

## Dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol の抗結核作用

第 1 報 抗菌力, 耐性上昇および他剤併用効果

森 山 英 五 郎

熊本大学医学部第一内科学教室 (指導 河盛勇造教授)

受付 昭和 39 年 2 月 3 日

## ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF DEXTRO-2,2'-(ETHYLENE-DIIMINO)-DI-1-BUTANOL (ETHAMBUTOL) (I)

Eigorō MORIYAMA\*

(Received for publication February 3, 1964)

1) The bacteriostatic effect of ethambutol against tubercle bacilli was studied with  $H_{37}R_V$  and its resistant variants to streptomycin, isoniazid, PAS or kanamycin, and with  $H_2$  and freshly isolated strains from tuberculosis patients which had different sensitivity to other antituberculous drugs. The minimal inhibiting concentrations of ethambutol were 2.5 to 10 mcg/ml with Ogawa's egg media and incubation time of 4 weeks, 2.5 to 5.0 mcg/ml with Dubos' liquid media and 2 weeks, and 10.0 mcg/ml with Kirchner's semi-solid agar media and 3 weeks.

2) The addition of PAS, ethionamide, streptomycin or kanamycin to ethambutol did not show any substantial enhancement of the antimycobacterial activity of the latter drug against  $H_{37}R_V$  and  $H_2$  strains in semi-solid media.

3) Albino dd/y male mice weighing approximately 20 gm. were infected intravenously with  $H_{37}R_V$  strain. They were divided into four groups of nine each, the three groups which were respectively treated with daily subcutaneous injection of 1 mg. and 2 mg. of ethambutol, and of 0.02 mg. of isoniazid and the last group of which was set to the control. The treatments were started on the next day of infection and continued for twenty days. Three animals in each group were sacrificed three, seven and fourteen days after the last injection. The therapeutic effects were evaluated by the comparison of the viable units which were obtained by the cultivation of tubercle bacilli from the lungs and spleens of the animals.

Three days after termination of the treatments, tubercle bacilli were not cultivated from all animals except for the untreated control. On the seventh and fourteenth days viable bacilli were detected even from the organs of treated animals. The suppressive effect against tubercle bacilli in organs was observed in mice daily treated with 1 mg. of ethambutol to the same extent as in those treated with 0.02 mg. of isoniazid.

4) The development of resistance to ethambutol was observed *in vitro* by the step-by-step method transferring the bacilli on Ogawa's egg media every four weeks. After seven transfers a resistant population of  $H_{37}R_V$  to 10 mcg/ml of ethambutol was obtained in 10%, but any resistant to a higher concentration of the drug was not detected.

A strain resistant to 100 mcg/ml. of isoniazid was transferred every two weeks to Dubos' liquid media containing 1 mcg/ml of ethambutol. After four transfers, the resistant population to 100 mcg/ml of isoniazid disappeared.

\* From 1st Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kumamoto University, Honjo-machi, Kumamoto-city, Japan.

## 緒 言

American Cyanamid Company の Lederle Laboratories Division の研究陣<sup>1)</sup>は、研究の結果 2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol, ことにそのD体 (Ethambutol, 以下 EB と略) が、試験管内およびマウスを用いた動物実験によつて強力な抗結核作用を有することを報告した。続いて Karlson<sup>2)3)</sup>によつて、同様に試験管内における有効性およびモルモットの実験的結核症に対しても治療効果のあることが証明された。

本邦においても、すでに堂野前、伊藤ら<sup>4)5)</sup>が試験管内抗菌力、動物実験、さらに臨床投与成績について追試検討を行ない、有用な抗結核剤として期待できる成績を報告している。

私も EB についてその抗結核菌作用、結核菌の EB 耐性上昇を検討するとともに、他剤との併用効果について実験的研究を行なう機会を得たので、その成績を報告する。

## 実験材料および方法

## I) 試験管内実験

使用菌株は実験成績の項に記載した。

使用培地と培養条件：

1) EB の発育阻止力 1%小川培地—4週培養後判定。Dubos 液体培地—2週培養後判定。Kirchner 半流動寒天培地—3週培養後判定。培養は 37°C で、小川培地および 10%馬血清加 Kirchner 半流動寒天培地は判定まで静置し、Dubos 液体培地は毎日 1 回振盪した。

