

## 新抗生物質 Tuberactin の抗結核作用に関する実験的研究

豊原 希一

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎龍郎)

受付 昭和 43 年 5 月 15 日

STUDY ON THE ANTITUBERCULOUS ACTIVITY OF  
TUBERACTIN, A NEW ANTIBIOTIC\*

Mareichi TOYOHARA

(Received for publication May 15, 1968)

The new antibiotic, Tuberactin (TU), was isolated and purified from the culture's filtrate of streptomyces griseoverticillatus var tuberacticus. The antituberculous activity of TU was studied both in vitro and in vivo. The chemical formula of TU is not yet decided, but this antibiotic is the basic peptide and is easily soluble in water. The construction of TU is not the same with VM, but seems to be similar to that. LD<sub>50</sub> of TU to mouse is more than 200 mg/kg intravenously and more than 1,600 mg/kg intramuscularly.

(1) The antituberculous activity in vitro.

employed strains : H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>RvSMR, H<sub>37</sub>RvKMR, H<sub>37</sub>RvCPMR, H<sub>37</sub>RvVMR

employed medium : 10% horse serum added Kirchner liquid medium

drug concentration (mcg/ml of medium) : 2, 4, 8, 16.

inoculation size : 10<sup>-1</sup> mg

Minimum inhibitory concentration was decided at the end of three weeks after inoculation. The result is shown in Table 1. The growth of H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>RvSMR and H<sub>37</sub>RvKMR was inhibited by 4 mcg/ml, but cross resistance was found between TU and VM.

(2) Effect of TU on experimental tuberculosis of guinea pigs.

Each guinea pig was inoculated with 0.05 mg of lyophilized tubercle bacilli of strain Kurono at the left site of abdomen subcutaneously. Viable units of employed strain were 2 × 10<sup>6</sup> per 1 mg. Guinea pigs were divided into the following four groups at the third week after infection.

the first group : no treatment

the second group : 10 mg of SM daily subcutaneously

the third group : 40 mg of TU daily subcutaneously

the fourth group : 40 mg of VM daily subcutaneously

Tuberculous guinea pigs were treated for five weeks with each drug. On the next day of the end of treatment they were killed and autopsied. Macroscopic changes of internal organs and lymphnodes were observed and a certain amount of lung and spleen was cultivated. The result of macroscopic findings is shown in Fig. 1. The macroscopic pathological changes of the treated groups were proved to be much less than those of non-treated control group. Effect of TU was almost the same with that of VM, but the treatment with 10 mg of SM showed a little better improvement than that with 40 mg of TU. The result of cultivation of lung

\* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

and spleen is shown in Table 2. Number of bacilli in organs of TU-treated group was remarkably less than that of control group.

(3) The chemotherapeutic effect on the tuberculosis infection of mice.

A dose of 0.01 mg ( $2.2 \times 10^4$  of bacilli) of seven days' Dubos culture was inoculated intravenously to male mouse of DD strain. The infected mice were divided in four groups. Each group consists of ten mice.

- the first group : non-treated control group.
- the second group : 4 mg of TU daily subcutaneously.
- the third group : 2 mg of TU daily subcutaneously.
- the fourth group : 4 mg of TU daily per orally.
- the fifth group : 2 mg of TU daily per orally.

The treatment was begun on the next day of infection, and was continued for three weeks. All mice were killed on the third day after the end of treatment, and the macroscopic findings of lungs were examined, and a certain amount of lung tissue was cultivated. The result is shown in Table 3. The subcutaneous administration with 4 mg of TU daily was highly effective and that with 2 mg of TU was moderately effective. Also per oral administration with 4 mg of TU was proved as effective to some extent.

## 1. はじめに

静岡県大仁町の土壌から分離した *Streptomyces griseovorticillatus* var *tuberacticus* の培養濾液より分離精製された新抗生物質 Tuberactin (以下 TU と略) の試験管内抗結核菌作用とモルモットおよびマウス実験結核症に対する治療効果をみた。TU の化学構造式は未定であるが、塩基性ペプチドで水に易溶、pH 7.0, 100°C 15 分で 100% 活性を維持する。Viomycin (VM と略) と同一構造ではないが類似しているようである。本物質の LD<sub>50</sub> はマウス静脈内注射で 200 mg/kg 以上、筋肉内注射で 1,600 mg/kg 以上である。ラットに体重 1 kg 当り 100 mg の TU を経口的に投与したとき 90 分後の血中濃度は 17.5 mcg/g, 360 分後のそれは 18.0 mcg/g, 同様の条件で筋肉内に注射したときは 90 分で 50.3 mcg/g, 360 分後 12.5 mcg/g となつた<sup>1)</sup>。

## 2. 試験管内抗菌力

### a) 実験材料ならびに方法

#### i. 供試菌株

H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>RvSMR, H<sub>37</sub>RvKMR, H<sub>37</sub>RvCPMR, H<sub>37</sub>RvVMR の 5 株

