

実験的非定型抗酸菌症に対する Ethambutol の効果について

阪本 竜夫・合田 忠

広島大学医学部細菌教室 (主任 占部 薫教授)

国立賀茂療養所 (所長 室津健司博士)

受付 昭和 41 年 2 月 19 日

EFFECTIVENESS OF ETHAMBUTOL AGAINST MICE INFECTED WITH ATYPICAL MYCOBACTERIA*

Tatuo SAKAMOTO and Kiyoshi GODA

(Received for publication February 19, 1966)

We have reported in a previous paper that inhibitory effect of Ethambutol (EB) on twenty-three strains of atypical mycobacteria and ten strains of acid-fast bacilli isolated from natural sources was much stronger than those of PAS, Cycloserine, 1314 TH and Tibione, and comparable to those of INH, Streptomycin (SM) and Kanamycin (KM). In this paper, the writers present their studies on the effectiveness of EB against mice infected with atypical mycobacteria.

Albino dd/y male mice weighing 18 g were divided into four groups. Each group consisted of fifteen mice was infected intravenously with 0.5 mg of *M. kansasii* P1 strain, 1 mg of Nonphotochromogen Okayama strain, Photochromogen Aratani strain or 2 mg of Rapid grower Yamamoto-s strain respectively. Those groups were further subdivided into three, two of which were treated daily with subcutaneous injection of 1 mg of EB or with 1 mg of SM. Only the mice infected with Yamamoto-s strain were divided into four groups, three of which were treated with 1 mg of EB, 2 mg of KM or 1 mg of EB plus 2 mg of KM. Remaining one group was employed as a nontreated control.

The treatment was started the following day of infection, and the animals were sacrificed three days after the last drug administration. The duration of treatment was four weeks in the mice infected with P1 strain and Aratani strain, six weeks in Okayama strain infected mice and two weeks in the mice infected with Yamamoto-s strain.

Therapeutic effects were evaluated comparing macroscopic findings, viable counts of visceral organs, and body weight change, between the treated and non-treated groups.

The results are shown in Figs. 1 and 2, and Tables 1 to 4. In every aspect above mentioned, the remarkable effectiveness of EB was revealed in the mice infected with P1 strain or Okayama strain, while no significant effect was demonstrated in Aratani strain and Yamamoto-s strain. In this connection, strains P1 and Okayama were inhibited completely in vitro in the concentration of 5 mcg per ml, whereas strains Aratani and Yamamoto-s was done in the concentration of 10 mcg per ml. The combination effect of EB and KM against the mice infected with Yamamoto-s strain was remarkable, in spite of the less effectiveness in the single therapy. The therapeutic effect of SM in each group was not stronger than that of EB or was almost comparable.

* From Department of Bacteriology (Director: Prof. Kaoru Urabe), Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan.

As a conclusion, the effectiveness of EB against mice infected with atypical mycobacteria was parallel with in vitro susceptibility of the infected agents, and effectiveness in vivo of other susceptible drugs was enhanced in combination with EB, even if it has less susceptibility.

緒 言

近時、いわゆる非定型抗酸菌による結核類似の病変を起こした症例が内外においてかなり多数報告されている。それとともに、この種の抗酸菌に対する治療剤の検討も漸次行なわれるようになり、それに関する報告もすでに少なからざる数に達している。しかしながら、それらの報告によっても、非定型抗酸菌は既知の抗結核剤に対しては程度の差はあるが耐性を有することがしばしばであることがわかり、かつそのほかに優れた抗菌剤の見当たらないのが現状といえよう。

ところで、Wilkinson ら¹⁾、Thomas ら²⁾によつてはじめて報告された 2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol [Ethambutol] は、強力な抗結核剤としてその価値が認められつつあり、さらに非定型抗酸菌に対してもかなりの抗菌作用のあることが一部の報告者³⁾⁻⁷⁾によつて明らかにされている。そこでわれわれ⁸⁾はさきに本剤の非定型抗酸菌ならびに自然界抗酸菌に対する試験管内抗菌作用を多数の菌株について検討し、その結果、従来の抗結核剤に比較して勝るとも劣らない抗菌力のあることを認めて報告したが、今回は続いて非定型抗酸菌感染マウスを供試して、Ethambutol (以下 EB) の管内効果が生体内でも実証しえられるか否かについて実験し、有効性の程度についての知見を得たので以下報告する。

実験材料ならびに方法

供試菌：M. kansasii-P1 株，Scotochromogen-荒谷株，Nonphotochromogen-岡山株，Rapid grower-山本 s 株

