

実験的結核症における Ethambutol (Dextro-2,2'-(Ethylene-diimino)-di-1-butanol) ならびに HON (δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-norvaline) の治療効果

金井 興美・中村 玲子・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 38 年 11 月 13 日

1961年, Wilkinson ら¹⁾, Thomas ら²⁾によつてはじめて報告された Ethambutol は, わが国においてもすでに臨床経験の段階に入っており, 二次抗結核剤としての価値が認められつつある。他方, 1960年 Miyake^{3)~5)}, Kanazawa ら⁶⁾によつて報告された HON とよばれる新抗生物質については, 実験的結核症に対する有効性を記載する予備的報告のまま今日にいたつていようである。著者らは, 最近これら2つの物質の Maus およびモルモットの実験結核症に対する治療効果について検討し, 有効性の程度についてそれぞれ知見を得たので報告する。

実験材料と方法

1) 動物: Maus は体重 18g 前後の市販 dd 系の雄を使用し, モルモットは体重 400g 前後の白色健康モルモットの雄を使用した。これらの動物は固型飼料と水とで飼育された。

2) 結核菌: Sauton 合成液体培地上に発育の牛型結核菌 (Ravenel 株) を用いて, 手振法にて蒸留水菌液を調製して感染に供した。

3) 被検薬剤: Ethambutol (右旋性のものに対する名称) は科研化学より提供されたもので, サンプルはラセミ体であるので, 実際の投与量は用いた量の約半分とみなしうる。HON は武田薬工より供与された。これらの被検物質に対する一つの対照薬剤として, dihydrostreptomycin sulfate (SM) を選んだ。これらの薬剤はすべて水溶性であり, Maus には 0.2 ml の蒸留水に必要な量溶かして, 腹腔内注射あるいはゾンデを用いて経口投与し, モルモットには 0.5 ml の蒸留水に溶かして腋窩部に皮下注射した。

4) 薬剤効果判定方法: Maus においては致死量 (0.5 mg あるいは 1.0 mg) 感染に対する薬剤投与の延命効

果をみる方法と, 小菌量 (0.001 mg) 感染後の脾における菌の増殖に対する阻止効果をみる方法とを併用した。モルモットにおいては, 型のごとく剖検による罹患度の比較と, 臓器内の感染菌数の比較を行なつて薬剤効果を検討した。感染菌数の分離検出は, はじめに蒸留水, 次に 1% NaOH を用いて組織の 10 倍薬剤をつくり, その 10 倍連続蒸留水稀釈液を 0.1 ml ずつ小川培地 (原液に 1% に第 1 磷酸カリを含む) に接種培養し, 3~4 週後の集落発生数より算定した。

実験成績

実験 1) 各群 20 匹よりなる 4 群の Maus を用意し, 各群の 10 匹に対しては Ravenel 株の 1 mg, 残り 10 匹に対しては, その 0.001 mg をもつて一様に静注感染した。感染翌日より 1 群を除く他 3 群に対し, 1 日量 HON 2 mg, Ethambutol (ラセミ体) 4 mg, あるいは SM 1 mg を用いて 3 週間処置した。1 mg 感染群については生存日数を観察し, 0.001 mg 感染群については, 感染翌日および 1 週ごとに 4 週まで, 各群より 2 匹ずつ殺して脾内の感染菌数を培養法によつて追求した。成績は Fig. 1 (A, B) に示した。

図 A にみるように, 対照群は 18 日目にすべて死亡したが, SM 投与群, Ethambutol 投与群は感染後 30 日目において, それぞれ 90%, 80% の生存率を示し, Ethambutol の著明な効果が立証された。他方, HON 投与群は対照群と比べてみれば確実な延命効果を受けているが, 30 日までに全動物死亡し, その効果の程度は弱く一時的のものと考えられる。図 B は, Ethambutol の顕著な感染菌増殖阻止効果を証明しているが, HON 投与効果の限界も表現されている。これらの実験条件に関するかぎり, Ethambutol は SM に匹敵する効果をあげていることが推定できよう。

Fig. 1. Antituberculous Effect of Streptomycin, HON, and Ethambutol on Mice Infected Intravenously with Bovine Tubercle Bacilli

