

Capreomycin の抗結核作用

(第一報)

和田 退 蔵

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 40 年 4 月 30 日

THE ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF CAPREOMYCIN

(I)

Taizou WADA

(Received for publication April 30, 1965)

The antituberculosis activity of capreomycin was studied *in vivo* and *in vitro* using the original drug sensitive strain and drug resistant strains isolated from pulmonary tuberculosis patients.

The results were as follows :

1) The minimal inhibitory concentrations of capreomycin for tubercle bacilli were 25 to 50 mcg/ml on Ogawa's egg media in four weeks incubation, and 5 to 10 mcg/ml on Kirchner's agar media, in Dubos' liquid media or Kirchner's semi-solid media.

The growth of the strains resistant to streptomycin, PAS, isoniazid or ethionamid was inhibited at the same concentrations as those of the drugs in the sensitive strains, showing no cross resistance between capreomycin and these antituberculosis drugs previously used.

2) Variants resistant to 100 mcg/ml of Kanamycin or viomycin were able to grow on each of the above four media containing 50 to 100 mcg/ml of capreomycin.

3) With the 74 wild strains isolated from patients treated or non-treated with kanamycin, the cross resistance between kanamycin and capreomycin was proved, confirming the above results with H₃₇Rv.

4) No substantial enhancement of antituberculosis activity of capreomycin was observed by its combined use with PAS, isoniazid, ethionamid or ethambutol in the *in vitro* experiments with Kirchner's semi-solid media.

5) Albino dd/y male mice, weighing approximately 18 gm, infected intravenously with H₃₇Rv were treated with the drugs as in the following.

- (1) Control group : 0.1 ml saline, daily.
- (2) CAM group : 1 mg capreomycin, daily.
- (3) PAS group : 4 mg PAS-Na, daily.
- (4) SM group : 1 mg dihydrostreptomycin sulfate, daily.
- (5) INH group : 0.2 mg isoniazid, daily.
- (6) TH group : 1 mg ethionamid, daily.
- (7) ENB group : 1 mg ethambutol, daily.
- (8) CAM+INH group : 1 mg capreomycin plus 0.2 mg isoniazid, daily.
- (9) CAM+TH group : 1 mg capreomycin plus 1 mg ethambutol, daily.
- (10) CAM+EMB group : 1 mg capreomycin plus 1 mg ethambutol, daily.

* From The First Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School, Honjo-machi, Kumamoto City, Japan.

The treatment was started on the next day of infection and continued for three weeks. The therapeutic effects were evaluated comparing the viable units of tubercle bacilli in lungs and spleens of the animals.

The suppressive effect of capreomycin on tubercle bacilli in organs was detected to the same extent as those of streptomycin, PAS, ethionamid and ethambutol.

The combined administration of capreomycin did not enhance, *in vivo* just as *in vitro*, the antituberculosis activity of isoniazid, ethionamid or ethambutol.

緒 言

Capreomycin (CAM) は1961年に The Lilly Laboratory において Herr¹⁾ らによつて *Streptomyces capreolus* の培養濾液より分離されたペプチド抗生物質である。その分子量はほぼ740であり、CAMの構成アミノ酸の種類は同じペプチド抗生物質である Viomycin (VM) と類似している。

また Herr¹⁾ らは、試験管内抗菌力、動物実験および交叉性について検討し、抗酸性菌に有効であると述べ、Streptomycin (SM), VM とは交叉耐性がないと報告した。

Robinson²⁾ らも試験管内実験で抗酸菌に対して有効であることを報告し、SM, Isoniazid (INH), Ethioamide (TH) および Kanamycin (KM) とは交叉耐性がないことを報告している。

Herr¹⁾ ら、Robinson²⁾ らの報告と同じ年に Miller ら、Popplewell³⁾ らによつて CAM の臨床成績が発表された。その結果は CAM は毒性が少なく、臨床的に有効であることを報告している。

わが国でも中村⁴⁾ らによつて、マウスおよびモルモット実験結核症に対する治療効果が検討され、CAM が確実な治療効果を示すことを確認している。また小関⁴⁾ らは CAM のアミノ酸構成が VM と類似していることを指摘し、Herr らの VM との交叉耐性がないという報告とは逆に、人型結核菌 H₃₇Rv 株および *Mycobacterium phlei* を用いた試験管内実験で CAM は VM と完全に相互交叉耐性を示し、KM とは軽度または中等度の相互交叉耐性のあることを報告している。