供試動物ならびに感染方法：体重 16~20 g の市販 dd 系雄性マウスを 1 群 5~6 匹ずつとして編成し、感染はそれらの尾静脈内に、法に従つて生塩水を用いて上記の各抗酸菌株より調製した 2.5~10 mg/ml 菌液の 0.2 ml を注射することによつて P1 株では 0.5 mg が、岡山株および荒谷株にあつては 1 mg ずつが、また山本 s 株では 2 mg が、それぞれ接種されるようにした。

薬剤投与量ならびに投与方法：EB (科研化学) を 5 mg/ml の水溶液としその 0.2 ml ずつを毎日頸背部皮下に注射した。なお Thomas ら²⁾の実験に示唆を得てその効果を比較する目的で山本 s 株以外の各供試菌いずれもが感受性を示したところの Streptomycin (以下 SM) による治療群をも別に設定し、EB の場合と同様の方法で

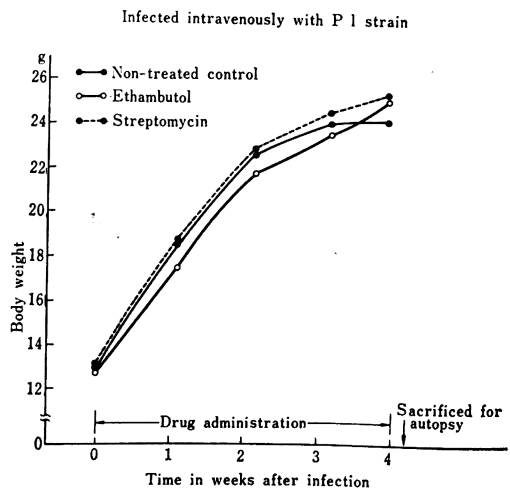
毎日 1 mg ずつの投与を行なつた。山本 s 株のみは試験管内で SM に対して強い耐性を示したので SM のかわりに比較的感受性を示した Kanamycin (以下 KM) をあて、その 10 mg/ml 水溶液の 0.2 ml ずつの注射を行なつた。なお、この山本 s 株は EB にも 10 mcg/ml という低い感受性を示すにすぎなかつたため動物体内でもその効果はあまり期待できないのではないかと予測されたので、EB+KM 併用治療群を設けてそれらの相乗効果をねらつての検討も行なつた。

すべて投薬は感染明けきの翌日より開始し、P1 株および荒谷株に対しては 4 週間、岡山株には 6 週間、また山本 s 株には 2 週間それぞれ投薬を続け、投薬終了後 3 日たつてから屠殺剖検した。

なお、上記のような投薬日数決定の根拠は、あらかじめ供試菌のマウスに対する病原性の検討を行ない、その結果肉眼的病変を形成する菌株にあつてはもつともその頻度の高い時期および体内増菌の極期を検知し、それに基づいたものである。

治療効果判定方法：毎週体重を測定しその推移を観察しつつ上述の投薬日数終了後 3 日たつてから屠殺剖検し、肺、肝、腎および脾の重量を測り、かつそれらにおける肉眼的病変の有無ないし程度を観察し、続いて法に従つてそれらよりの抗酸菌の 1% NaOH 前処置法による定量還元培養をも行なつた。以上のようにして得られ

Fig. 1. Average Body Weight Change of Each Experimental Group of Mice Treated with Ethambutol, Streptomycin and of Non-treated Control Mice



た諸所見を別に設定した無処置対照マウス群におけるそれと比較して総合的に薬効の判定を行なった。

実験成績

1) P1株感染マウスに対する効果：体重の推移については図1に示したごとく、EB投与群、SM投与群ともに順調に増加を示したが、対照群では3週までは投与群と同程度の増加を示したが4週になり軽度の減少をみた。

各群とも全例屠殺時まで生存した。肺、肝、腎および脾の肉眼的病変、肺重量および内臓10mg当りの生菌数は表1に示した。すなわち、肉眼的病変では対照群にあつては全例の肺に数コから十数コにおよぶ結節がみられたのに反し、EB投与群およびSM投与群ではそれが全く認められなかつた。定量還元培養では一般にいつて、各群とも全例のいずれの内臓からも多数の抗酸菌の集落が発生する傾向を示したが、一般的に対照群マウスの内臓よりのほうがEBおよびSM各投与群のそれよりもかなり多くの集落の発生がみられた。なおEB投与群とSM投与群の間ではわずかの差ではあるが集落発生数は後者に多数であつた。次に肺重量についてみるに、これにおいてもかなりの差をもつて対照群では投与群よりも大きかつた。