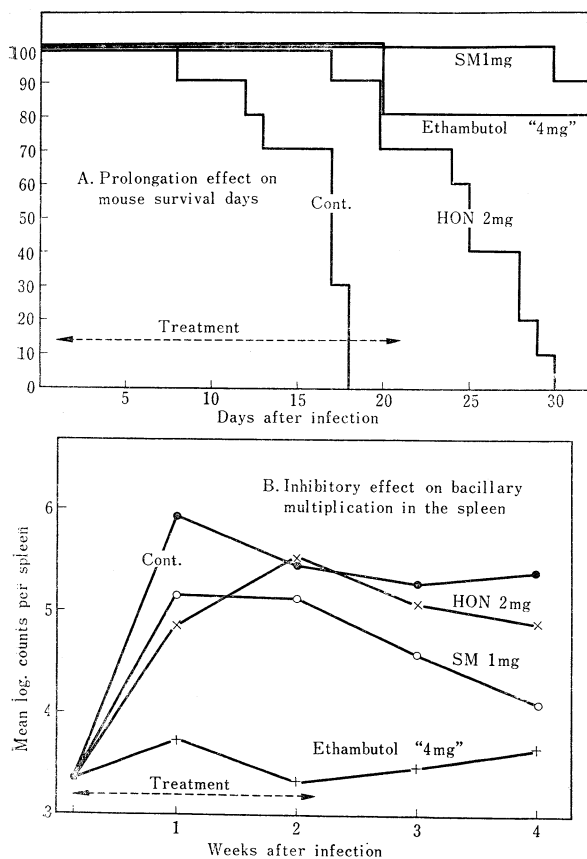


Fig. 2. Antituberculous Effect of Streptomycin and HON on Mice Infected Intravenously with Bovine Tubercle Bacilli

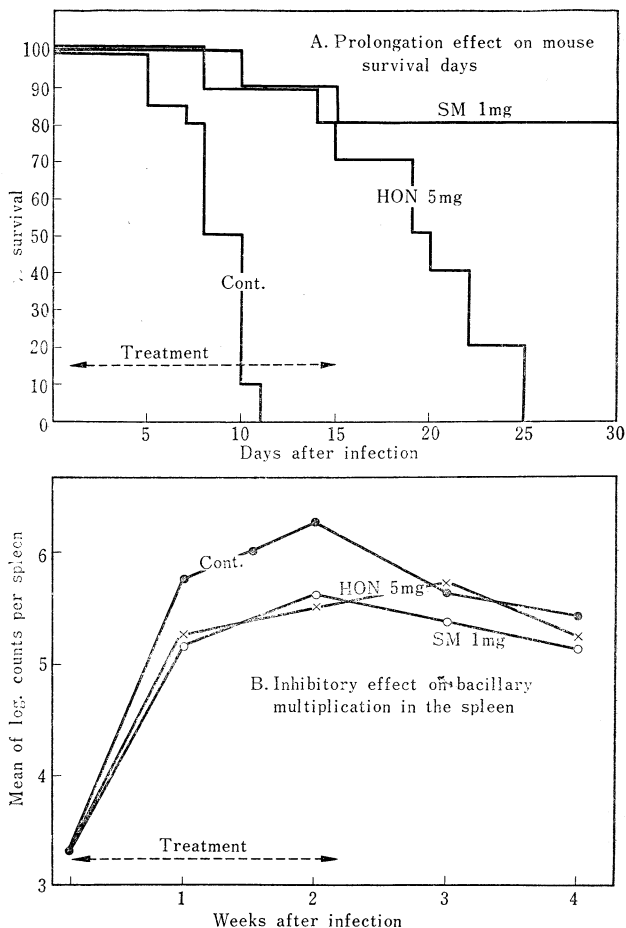
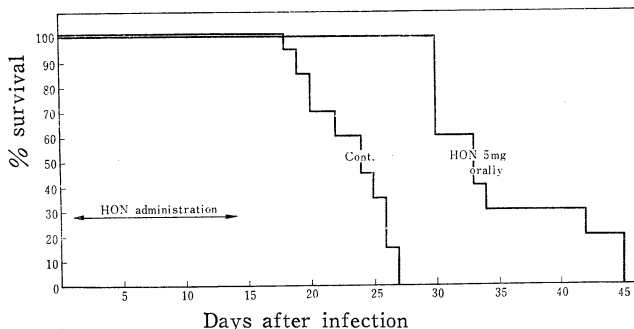


Fig. 3. Antituberculous Effect of Oral Administration of HON on Mice Infected Intravenously with Bovine Tubercle Bacilli



