夫・青柳昭雄・井上礼太郎：日本化学療法学会雑誌，4: 278，昭31.
14) 海老名敏明・高階二郎・佐藤祐一・佐藤光三：文部省科学研究費結核研究班昭和30年度第2回班会議，於大阪，昭30. 11.
15) 堂野前維摩郷・河盛勇造・野村四郎：文部省科学研究費結核研究班昭和31年度第1回班会議，於東京，昭31. 6.
16) 貝田勝美：文部省科学研究費結核研究班昭和31年度第2回班会議，於京都，昭31. 11.
17) 内藤益一：文部省科学研究費結核研究班昭和31年度第2回班会議，於京都，昭31. 11.
18) Patnode, R.A., Hudgins, P.C. & Cummings, M.M. : Am. Rev. Tuberc., 72: 117, 1955.
19) Patnode, R.A. Hudgins, P.C. & Cummings, M.M. : Ibid., 72: 856, 1955.
20) Karlson, A.G. & Feldman, W.H. : Ibid., 58: 129, 1948.
21) Karlson, A.G. & Feldman, W.H.: Proc. Staff. Meet., Mayo Clin., 24: 510, 1949.
22) Karlson, A.G., Gainer, J.H. & Feldman, W. H. : Ibid., 25: 160, 1950.
23) Karlson, A.G., & Feldman, W.H.: Am. Rev. Tuberc., 68: 575, 1953.
24) 岡　治道・柳沢　謙・岩崎龍郎・小川辰次：日本臨床，4: (1), 1, 昭21.
25) Conzelman, G. Jr.: Antib. & Chemo., 5: 444, 1955.
26) Epstein, I G., Nair, K.G.S. & Boyd, L.J. : Antib. Med., 1: 80, 1955.
27) Epstein, I.G., Nair, K.G.S. & Boyd, L.J. : Antibiotics Annual, 1955～1956, New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1956, 141.
28) Epstein, I.G., Nair, K.G.S. & Boyd, L.J. : Dis. of Chest, 29: 3, 1956.