2) 耐性上昇 1%小川培地を用いて、EB 最高濃度含有培地に発育した菌を次代に接種し、耐性分布を検討する 4 週間隔増量継代法と、Dubos 液体培地 7 日培養菌を EB 1 mcg/ml 含有 Dubos 液体培地に接種したものを初代とし、2 週間隔で継代する恒量継代法により、後者については各代ごとに小川培地上で耐性分布を検討した。

3) 他剤併用効果 Kirchner 半流動寒天培地を用いて、EB と PAS, TH, SM, KM のそれぞれを併用した場合の発育阻止力を検討した。INH との併用については次報に報告する。

## II) 動物実験

体重 20 g 前後の 36 匹の dd 系雄性マウスに人型結核菌 H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株の湿菌量 10<sup>-8</sup> mg (65 v. u.) を尾静脈内接種し、これを 1 群 9 匹宛の 4 群に分ち、3 群を EB 1 mg/mouse/day, EB 2 mg/mouse/day および INH 0.02 mg/mouse/day によつて治療し、1 群を無治療対照とした。治療は感染翌日より 20 日間皮下注射により行なつた。治療終了後 3 日, 7 日, 14 日に各群より 3 匹宛屠殺し、肺および脾の全臓器を乳鉢で磨碎して 1%

NaOH 液を加えて 100 mg/ml の乳剤とし、蒸留水で 10 倍階段稀釈して 1%小川培地に接種し、37°C に 4 週間培養した後発生集落数を算えて臓器 10 mg 中の生菌数を算定した。

## 実験成績

## 1) EB の試験管内発育阻止力

教室保存人型結核菌株-H<sub>2</sub>, H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>, H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株の INH·PAS·SM·KM のおのおの 100 mcg/ml 完全耐性株、および肺結核患者より分離した沢田株 (INH 5, SM 10 mcg/ml 完全耐性)、増田株 (INH 100, SM 100, PAS 5 mcg/ml 完全耐性) の各 Dubos 液体培地 7 日培養菌液 (濁度判定によりおよそ 1~5 mg/ml) の 0.1 ml を各培地に接種した。発育阻止力は表 1 に示すごとく、1%小川培地では 2.5~10 mcg/ml, Dubos 液体培地では 2.5~5 mcg/ml, Kirchner 半流動寒天培地では 10≤mcg/ml の最小発育阻止濃度 (MIC) を示した。さらに肺結核患者より分離した既存の薬剤に種々の耐性を有する 15 株を含む 28 菌株を、ガラス玉入り丸コルベンを用い手振法で調整した 1~5 mg/ml 菌液の 0.1 ml を 1%小川培地に接種した。成績は表 2 に示すごとくいずれの菌株も EB 1~5 mcg/ml で発育を阻止され、2.5 mcg/ml の MIC を示す菌株がもつとも多かつた。すなわち既存の抗結核剤 (INH·PAS·TH·SM·KM) に耐性の菌株に対しても、感性株に対すると同等の発育阻止を示しこれらと交叉耐性を認めなかつた。

## 2) マウス実験的結核症に対する治療効果

成績は図 1 に示した。治療終了後 3 日目では無治療対照群で相当の生菌数を認めたが、各治療群ではほとんど生菌を分離できなかつた。しかし治療終了後 7 日目では各治療群の生菌数の増加があり、治療終了後 14 日目では無治療対照群と近似の生菌数を認めた。すなわち INH 0.02 mg/mouse/day と EB 1 mg/mouse/day の治療効果がほぼ匹敵し、治療 20 日間では治療終了後臓器内生菌数は増加した。