効果をSMを対照として、モルモットの進展せる結核症において検討した。その実験要領を Table 1 に示し、実験成績を Fig. 4 および Table 2 に示した。

マウスにおける実験と異なる点は、薬剤投与を感染後

実験 2) 20 匹ずつ 3 群のマウスを用意し、Ethambutol (ラセミ体) 5 mg, SM 1 mg の効果について前実験と全く同一形式の実験を行なった。ただし、薬剤投与期間は感染翌日からはじめて 2 週間とした。成績は Fig. 2 (A, B) に示した。対照群の死亡経過からみて、感染度は前実験より強いと考えられるが、増量された HON 5 mg の投与効果は、確実に表現されているが、SM 1 mg に比べてきわめて弱い。しかし、脾内感染菌増殖阻止効果において、両薬剤間にあまり差異はなかつた。

実験 3) HON の延命効果をこれまでよりも弱い致死感染において再確認するため、10 匹ずつの 2 群のマウスを用意し、Ravenel 株 0.5 mg を静注感染して実験を行なった。HON 投与はゾンデを用いて 2 週間経口的に行なった。Fig. 3 に図示したごとく、対照群は 18 日より 27 日にかけてすべて死亡したが、HON 投与群においては、30 日より死亡がはじまり、45 日目に最後のマウスが死亡した。すなわち、HON の効果は経口投与でも得られたが、その程度はやはり弱いことが分かる。

実験 4) 最後に、HON および Ethambutol の治療

Table 1. Design of Guinea Pig Experiment

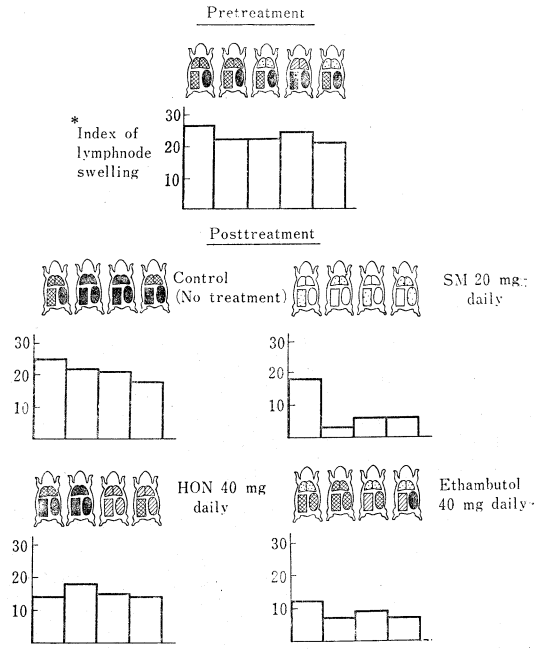
Group	Number of guinea pigs	Infection Strain, dose route	4 weeks Pretreatment autopsy	Treatment (5 weeks)		Autopsy 1 weeks
				Subcutaneously Drug	Dose	
1	10	Ravenel strain (bovine type) 10 ⁻¹ mg Subcutaneously	5	No treatment		5
2	5			HON	40 mg	4
3	5			SM	20 mg	4
4	5			DL-Ethambutol	40 mg	4

Note: One animal in Group 2, 3 and 4 respectively died before the time of autopsy.




Table 2. Mean Numbers of Bacilli Recovered by Culture from the Lungs and Spleen Shown in Fig. 4.

Group	Guinea pig Number	Number of bacilli recovered from 10 mg of organ		
		Lung	Spleen	(Spleen weight)
Pretreatment	1	5600	9300	5.5 ^g
	2	2500	8000	3.5
	3	500	2300	3.0
	4	1530	24000	4.5
	5	1800	5600	2.5
No treatment (control)	6	1300	1400	3.2
	7	3700	1500	12.5
	8	26000	1000	7.5
	9	5200	820	2.5
Streptomycin 20 mg	11	1	55	1.9
	12	0	10	1.2
	13	4	15	1.9
	15	7	750	2.2
HON 40 mg	16	2000	1000	6.0
	17	5000	660	4.5
	19	1400	550	2.2
	20	1500	2500	9.5
Ethambutol "40 mg"	21	210	100	2.8
	22	180	130	2.8
	23	50	100	2.0
	24	120	200	2.5

Fig. 4. Treatment of Tuberculous Guinea Pigs with Dihydrostreptomycin Sulfate, HON, or Ethambutol



Note: *Swelling of the lymphnodes (kneefold, inguinal axillary, retroperitoneal, portal, tracheal and retrosternal) was described by the symbols one plus, two plus, and three plus, representing grain-sized, bean-sized, and still more enlarged swelling respectively. Then, the summed numbers of "plus" of all the lymphnodes was calculated, and this is the index.