私も CAM について、その抗結核作用、および他種抗結核剤との併用効果について検討する機会を得たので、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

使用培地：1% 小川培地。10% 馬血清加 Kirchner 寒天培地 (寒天 2%)。10% 馬血清加 Kirchner 半流動培地 (寒天 0.1%)。および Dubos 液体培地を用いた。

CAM 含有培地作製法：CAM (Lilly, Lot # 404-579 B-209 J) を1% 小川培地では凝固滅菌前に加え力価修正した所要濃度をもつて表わし、他の培地では高圧滅菌後加えた力価修正所要濃度をもつて表わした。

培養条件および抗菌力判定：培養は 37°C で行ない、小川培地では4週間、Dubos 液体培地では2週間、Kirchner 寒天および同半流動培地では3週間培養後に培地上的の発育集落程度をもつて判定した。Dubos 液体培地では菌接種後毎日1回振盪し、他の培地では判定まで静置した。

使用菌株および接種菌量：実験成績の項に記載した。

II) 動物実験

体重 18g 前後の dd 系雌性マウスに人型結核菌 H₃₇Rv 株の湿菌量 10⁻²mg (8×10⁵v. u.) を尾静脈内接種し、1群6匹ずつ下記のごとき実験群に分けた。

CAM の他に治療に用いた薬剤は INH (塩野義製薬)、PAS-Na (第一製薬、以下 PAS)、dihydrostreptomycin sulfate (武田薬品)、TH (田辺製薬) Ethambutol (日本 Lederle 社、以下 EMB) で治療は感染翌日より21日間行なつた。TH のみは経口投与し、他の薬剤はすべて皮下注射により投与した。各薬剤は滅菌蒸留水 0.1ml に所要濃度を含有せしめた。

治療終了後7日間放置した後屠殺剖検し、肺および脾の臓器 10mg 中の生菌数を数えて治療効果を検討した。

対照群：生食水 0.1 ml/匹/日皮下注射。

CAM 治療群：1 mg/匹/日皮下注射。

PAS 治療群：4 mg/匹/日皮下注射。

SM 治療群：1 mg/匹/日皮下注射。

INH 治療群：0.2 mg/匹/日皮下注射。

TH 治療群：1 mg/匹/日経口投与。

EMB 治療群：1 mg/匹/日皮下注射。

CAM, INH 併用治療群：CAM 1mg と INH 0.2mg/匹/日併用皮下注射。

CAM, TH 併用治療群：CAM 1mg と TH 1mg/匹/日併用皮下注射および経口投与。

CAM, EMB 併用治療群：CAM 1mg と EMB 1mg/匹/日併用皮下注射。

Table 1. Growth Inhibitory Effect of CAM against Various Strains of Tubercle Bacilli in vitro.

Media CAM conc. mcg/ml	1% Ogawa's egg media					Dubos' liquid media					Kirchner's agar media					Kirchner's semi-solid agar media							
	0	1	5	10	25	50	100	0	1	2	5	10	20	50	100	0	1	2	4	10	20	50	100
H ₃₇ Rv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv, INH-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv, PAS-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv, SM-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv, TH-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv, KM-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv, VM-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sonoda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sonoue	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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.
 *2: Dubos' liquid media (Reading was made after 2 weeks.)
 +++ : Dense turbid.
 ++++ : Moderately turbid.
 + : Slightly turbid.

*3: Kirchner's agar media (Reading was made after 3 weeks.)
 Symbols are the same as those in *1.
 *4: Kirchner's semi-solid agar media (Reading was made after 3 weeks.)
 Symbols are the same as those in *1.

実験成績

実験 1. CAM の試験管内結核菌発育阻止力

H₃₇Rv 株, H₃₇Rv 株の INH, PAS, SM, TH, KM, VM のおのおの 100mcg/ml 耐性株。および肺結核患者より分離した園田株 (INH, SM, PAS, KM に感性), 園上株 (INH 10γ, SM 100γ, PAS 10γ 耐性, KM には感性株) 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。

CAM の完全発育阻止濃度は表 1 に示すごとく, H₃₇Rv の KM, VM 耐性株を除く菌株に対して, 1% 小川培地では 25 mcg/ml, ただし H₃₇Rv 株と園田株に対しては 50 mcg/ml。