2) 荒谷株感染マウスに対する効果：体重の推移については、対照群とEBおよびSM各投与群との間にと

くにいほどの差はなく、いずれも3週まで順調に増加を示したが4週目になつて各群とも2~3gの減少を示した。全例生存した。肉眼的病変では対照群の1例の左肺上野に小豆大の膿瘍が認められ、その内容は乾酪性物質で充満し、抗酸菌が多数に認められた。これ以外には全群全例ともその内臓には肉眼的の異常は認められなかつた。また各内臓重量の比較でもほとんど各群間に差はなかつた。各内臓よりの定量還元培養の結果は表2に示したように、EB投与群の肺よりの集落発生数は対照群およびSM投与群よりのそれらよりもかなりわずかにとどまつた。肺以外の内臓では3群の間にほとんど差はなかつた。

3) 岡山株感染マウスに対する効果：体重の推移については対照群とEBおよびSM各投与群との間にほとんど差はなく、平均して1週目には3~5gの範囲で増加し、2週目には注射時と同程度まで減少し、以後はまた順調に増加した。生存日数、内臓の肉眼的病変およびそれよりの還元培養については表3に示したように対照群では2例がそれぞれ33日目および43日目に死亡したのに対して、投与群では全例が45日目の屠殺時まで生存した。内臓の肉眼的病変では、対照群のNo.2の肺に結節を散見し、肝にも表面全般にかなり密に小硬結斑の散布が認められ、また同群のNo.5の脾には肥大と十数コの粟粒大結節とがみられた。これに対して投与群ではいずれのマウスにも異常を認めなかつた。各内臓よりの定量還元培養では、EBおよびSM各投与群にあつて

Table 1. Therapeutic Effects on Macroscopic Findings, Number of Viable Bacilli in Each Organ and Lung Weights of Mice Infected with P 1 Strain

Treatment	Organs				Lung weights (mg)
	Lungs	Liver	Kidneys	Spleen	
Non-treated	+/###	-/+	-/+	-/##	260
	+/###	-/###	-/###	-/###	500
	+/###	-/##	-/###	-/###	330
	+/###	-/##	-/+	-/##	380
	+/###	-/##	-/###	-/##	360
Ethambutol	-/+	-/+	-/+	-/+	200
	-/##	-/+	-/+	-/+	180
	-/+	-/+	-/+	-/+	180
	-/+	-/+	-/+	-/+	240
	-/+	-/+	-/+	-/+	200
Streptomycin	-/+	-/###	-/+	-/+	170
	-/+	-/###	-/###	-/+	170
	-/+	-/+	-/###	-/+	190
	-/+	-/###	-/###	-/+	210
	-/+	-/+	-/+	-/+	220

Note: Numerator shows the macroscopic findings, +, # denotes the degrees of tubercle formation. Denominator shows number of viable bacilli, +, # denotes the degrees of proliferation.

Table 2. Therapeutic Effects on Number of Viable Bacilli Recovered from Each Organ in Mice Infected with Aratani Strain (in 10 mg)

Treatment	Organs			
	Lungs	Liver	Kidneys	Spleen
Non-treated	2400	220000	1200	70000
	5300	1300000	3000	12000
	700	230000	4700	240000
	6000	800000	800	270000
	3300	2000000	7400	60000
Ethambutol	400	670000	2500	200000
	100	350000	600	400
	120	300000	1600	500000
	500	330000	200	2000
	900	240000	600	200000
Streptomycin	1500	580000	1200	310000
	2000	800000	1900	210000
	1000	960000	2200	80000
	4600	250000	900	30000
	5000	580000	3200	60000

Note: Number in the table indicates viable counts in 10 mg of each organ.