## 3) 耐性上昇

増量継代法では H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株について 7 代まで検討し、図 2 のごとき成績であつた。7 代目で EB 10 mcg/ml に耐性の菌を 10%に認めたが、3 代目まではほとんど耐性分布に変動を認めず、4 代目より 5 mcg/ml に耐性の菌が出現し、6 代目まで 5 mcg/ml 耐性菌が次第に増加して、7 代目ではじめて 10 mcg/ml に発育する菌が出現した。

恒量継代では H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株と H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> R-INH 株について検討した。H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株についての成績は表 3 に示すごとく、EB 1 mcg/ml 作用 4 代までは薬剤非添加の対照と有意の差がなかつた。しかし H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> R-INH 株については表 4 に示す成績のごとく、EB 1 mcg/ml 作用 4 代

Table 1. Growth Inhibitory Effect of EB against Various Strains of Tubercle Bacilli in Vitro

Strains	Media EB conc. mcg/ml	1% Ogawa's egg media					Dubos' liquid media					Kirchner's semi-solid agar media				
		0	1.25	2.5	5	10	0	1.25	2.5	5	10	0	1.25	2.5	5	10
H <sub>2</sub>		###	##	##	##	-	++	+	+	-	-	##	##	##	##	##
H <sub>37</sub> R <sub>v</sub>		###	##	##	+	-	##	##	-	-	-	##	##	##	##	+
H <sub>37</sub> R <sub>v</sub> R-SM		###	##	-	-	-	+	+	+	-	-	##	##	##	+	-
H <sub>37</sub> R <sub>v</sub> R-INH		###	##	+	-	-	+	+	+	-	-	##	##	##	+	+
H <sub>37</sub> R <sub>v</sub> R-PAS		##	##	-	-	-	+	+	+	-	-	##	##	##	##	-
H <sub>37</sub> R <sub>v</sub> R-KM		##	##	##	-	-	##	+	+	-	-	##	##	##	##	-
Sawada		##	+	+	-	-	##	+	-	-	-	##	##	##	##	-
Masuda		##	+	+	-	-	##	+	-	-	-	##	##	##	##	-

Note: Degree of growth was expressed as following symbols.

#1: 1% Ogawa's egg media (Reading was made after 4 weeks.)

###: Complete confluent growth

##: Moderately confluent growth

++: Innumerable distinct colonies

+: Over 100 colonies

Number: Average number of counted colonies.

#2: Dubos' liquid media (Reading was made after 2 weeks by naked eye.)

###: Dense turbid

##: Moderately turbid

+: Slightly turbid

#3: Kirchner's semi-solid agar media (Reading was made after 3 weeks.)

Symbols are the same as those in #1.

Table 2. Growth Inhibitory Action of EB against Freshly Isolated Strains of Tubercle Bacilli

Strain number	Resistance to other drugs mcg/ml	EB conc. mcg/ml						Strain number	Resistance to other drugs mcg/ml	EB conc. mcg/ml					
			0	1	2	4	8				0	1.25	2.5	5	10
1	#		###	##	0.5	-	-	14	#		###	##	-	-	-
2	#		###	##	-	-	-	15	#		###	12	-	-	-
3	INH 1 C SM 10 C		###	##	+	-	-	16	#		##	-	-	-	-
4	SM 1 C		###	0.5	-	-	-	17	#		##	##	-	-	-
5	#		##	-	-	-	-	18	INH 10 C PAS 1 C	SM 10 P KM 100 C	##	+	66	-	-
6	INH 0.1 P		##	-	-	-	-	19	INH 10 C PAS 10 P TH 10 C	SM 5 C KM 100 C	##	+	2.5	-	-
7	INH 1 C SM 10 C	KM 1 C	##	-	-	-	-	20	INH 0.1 C SM 100 C		##	-	-	-	-
								21	SM 1 C		###	###	###	6	-
								22	SM 1 C		##	+	-	-	-
8	INH 100 P PAS 1 C	SM 10 P	##	-	-	-	-	23	INH 10 C TH 10 P	SM 10 C KM 100 C	##	##	-	-	-
9	INH 10 C PAS 10 P	SM 10 C	##	0.5	-	-	-	24	#		##	49	-	-	-
10	INH 10 C PAS 5 P	SM 1 P KM 100 C	##	23	-	-	-	25	PAS 1 P		###	###	##	-	-
11	INH 10 C PAS 10 P	SM 1 P KM 100 C	###	##	-	-	-	26	#		##	+	-	-	-
12	#		##	60	-	-	-	27	#		##	-	-	-	-
13	#		##	+	-	-	-	28	#		##	-	-	-	-