Dubos 液体培地では 5mcg/ml, ただし H₃₇Rv 株に対しては 5 mcg/ml。

Kirchner 寒天培地では 10 mcg/ml, ただし園上株に対しては 5 mcg/ml。

Kirchner 半流動寒天培地では 10 mcg/ml, ただし H₃₇Rv 株の INH, PAS 両耐性株および患者由来の園田株, 園上株に対しては 4 mcg/ml であった。

H₃₇Rv 株の KM および VM 耐性株では各培地とも 50~100 mcg/ml の高濃度まで発育を示し, CAM 感受性の低下がみられた。

実験 2. 患者由来菌株の Kirchner 半流動培地での CAM 感受性

KM 使用, 未使用にかかわらず肺結核患者より分離した 74 菌株の CAM 感受性を検討し, 同時に KM の感受性をもあわせて検討した。接種菌量は Dubos 液体培地 7 日培養菌液を 10⁻² 稀釈し, その 0.1 ml を接種した。

Table 2. Interrelation between MIC of CAM and KM with 74 Strains of Tubercle Bacilli Isolated from Tuberculous Patients Treated or Non-treated by KM

MIC of KM	mcg/ml	MIC of CAM			
		5	10	50	>50
1	23	2			
10	36	5			
100			2		
>100		1	4		1

成績は表 2 に示すごとく, CAM の最小発育阻止濃度 (以下 MIC) が 5 mcg/ml の菌種は 59 株 (81.9%), 10 mcg/ml の菌種は 8 株 (11.1%), 50 mcg/ml の菌種は 6 株 (8.3%), 50mcg/ml 以上の菌種は 1 株 (1.4%) であり, 大多数が 5mcg/ml の MIC を示した。

また KM の MIC が 100mcg/ml および 100mcg/ml 以上では CAM の MIC も 10 mcg/ml が 1 例, 50 mcg/ml が 6 例, 50mcg/ml 以上 1 例と KM の MIC と CAM の MIC は相関していた。

Table 3. Growth Inhibitory Effect of CAM Combined with INH, PAS, TH and EMB against H₃₇Rv Strain in Kirchner's Semisolid Agar Media

mcg/ml		INH					PAS					TH					EMB				
		0	0.031	0.062	0.125	0.25	0	0.125	0.25	0.5	1	0	0.625	1.25	2.5	5	0	0.125	0.25	0.5	1
CAM	0	++	+	+	3	0	++	+	+	+	4	++	+	+	1.5	0	++	++	+	+	+
	0.25	+	+	+	0.5	0	++	+	+	+	3.5	++	+	+	0	0	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	+	1.5	0	0	+	+	+	+	12.5
	1	+	7	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	11.5
	2	0	0	0	0	0	+	+	2.5	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0

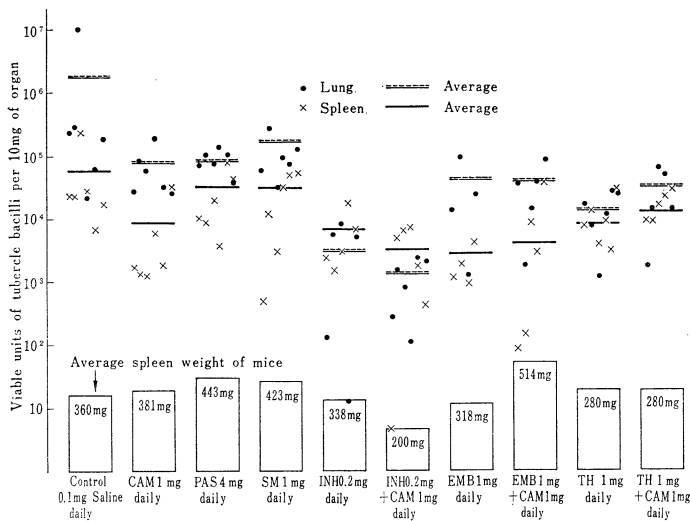
* Symbols in the table are the same as those in table 1.

Table 4. Growth Inhibitory Effect of CAM Combined with INH, PAS, TH and EMB against Sonoda Strain in Kirchner's Semisolid Agar Media

mcg/ml		INH					PAS					TH					EMB				
		0	0.031	0.062	0.125	0.25	0	0.125	0.25	0.5	1	0	0.625	1.25	2.5	5	0	0.125	0.25	0.5	1
CAM	0	++	+	+	3	0	++	+	+	5.5	0	++	+	+	1.5	0	++	++	+	+	+
	0.25	+	+	+	0.5	0	++	+	2.5	2	0	++	+	+	0.5	0	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	0	0	+	+	9.5	0	0	+	+	1.5	0	0	+	+	+	+	11
	1	+	7	0	0	0	+	2.5	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	5
	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0