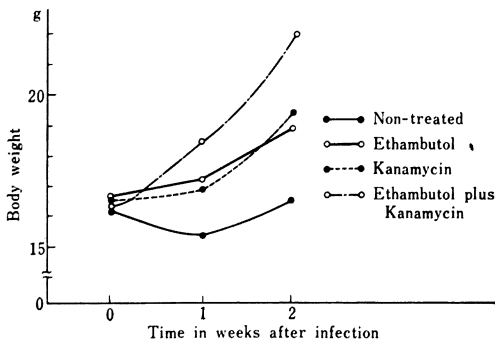
Table 3. Therapeutic Effects on Survival Time, Macroscopic Findings and Number of Viable Bacilli in Each Organ of Mice Infected with Okayama Strain

Treatment	Days to sacrifice	Organs			
		Lungs	Liver	Kidneys	Spleen
Non-treated	33*	200	40000	70	1700
	43*	30(+)	300000(+)	40	8200
	45	46	260000	9	5400
	45	500	110000	19	2700
	45	100	30000	70	3000(+)
Ethambutol	45	2	3800	2	600
	45	0	2	0	1
	45	9	16000	2	11000
	45	16	30000	5	14000
	45	15	14000	2	2200
Streptomycin	45	8	7200	1	3900
	45	0	1900	2	500
	45	6	500	5	2400
	45	1	2500	8	200
	45	12	4700	2	5300

Note: () Shows the macroscopic findings; +, # denotes the degrees of tubercle formation. Number in the table indicates viable counts in 10 mg of each organ. * Survival days

は肺および腎よりの集落発生数において対照群のそれらに比較して少なく、とくに EB 投与群の No. 2 の肺および腎ならびに SM 投与群の No. 2 の肺からはともに集落発生は全くみられなかつたのが注目する所見であつた。しかし EB 投与群のうちの 2 例の脾よりの還元培養ではむしろ対照群のそれに比してやや多数の集落が発生したが、この差はとくに著明なものではなかつたし、また EB 投与群と SM 投与群の間にも全体的にみてとくにいほどの差はなかつた。各内臓の重量の比較では上述の対照群の脾および EB 投与群 No. 1 の脾ともに肥大が認められ、それぞれ 1,030 mg および 1,020

Fig. 2. Average Body Weight Change of Four Groups of Mice Infected with Yamamoto-s Strain



mg を示したが、その他の内臓にあつては全く差はなかつた。

4) 山本 s 株感染マウスに対する効果：体重の推移では図 2 に示すごとく、対照群と各投与群との間に明らかな差があつた。すなわち、対照群のみに 1 週目に体重の減少を認め、2 週目になつて感染時の体重に復したのに対し、各投与群ともに逐週増量を示した。とくに EB+KM 併用投与群では著しい増量があり、KM 単独投与群と EB 単独投与群とがそれについて増量した。

屠殺後、各内臓の重量を測定した結果では各群間にはとんど差は認められなかつたが、これら内臓の肉眼的病変では表 4 に示したごとく、対照群の 4 例の肺および 5 例の腎において結節を軽微ないしかなりの程度に認めたのに対し、EB 単独投与群では 1 例の腎に、また EB+KM 投与群では 1 例の肺にそれぞれわずかに 2~3 コの

Table 4. Therapeutic Effects on Macroscopic Findings and Number of Viable Bacilli of Each Organ of Mice Infected with Yamamoto-s Strain

Treatment	Organs			
	Lungs	Liver	Kidneys	Spleen
Non-treated	21	80	5	10600
	60(+)	67	48000(+)	1900
	250(+)	14	10900(+)	55
	17(+)	30	9700(+)	900
	190	150	54000(+)	180
	52(+)	34	33000(+)	370
Ethambutol	33	170	18000	1500
	132	190	37000(+)	400
	77	20	19000	270
	23	58	340	120
	0	0	3600	100
	400	27	15000	360
Kanamycin	120	100	7	590
	5	30	4700	39
	12	46	0	300
	58	93	18000	120
	2	33	700	140
	17	35	1	46
Ethambutol + Kanamycin	0	25	6	210
	71	23	120	120
	7(+)	0	110	4
	0	13	0	60
	26	1	0	20
	0	2	86	5

Note: () Shows the macroscopic findings; +, # denotes the degrees of tubercle formation. Number in the table indicates viable counts in 10 mg of each organ.

病変を認め、とくにこれらは、対照群のそれらが明らかな結節と認められたのに対して白斑に近似しているにすぎなかつた。KM 投与群では全く異常を認めなかつた。ところが各内臓よりの定量還元培養の結果では、EB 投与群にあつては肉眼的病変の成績と平行していないで対照群とほとんど選ぶところのない程度の集落発生があつた。KM 投与群では腎において対照群および EB 投与群よりも集落発生数がかかなり僅微であり、6 例中 3 例までに陰性ないし 1~7 コの集落発生を示したにすぎなかつた。さらに EB+KM 併用群では一般的にいついづれの内臓からも他の 3 群におけるよりも集落の発生数ははなはだしく少数であつた。