Note: #: sensitive. C: completely resistant. P: partially resistant.

Symbols in the table are the same as those in Table 1.



Table 4. EB Resistant Population in H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> R-INH Strain Transferred Fortnightly in Dubos' Liquid Media Containing 1 mcg/ml of EB

Dubos' liquid media		Without EB					With 1 mcg/ml of EB			
1% Ogawa's egg media		1 st	2 nd	3 rd	4 th	1 st	2 nd	3 rd	4 th	
Transfer	Before									
EB conc. mcg/ml	0	32×10 <sup>5</sup>	60×10 <sup>5</sup>	171×10 <sup>5</sup>	80×10 <sup>5</sup>	†×10 <sup>3</sup>	79×10 <sup>3</sup>	27×10 <sup>5</sup>	8×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>5</sup>
	1	14×10 <sup>5</sup>	6×10 <sup>5</sup>	80×10 <sup>3</sup>	‡×10 <sup>1</sup>	C	47×10 <sup>3</sup>	82×10 <sup>3</sup>	C	2×10 <sup>5</sup>
	2	6×10 <sup>3</sup>	72×10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>3</sup>	38×10 <sup>3</sup>	6×10 <sup>3</sup>	†×10 <sup>1</sup>	4×10 <sup>3</sup>	C	4×10 <sup>3</sup>
	4	0	0	+×10 <sup>1</sup>	+×10 <sup>1</sup>	0	90×10 <sup>1</sup>	0	C	2×10 <sup>3</sup>
	8	0	0	0	0	0	0	0	C	4.5×10 <sup>1</sup>
	16	0	0	0	0	0	0	0	C	0
INH conc. mcg/ml	12.5	37×10 <sup>5</sup>	28×10 <sup>5</sup>	150×10 <sup>5</sup>	C	†×10 <sup>3</sup>	77×10 <sup>3</sup>	21×10 <sup>5</sup>	27×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>5</sup>
	25	26×10 <sup>5</sup>	32×10 <sup>5</sup>	10×10 <sup>5</sup>	C	†×10 <sup>3</sup>	22×10 <sup>3</sup>	20×10 <sup>5</sup>	C	3×10 <sup>5</sup>
	50	21×10 <sup>5</sup>	20×10 <sup>5</sup>	20×10 <sup>5</sup>	C	C	41×10 <sup>3</sup>	9×10 <sup>5</sup>	24×10 <sup>5</sup>	40×10 <sup>3</sup>
	100	39×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	3×10 <sup>3</sup>	†×10 <sup>3</sup>	+×10 <sup>3</sup>	†×10 <sup>1</sup>	10×10 <sup>3</sup>	4.5×10 <sup>3</sup>	0

Figures indicate the average number of viable units in 1 ml of Dubos' media tested.  
 0 indicates no growth after inoculation of 0.1 ml of Dubos' media tested.  
 C indicates contamination.

Table 5. Growth Inhibitory Effect of EB Combined with Other Antituberculous Agents against H<sub>2</sub> Strain in Kirchner' Semi-Solid Agar Media

Drug and its conc. mcg/ml	TH					SM					KM				
	0	0.625	1.25	2.5	5	0	0.25	0.5	1	2	0	0.5	1	2	4
0	‡	†	†	+	40	‡	‡	†	-	-	‡	‡	†	-	-
0.625	‡	†	†	+	30	‡	‡	†	-	-	‡	†	+	-	-
1.25	‡	†	†	+	-	‡	‡	-	-	-	‡	-	-	-	-
2.5	†	†	+	+	-	†	+	-	-	-	†	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Symbols in the table are the same as those in Table 1.