 Nodular tuberculosis of lung.
 Severe diffuse involvement of spleen.
 Graded expression of numerous miliary tubercles in liver

4週を経て、すでに病巣の成立をみてからはじめる点で、これによつて眞の治療効果が推定しうる。このような実験条件においては、Fig. 4の示すごとく、SMの治療効果はきわめて顕著であり、感染局所の潰瘍は急速に治癒におもむき、淋巴腺の腫張も軽減し、内臓の病変も吸収されてしまう。これに反し、HON 40 mg はほとんど治療効果を示さず、Ethambutol 40 mg の効果も、SM 20 mg に比べれば不満足なものであつた。Table 2に示された肺、脾における感染菌数、脾重量もよく剖検所見と符号して、それぞれの薬剤の効果の程度を表現している。

考 察

実験結核症に対する Ethambutol の治療効果の報告は、Thomas ら²⁾ のマウスに関するものが最初であるが、彼らは非経口投与によつて SM にまさる効果を示したと述

べている。感染後速やかに投与を開始しているこのマウスでの実験に反し、Karlson⁷⁾ は感染後 21 日を経て病巣の確立したモルモットの実験結核症に対して、Ethambutol (右旋性) の 1 日量 25 mg を、経口あるいは皮下に 62 日間投与し、皮下投与の場合にことにすぐれた治療効果を観察した。彼⁸⁾ はその翌年、同じ形式の実験において、0.2 mg というきわめて不十分な投与量の INH に対して、Ethambutol の確実な併用効果を認めた。この Karlson の実験に比べて、われわれの観察したモルモットでの Ethambutol の効果は弱いものであつたが、これは感染後の投与開始がよりおくれており、投与量が

より少なく、投与期間がより短いという諸点より説明されるであろう。しかし、SM の効果がさらに少ない投与量できわめて顕著に表現されていることから考えれば、Ethambutol の治療効果の相対的な程度がおのずから理解できる。したがって、われわれのマウスにおける実験でも、SM と Ethambutol との間にはそれほどの効果の差異は見出だしえなかつたが、真の治療効果を推定するためには、モルモットの進展結核症に対する影響力を問題とすべきであろう。Isoxyl に関するわれわれの一連の報告^{9)~11)}と、この薬剤に対する現在の臨床的評価とから考えても、上の主張は正しいと思われる。その後 Schmidt ら¹²⁾は猿において、McCune¹³⁾、Lal と Robson¹⁴⁾はマウスにおいて、またわが国においては岡ら¹⁵⁾がマウス、モルモットを用いて Ethambutol を検討しているが、これらの成績を総合しても、Ethambutol の治療効果は SM、INH の標準以下で、二次抗結核剤に属するものと評価される。前田ら¹⁶⁾はマウス実験結核症において、INH 耐性菌感染菌に対し、INH と Ethambutol との併用が、Ethambutol 単独使用よりも有効である再現性ある成績を得ており、Ethambutol 使用に関する新しい示唆を提出している。

HON の治療効果はさらに落ちるが、弱いながらその感染阻止力は確実な再現性があり、比較的珍しい例である。このアミノ酸抗生物質の *in vitro* での最少発育阻止濃度は高く、また他のアミノ酸によつて抗菌力が拮抗されるという欠点であるので、投与量はさらにあげる必要がある。Kanazawa ら⁶⁾は、1日量 100 mg を用いて、SM 5 mg に匹敵する治療効果をモルモットの実験結核症において得ている。しかし、この投与量は、体重 50 kg として per kg によつて人間の場合に相当せしめると 10 g もの量になる。毒性がなく、経口的にも有効であるので、他の抗結核薬との併用の方向に、その価値を求めべきであろう。