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

Fig. 1. In Vivo Single or Combined Effect of CAM with Other Antituberculosis Agents on Experimental Tuberculosis in Mice Infected Intravenously with H₃₇Rv Strain



実験 3. 他剤との併用効果

H₃₇Rv 株と園田株を用いて、Kirchner 半流動培地 5 ml に 10⁻³mg の菌量を接種した。成績は表 3, 4 に示すごとく両株とも CAM と INH, PAS, TH, EMB の間に多少の協力作用を認めた。しかし拮抗作用は認められなかった。

実験 4. CAM のマウス実験的結核症に対する治療効果

成績は図 1 に示すごとく、対照群に比較して、CAM 治療群の臓器内生菌数は明らかに少なかったが、INH 単独治療群は CAM 1 mg, SM 1 mg, PAS 4 mg, EMB 1 mg, TH 1 mg の各単独治療群より一そう少なかった。CAM 1 mg と SM 1 mg, PAS 4 mg, EMB 1 mg, TH 1 mg の各単独治療群の間には有意差がなかった。また用いた薬剤投与量では CAM と INH, CAM と TH, CAM と EMB の併用治療群と各単独治療群との間に有意差を

認めなかつた。

総括ならびに考察

Herr¹⁾らはCAMは抗酸性菌に有効であると述べている。試験管内でのCAMの抗菌力についてRobinson²⁾の報告はLöwenstein Jensen培地を使用しH₃₇Rv株およびそのSM, INH, TH耐性株に対して8~16mcg/mlの最小発育阻止濃度を示した。また小関⁴⁾らはH₃₇Rv株を用い試験管内抗菌力を検討し、10⁻¹mgおよび10⁻³mgの接種菌量でCAMの最小発育阻止濃度は、小川培地10~25mcg/ml, Kirchner半流動培地2.5~5mcg/ml, Dubos液体培地1~2.5mcg/mlであつたと報告している。またM. Phlei株を用いて同量の接種菌量で、小川培地では10~50mcg/mlであつたと報告している。私のH₃₇Rv株の成績は10⁻¹mgの接種菌量で、1%小川培地50mcg/ml, Kirchner寒天培地10mcg/ml, Kirchner半流動培地10mcg/ml, Dubos液体培地5mcg/mlの最小発育阻止濃度を示しており、上述報告者の発育阻止濃度より高濃度迄発育を示した成績であつた。これはDubos液体培地での発育良好な菌を用い、接種菌量が多かつたためと思われる。また小川培地での最小発育阻止濃度は、小関らの報告、私の成績ともに50mcg/mlを示すものがみられたが、これは卵培地による抗菌力の不活性が考えられる。

H₃₇Rv株の各薬剤耐性株については、Robinson²⁾の報告によると、H₃₇RvのSM, INH, TH各耐性株を用い、Löwenstein Jensen培地を使用して、8~16mcg/mlの最小発育阻止濃度を示している。また小関⁴⁾の報告ではH₃₇Rv株のSM耐性株を用いた小川培地での成績は10⁻¹mgの接種菌量で10mcg/ml、であつた。またKirchner半流動培地では5mcg/ml, Dubos液体培地では1mcg/mlの最小発育阻止濃度を示し、またINH耐性株は小川培地およびKirchner半流動培地では25mcg/ml以上(50mcg/ml以上は未検)、Dubos液体培地では2.5mcg/mlの最小発育阻止濃度を示している。

私のH₃₇Rv・SM耐性株を使用した実験では、小川培地では25mcg/ml, Dubos液体培地では5mcg/ml, Kirchner寒天培地10mcg/ml, Kirchner半流動培地では10mcg/mlを示した。

H₃₇Rv・INH耐性株に対しても小関⁴⁾ら、およびRobinson²⁾らの報告よりやや高濃度での最小発育阻止濃度を示した。これはH₃₇Rv株と同様に接種菌量に基因するものと思われる。

以上の成績からH₃₇Rv株のINH, PAS, SM, TH各耐性株は標準株とほぼ同等の最小発育阻止濃度を示しており、CAMはINH, PAS, THの各薬剤と交叉耐性を示さなかつた。