Table 6. Growth Inhibitory Effect of EB Combined with Other Antituberculous Agents against H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> Strain in Kirchner's Semi-Solid Agar Media

Drug and its conc. mcg/ml	PAS					TH					SM					KM				
	0	0.125	0.25	0.5	1	0	0.625	1.25	2.5	5	0	0.25	0.5	1	2	0	0.5	1	2	4
0	‡	‡	‡	†	45	‡	†	†	+	18	‡	‡	†	†	-	‡	‡	‡	†	-
0.625	‡	‡	†	†	45	‡	†	†	+	14	‡	‡	†	+	-	‡	‡	†	+	-
1.25	‡	‡	†	†	20	‡	†	+	+	7	‡	‡	†	+	-	‡	‡	†	50	-
2.5	‡	†	†	†	-	‡	†	+	50	-	‡	†	+	-	-	‡	‡	†	10	-
5	‡	†	+	+	-	‡	-	-	-	-	†	+	+	-	-	‡	20	-	-	-

Symbols in the table are the same as those in Table 1.

で EB 耐性上昇の傾向があり 8 mcg/ml に発育する菌が出現した。同時に INH に対する耐性個体の推移を追及すると、4 代後に INH 100 mcg/ml 耐性個体が減少する傾向を認めた。

いずれの方法にしても、数代の継代では EB 高濃度耐性菌を分離することはできなかった。

4) 他剤併用効果

人型結核菌 H<sub>2</sub> 株および H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株を用い、Kirchner

半流動寒天培地 5 ml に 10<sup>-1</sup> mg の大量の菌を接種した。成績は表 5, 6 に示したごとく、H<sub>2</sub> 株では SM および KM との間に、H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株では PAS・TH・SM・KM との間に多少の協力作用がうかがわれはしたが、いずれも明らかでなかった。すなわち EB はこれらの薬剤と併用しても著しく抗菌力を上昇せしめるとは認めえなかつた。

### 総括ならびに考察

試験管内での EB の抗菌力は、接種菌量が多かつたためか小川培地および Dubos 液体培地で 2.5~5 mcg/ml の MIC を示し、DL 体を用いた伊藤ら<sup>5)</sup>の成績と同程度であつた。肺結核患者より分離した種々の菌株に対しては 1% 小川培地で 2.5 mcg/ml の MIC を示した菌株が多かつたが、Karlson<sup>3)</sup>の Proskauer-Beck 卵黄培地での 1~5 mcg/ml とほぼ一致する成績であり、また 1% 小川培地上で検した山本ら<sup>6)</sup>の成績も同様であつた。しかし 10% 馬血清加 Kirchner 半流動寒天培地では  $10 \leq \text{mcg/ml}$  とやや MIC の上昇がみられた。10% アルブミン (栄研) 加 Kirchner 液体培地で再検討すると、 $H_{37}R_V$  株は  $10^{-1} \text{ mg}$  大量菌接種で 2 mcg/ml まで、 $10^{-8} \text{ mg}$  小量菌接種で 0.5 mcg/ml まで発育を示したにすぎなかつた。おそらく培地によつて抗菌力の差があるものと考ええる。

マウス実験的結核症において、感染翌日より治療し、臓器内での生菌数の追及によつて、EB の抗結核作用を検討した成績は、INH 0.02 mg/mouse/day と EB 1 mg/mouse/day がほぼ匹敵する成績であつた。延命効果より判定したマウス実験的結核症に対する治療成績は、山本ら<sup>6)</sup>は EB 20 mcg/g が INH 1 mcg/g にほぼ匹敵する効果を示したと報告しているが、伊藤ら<sup>5)</sup>の成績では EB と INH との比が 50 : 1 で私の成績と一致している。しかし INH の 100 倍量を投与した治療でも、20 日間の治療終了後再び臓器内生菌数の増加を認めたことは、EB の殺菌作用の弱いことを意味するものと考ええる。