本研究室は、過去 15 年間にわたつてさまざまな、未知、既知の抗結核薬の効果の検討を続けてきたが、最近 1314 TH, Ilamycin¹⁷⁾¹⁸⁾、Isoxyl^{9)~11)}、それに本報告記載の HON、Ethambutol を扱つて、実験手技、実験計画、実験結果の評価等について、以前 Kanamycin で得た経験に付加する点が少なくなつた。このような経験を土台にして、われわれは現在 Capreomycin についてマウス、モルモットでその抗結核性を検討しているが、これはひきつづき報告の予定である。

結 論

マウスおよびモルモットの実験結核症において、Ethambutol、HON の治療効果を検討し、それらの有効性を認めた。しかし、効果の程度については、Ethambutol ははかかなりすぐれているが SM よりは劣り、二次抗結核剤に属するものといえよう。HON の効果はさらに弱く、単独使用の意義は少ないものと推定され、他剤との併用にその価値を求めべきものと考えらる。

実験に当たつての田村恵子氏の御協力を謝す。

文 献

- 1) Wilkinson, R.G., et al.: J. Amer. Chem. Soc., 83: 2212, 1961.
- 2) Thomas, J.P., et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 83: 891, 1961.
- 3) Miyake, A.: Chem. Pharma. Bull., 8: 1079, 1960.
- 4) Miyake, A.: Chem. Pharma. Bull., 8: 1071, 1960.
- 5) Miyake, A.: Chem. Pharma. Bull., 8: 1073, 1960.
- 6) Kanazawa, K., et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 81: 924, 1960.
- 7) Karlson, A.G.: Am. Rev. Resp. Dis., 84: 902, 1961.
- 8) Karlson, A.G.: Am. Rev. Resp. Dis., 86: 439, 1962.
- 9) 小関勇一・賀来隆二: 結核, 38: 62, 昭38.
- 10) 賀来隆二: 結核, 38: 67, 昭38.
- 11) 金井興美 他: 結核, 38: 470, 昭38.
- 12) Schmidt, L.H., et al.: Trans. 21st. Conf. on Pulm. Dis., Vet. Adm. Armed Forces, p. 355, 1962.
- 13) McCune, R.: Ann. Meeting of Amer. Thoracic Soc., Miami, Florida, 1962.
- 14) Lal, H.M. and Robson, J.M.: Am. Rev. Resp. Dis., 87: 870, 1963.
- 15) 岡捨己 他: 日結研第1回総会, 大阪, 昭38.
- 16) 前田徹 他: 第3回胸部疾患学会, 大阪, 昭38.
- 17) 賀来隆二: J. Antibiotics, Ser. B, 16: 93, 昭38.
- 18) 賀来隆二: J. Antibiotics, Ser. B, 16: 99, 昭38.

Therapeutic Effect of Ethambutol (Dextro-2,2'-(Ethylenediimino) di-1-Butanol and HON (β -Hydroxy- γ -oxo-L-Norvaline) on Experimental Tu-

berculosis.

Therapeutic effects of Ethambutol and HON on experimental mouse and guinea pig tuberculosis

were examined in comparison with those of streptomycin. In mice, the drug effectiveness was evaluated both from the change of "per cent survival" of fatally infected animals (intravenously with the inoculum of 0.5 or 1 mg of bovine tubercle bacilli) and also from the inhibited multiplication of the bacilli in the spleen of the animals infected with a rather small size of inoculum (0.001 mg). Intraperitoneal or oral administration of the drugs was started the next day of infection and continued for two to three weeks. In these experimental conditions, the daily dose of 4 mg of Ethambutol (as racemic compound) exerted a remarkable therapeutic effect comparable to that of 1 mg of streptomycin. However, 2 mg or 5 mg of HON exerted only a slight favourable effect, though it was reproducible and definite.

In 25 guinea pigs, infection was subcutaneously conducted with 0.1 mg of the same strain as above,

and treatment was started preconfirming the formation of advanced tuberculous lesions in 5 animals sacrificed 4 weeks after infection. Namely, the remaining 20 animals were divided into 4 groups of equal 5. Against these groups drug administration was made subcutaneously for 5 weeks with 40 mg daily dose of HON, with 40 mg daily dose of Ethambutol (racemic compound), or 20 mg daily dose of streptomycin respectively. The last one group was left untreated. One week after the termination of treatment, all the animals were sacrificed for comparative observation of gross lesions and for quantitative culture test of the bacillin in the spleen and the lungs. A marked therapeutic effect observed in the group treated with streptomycin, but the effect of Ethambutol was moderate and that of HON was slight.