H₃₇Rv株のKM 100 γ 耐性株, VM 100 γ 耐性株に対

して、用いた各培地ともCAM 50~100mcg/mlまで発育阻止が認められない成績であつた。

Herr¹⁾らの報告によると、VM耐性株は標準株とほぼ同等の濃度で発育を阻止されており、私の成績と異なつている。

小関⁴⁾らはCAMとKMおよびVM, そしてNMとの間に交叉耐性の存在を試験管内実験にて確かめていて私の成績と一致する。

以上の成績はCAMがKMおよびVMとの間に交叉耐性を示した成績であつた。

私の行なつたKM使用、未使用にかかわらず肺結核患者より分離した74菌株のCAMとKMのMICの相関でも、KM 10 γ 以上の耐性株ではCAMにも10 γ 以上の耐性を示しており、明らかにKM耐性菌のCAM感受性低下を示すもので、KMとCAMの交叉耐性の存在を示しているものと考えられる。

試験管内併用効果実験ではCAMとPAS, CAMとEMBの併用に比較しCAMとINH, CAMとTHの併用が発育阻止力の増強を示したように思える。しかし著明な相乗作用は認められなかつたが、ある程度協力的で、拮抗作用は認めなかつた。

マウス実験的結核症に対するCAMの治療効果は、Herr¹⁾らはその肺組織学的所見により効果を検討し、CAM 500mcg/kg投与成績と同量量のSM治療成績が匹敵したと述べている。

また投与量が詳細でないが併用投与ではCAMとPASの併用がマウス実験的結核症に効果があつたと述べている。

中村⁵⁾らはマウス実験的結核症に対する延命効果を検討してCAM 1日4mgの投与でKM 2mgと同等の効果を示したと報告している。

モルモット実験的結核症に対しては中村⁵⁾らの報告がありモルモットにはCAM 1日20~40mgの投与で、SM 10mg, KM 10mg, またはINH 2mgとほぼ同等の成績を示したと述べている。

私のマウス実験的結核症に対するCAM 1mg投与による治療効果は対照群に比較して明らかに認められた。なお併用効果については、用いた投与量の範囲では、INH, TH, EMBとの間に明らかな協力作用は認められなかつた。

以上の成績からCAMはSM, VM, KMに続いて現われた相当期待できる新抗結核抗生物質と考えられる。しかしKM, VMと交叉耐性のあることは今後臨床上問題になる薬剤であろう。

摘 要

CAMの抗結核作用を実験的に検討して次の成績を得た。

1) CAM は人型結核菌 H₃₇Rv 株に対して 1% 小川培地 25~50 mcg/ml, Kirchner 寒天および半流動培地で 5~10mcg/ml, Dubos 液体培地で 5~10 mcg/ml の MIC を示した。H₃₇Rv 株の INH, PAS, TH, SM 各耐性株および患者由来 INH, PAS, SM に感性株。SM 100r, INH, PAS にそれぞれ 10r 耐性株の 2 株に対しても感性株と同等の成績を示した。

2) H₃₇Rv 株 KM および VM 耐性株は CAM 50~100r まで各培地とも発育阻止がみられず、交叉耐性を示す成績であった。

3) 肺結核患者より分離した 74 菌株でも、KM 10r 以上の耐性株では CAM にも 10r 以上の耐性を示し、明らかに KM と CAM の交叉耐性の存在を示すものであった。

4) マウス実験的結核症に対する CAM 1mg 投与は対照群に比較して明らかに効果を認めた。

5) 試験管内での H₃₇Rv 株および患者由来株に対する CAM と INH, TH, EMB との併用では多少協力的に発育阻止を示し、拮抗作用は示さなかつた。マウス実験的結核症に対する CAM と INH, EMB, TH との併

用では各単独群と有意差を認めなかつた。

稿を終わるに臨み、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜わり、ご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。

本論文の一部の要旨は、第 12 回日本化学療法学会総会において発表した。

文 献

- 1) Herr, E. B., Sutton, W. B. and Stark, W. M.: Tr. 21 st Conf. Pulm. Dis. V. A. A. F., 367, 1962.
- 2) Robinson, L. B. & Wichelhausen, R. H.: Tr. 21 st Conf. Pulm. Dis. V. A. A. F., 351, 1962.
- 3) Popplewell, A. G., Miller, J. D., Landwehr, A. and Green, M. E.: Tr. 21st Conf. Pulm. Dis. V. A. A. F., 375, 1962.
- 4) Koseki, Y. and Okamoto, S.: Jap. J. of M. Sc. & Biol., 16: 31, 1963.
- 5) 中村玲子, 金井興美, 室橋豊穂: 結核, 39: 5, 1964.