考 察

EB の実験的結核症に対する有効性に関する報告はすでにきわめて多数^{2)4)9)~14)}みられるが、その非定型抗酸菌症に対する治療効果の報告はいまだほとんどないといつてよいようである。われわれ⁸⁾はさきに非定型抗酸菌 23 株ならびに自然界抗酸菌 10 株に対する EB の管内抗菌作用を検討し、その結果、EB はこれらの抗酸菌に対し、一般的にいつ PAS, 1314 TH, Cycloserine および Tibione よりはるかに強力であり、また INH, SM および KM に勝るとも劣らない抗菌作用を示しうるのであることを報告した。ところで今回の供試菌に対する EB の最少発育阻止濃度は前報⁸⁾ならびに本実験に先だつて行なつた予備的試験管内実験の結果よりすると(いずれの場合にも 1% 小川培地を使用したのであるが)、P1 株および岡山株に対しては 5 mcg/ml で、また荒谷株および山本 s 株に対しては 10 mcg/ml でそれぞれ完全発育阻止を示すことが分かつた。なお SM では、P1 株および岡山株に対しては 10 mcg/ml で、また荒谷株に対しては 100 mcg/ml 以上で阻止し、さらに KM では山本 s 株に対して 10 mcg/ml で発育阻止を示した。これらの成績より推察すると、P1 株および岡山株に対する EB の管内効果は人型菌 H₃₇Rv 株に対するとほぼ同程度のように思われるところからして、EB のこれらの抗酸菌に対する生体内効果はかなり期待できるのではないかと思われた。

この点に関しての今回の追究の結果でははたして P1 株では対照群においては全例の肺に肉眼的病変をつつたのに対して、EB 投与群では肉眼的病変の形成は全くなく、定量還元培養の結果および肺重量にあつても対照群に比して EB 投与群に効果が認められる成績が得られた。同時に Thomas ら²⁾の報告に準じて、EB の効果の程度を既知治療剤のそれと比較する目的で SM 投与群を設定してみたが、その結果によると EB 投与は SM 投与に比して多少とも優れた成績の期待できることがわかつた。なお上記の Thomas らはマウスの実験的結核

症に対して、生存率と薬剤毒性の限界との関連性において EB に SM 以上の効果があつたとしているが、上記の成績にはこれと全く対比されうものがあると思われ、したがつて M. kansasii (P1 株) に対しては EB は結核菌の場合と同程度に SM 以上に有効であるものと考えられた。次に岡山株についてみるに、対照群では 2 例が死亡し肉眼的にも病変が認められたのに対し、EB 投与群にはそのような異常は認められず、かつ各内臓より定量還元培養において、EB および SM 両投与群ではいずれも対照群に比して集落発生数がかかなり減少していた。かかる所見はとくに肺および腎において著明であつて明らかに治療の効果は認められた。

荒谷株については、EB の試験管内効果が前記の 2 菌株に比較して劣つていたが、各内臓よりの定量還元培養では EB 投与群の肺よりの集落発生数が対照群のそれに比較してより少なく効果はやはり前 2 菌株に対するほどには著明でなかつたが、なお多少とも有効ではあつた。他方 SM 投与群ではいずれの所見においても対照群との間に差はなくその効果は全くなかつたように思われた。なお、これは管内実験の成績⁸⁾とほぼ合致するものである。

山本 s 株については、試験管内効果⁸⁾より推察して荒谷株の場合と同様に満足すべき生体内効果は期待できないかと思われたので、本菌株が比較的強い感受性を示すところの KM との併用効果をも合わせ検討してみた。その結果は EB 単独投与群では肉眼的病変においても平均体重の推移においても治療効果があつたかのごとく推察できたが、定量還元培養成績のうえからは効果の点に疑問がもたれた。KM 単独投与群では平均体重の推移および肉眼的病変の点では対照群に比較して上記の EB 投与群と同程度には効果があつたかと思われたが、定量還元培養では腎においてわずかながら発生集落数の低下がみられた程度だつた。ところが、EB+KM 併用投与を試みたところ効果が著明に認められ、効果がほとんどないか、あつてもわずかと思われる EB と同様の KM とを併用することによつてマウスの実験的抗酸菌症に著明な効果の現われることがはつきりと認められた。