EB 耐性上昇については、Thomas ら<sup>1)</sup>は  $H_{37}R_V$  株について Sauton 培地を用い 8 代継代しても耐性は変わらなかつたと報告しているが、伊藤ら<sup>5)</sup>は Dubos 液体培地で  $H_{37}R_V$  株を 2 週ごと増量継代して 6 代目で 6.25 mcg/ml までの発育を認めたにすぎないといひ、山本ら<sup>6)</sup>は Kirchner 液体培地で  $H_{37}R_V$  株を 2 週間隔で増量継代を行ない、耐性は 2 代目より 5 mcg/ml に上昇し、4 代目以降は 10 mcg/ml の耐性を示したが 6 代後にも 20 mcg/ml の耐性菌は認められなかつたと報告している。本実験でも恒量継代 4 代目まで著明な耐性上昇を認めず、増量継代 7 代目ではじめて 10 mcg/ml に発育する菌を認めたにすぎなかつた。したがつて EB 高濃度耐性菌の分離は容易でないと思われる。

他剤併用効果については、伊藤ら<sup>5)</sup>が Dubos 半流動寒天培地で検討しているが、著明な協力作用を認めておらず、Kirchner 半流動寒天培地を用いた本実験の成績と一致している。

以上の成績から EB は第一級の抗結核剤とは言いえな

いが、既存の抗結核剤と交叉耐性を示さず、二次抗結核薬として有用と考える。

### 結 論

EB の抗結核作用を検討し次の成績を得た。

- 1) EB は教室保存の人型結核菌  $H_{37}R_V$  株および  $H_2$  株に対し 1% 小川培地、Dubos 液体培地、Kirchner 半流動寒天培地の各培地にて 2.5~10 mcg/ml の MIC を示し、また INH・PAS・SM・KM にそれぞれ耐性を有する  $H_{37}R_V$  株に対しても、感性株と同等に発育を阻止し交叉耐性を示さなかつた。また肺結核患者より分離した既存の薬剤に種々の感受性を有する 30 株の結核菌に対しても、1% 小川培地で 1~5 mcg/ml の MIC を示し、大部分の菌株の発育を 2.5 mcg/ml で阻止した。
- 2) マウス実験的結核症に対する治療効果は、EB 1 mg/mouse/day が INH 0.02 mg/mouse/day とほぼ匹敵する成績であつた。しかし治療終了後 7 日、14 日目には再び臓器内生菌数の増加を認めた。
- 3) EB 耐性上昇は 2 週間隔恒量継代 4 代目までは認められず、4 週間隔増量継代 7 代目で 10 mcg/ml に発育する菌を 10% に認めたにすぎなかつた。
- 4) 試験管内での感性菌  $H_{37}R_V$  株および  $H_2$  株に対する EB と PAS, TH, SM および KM との併用では、拮抗作用も著明な協力作用も認め得なかつた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜わり、御校閲いただいた恩師河盛勇造教授に心から感謝の意を表します。

また薬剤の供与を受けた日本 Lederle 社に謝意を表します。

本論文の一部の要旨は、第 14 回日本結核病学会九州地方会総会において発表した。

### 文 献

- 1) Thomas, J. P., Baughn, C. O., Wilkinson, R. G., and Shepherd, R. G.: Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 891, 1961.
- 2) Karlson, A. G.: Am. Rev. Resp. Dis., 84 : 902, 1961.
- 3) Karlson, A. G.: Am. Rev. Resp. Dis., 84 : 905, 1961.
- 4) 堂野前維摩郷 他: 日本胸部臨床, 22 : 404, 1963.
- 5) 伊藤文雄・青木隆一・立花暉夫・高橋洋一: 日本胸部臨床, 22 : 36, 1963.
- 6) 山本和男・桜井宏・下村康夫・井上幾之進: 日本胸部臨床, 22 : 797, 1963.