さて、教室の太刀掛¹⁵⁾は多数の非定型抗酸菌ならびに自然界系抗酸菌を供試し、多種の化学療法剤について有効剤の探索を管内実験と続いての生体内実験とによつて行なつた。その結果、M. kansasii に対しては 1314 TH をはじめとして多くの有効剤のあることを認めたが、われわれの今回得た成績からすると EB もまたこの M. kansasii に対する有効剤の 1 つに付け加えられるべきであろうと考える。なお、太刀掛¹⁵⁾によれば、Nonphotochromogen 佐世保株では Cycloserine が、また同 100616 株では Tetracycline がそれぞれもつとも有効であり、同甲府株では有効な薬剤は見当たらなかつたと

述べているが、われわれの供試した同じく Nonphotochromogen であるところの岡山株では EB に阻止効果のあることを認めた。

さらに太刀掛は Scotochromogen についての実験で Scotochromogen P5 株に対しては 1314 TH が、同松本株に対しては Erythromycin が、また同大久保株に対しては Novobiosin がそれぞれ有効であったとしているが、しかしそのさいの有効程度はとくに著しいものではなかつたようである。そして従来報告よりすると、この菌群に対しては有効剤にみるべきものが前記の M. kansasii 群に比べるときわめて少ないというのが一致した意見のようであるが、われわれの今回の同じく Scotochromogen たる荒谷株においても EB の効果は上述の P1 株の場合よりもかなり劣るものがあつた。

ところで実験的感染動物内での薬剤効果の追究には、感染と前後して治療を開始し菌の消長を観察して行なう方法と、感染後病巣の確立を待つて治療を開始し病巣の修復、治癒を観察して行なう方法とに大別できると思われるが、本実験では一般的にいつて非定型抗酸菌のマウスに対する態度に、M. kansasii のごとくかなり強い毒力を示すものから、ほとんど毒力を示さないものにいたるまでの種々の程度差のあることのために、あえて前者の方法を選んで実施したのである。そのため供試薬剤の効果の比較にあつては必然的に各内臓よりの定量還元培養に主眼を置き、平均体重の推移ならびに肉眼的病変を形成しうる菌株についてはその程度をあわせ追究することにどめて、病巣の修復、治癒の程度の比較は行なわなかつたが、抗酸菌の消長が化学療法の効果の一指標たりうるものとするならば、EB は非定型抗酸菌症の少なくとも一部のものに対しては従来の抗結核剤に比べて勝るとも劣らない治療剤と考えられ、臨床的、実際的にも試用されて然るべきものといつてよからう。

結 論

マウスの実験的非定型抗酸菌症に対する Ethambutol

(EB) の効果を検討し、その有効性を認めた。効果の程度についてはさきに行なつた管内実験の成績⁸⁾ とほぼ平行した感があつた。すなわち、管内で発育阻止濃度が 5 mcg/ml であつた M. kansasii P1 株および Nonphotochromogen 岡山株に対しては今回の生体実験においても相当な効果が認められ、Scotochromogen 荒谷株および Rapid grower 山本 s 株では管内効果が前 2 菌株に対するよりも劣つているためか、今回の生体内効果もあまり著明ではなかつた。ところが、山本 s 株に対しては EB に Kanamycin を併用すれば生体内効果がみるべき程度に上昇した。

終りにご指導、ご校閲を賜つた恩師占部薫教授に深謝し、終始ご鞭撻をいただいた室津健司所長に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Wilkinson, R. G. et al. : J. Amer. Chem. Soc., 83 : 2212, 1961.
- 2) Thomas, J. P. et al. : Amer. Rev. Resp. Dis., 83 : 891, 1961.
- 3) Karlson, A. G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 902, 1961.
- 4) Karlson, A. G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 905, 1961.
- 5) 伊藤文雄 他 : 日胸臨, 22 : 36, 1963.
- 6) 山本和男 他 : 日胸臨, 22 : 799, 1963.
- 7) 中村善紀 : 日本医事新報, 2117 : 13, 1964.
- 8) 合田忠 他 : 結核, 40 : 154, 1965.
- 9) Karlson, A. G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 86 : 439, 1962.
- 10) Lal, H. M. et al. : Amer. Rev. Resp. Dis., 87 : 870, 1963.
- 11) 岡捨己 他 : 日結研第 1 回総会抄録, 1963.
- 12) 前田徹 他 : 第 3 回胸部疾患学会抄録, 1963.
- 13) 金井興美 他 : 結核, 39 : 69, 1964.
- 14) 森山英五郎 : 結核, 39 : 191, 1964.
- 15) 太刀掛舜輔 : 広大医学雑誌, 12 : 71, 1964.