各耐性菌は、それぞれの薬剤に対し、いずれも Kirchner 血清加液体培地において 100 mcg/ml 完全耐性である。

#### ii. 使用培地および TU 添加濃度

10% 馬血清加 Kirchner 液体培地を用い培地 1 ml 当り TU 2, 4, 8, 16 mcg を含む系列をつくる。

### iii. 接種菌量

各菌株の Sauton 培地 2 週培養菌から手振り法で 1 mg/ml の菌液をつくり、その 0.1 ml すなわち 0.1 mg を TU 含有培地に添加。培養 3 週後に判定。

### b) 成績

表 1 に示す。

H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>RvSMR, H<sub>37</sub>RvKMR に対する MIC は 4 mcg/ml, H<sub>37</sub>RvCPMR に対しては 16mcg/ml, H<sub>37</sub>RvVMR に対しては 32 mcg/ml でも発育を全く阻止しえない。

## 3. モルモット実験結核症に対する治療効果

### a) 実験材料ならびに方法

#### i. 使用動物 : 体重約 500 g の ♂ モルモット

#### ii. 感染菌と感染方法

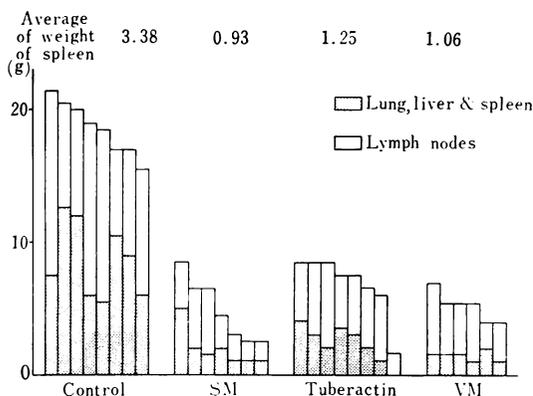
モルモット 1 匹に対し黒野株の凍結乾燥菌 0.05 mg を左腹壁皮下に接種する。生菌数は  $2 \times 10^6$ /mg であつた。

Table 1. Antituberculous Activity in Vitro of Tuberactin

mcg/ml	H <sub>37</sub> Rv	H <sub>37</sub> Rv -SMR	H <sub>37</sub> Rv -KMR	H <sub>37</sub> Rv -VMR	H <sub>37</sub> Rv -CPMR
32	—	—	—	+++	—
16	—	—	—	+++	++
8	—	—	—	+++	+++
4	—	—	—	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++	+++	+++

Media : 10% horse serum added Kirchner media  
Inoculation size :  $10^{-1}$  mg

Fig. 1. Macroscopic Findings of Guinea Pigs



## iii. 治療方法

感染3週後に3匹を殺し結核症の成立を確認し動物を4群に分かつ。

第1群：無処置対照群

第2群：SM 10mg 毎日皮下注射

第3群：TU 40mg 毎日皮下注射

第4群：VM 40mg 毎日皮下注射

治療群の薬剂量はいずれも1匹当りの量で水0.5mlに溶解したものを用いた。治療は5週間続け治療終了翌日に剖検。肉眼所見をみるとともに肺、脾の定量培養を行なつた。

## b) 成績

## i) 肉眼所見

リンパ節、内臓諸器官の肉眼的病変度を佐藤秀三法を変法した工藤法<sup>2)</sup>により判定し、これを棒グラフにしてFig. 1に示した。

各薬剤による治療群は対照群に比し、いずれも明らかに病変が弱く、TUとVMの効果はほぼ等しく脾重、 $\sqrt{\text{比脾重}}^{3)4)}$ からみるとSM 10mgはTU 40mgより、わずかに効果がよいようである。

## ii) 臓器培養成績

表2に示したごとく、各治療群の肺、脾中の菌数は対照に比し格段に少なく著明な治療効果を示した。3者間ではSM治療群の菌数がTU、VM治療群に比し、やや少ないようである。

## iii) 病理組織学的所見

TU治療群では最大病巣は小さく中心壊死も軽度で結節中の菌も小数であつた。SM治療群の変化は肺、脾ともにきわめて少なく肺では瀰漫性の肺胞隔壁の肥厚が主体で菌をほとんど認めなかつた。これに対し対照群では病巣は広範に拡がり最大病巣も大きく結節中の菌数も多かつた。

Table 2. Result of Cultivation of Organs of Guinea Pigs

	Lung	Spleen
Control	984<	1,010<
SM	0.9	26.2
Tuberculin	2.3	64.4
VM	1.3	198

Average of number of bacilli in 10 mg of organs.

Table 3. Effect of Tuberculin on Tuberculosis Infection of Mice

	Weight of body (g)	Weight of lung (mg)	Weight of spleen (mg)	Macroscopic finding of lungs	Number of bacilli in 0.1 mg of lung
Control	26.1	321	397	3.0	190
TU 4 mg s.c.	25.9	229	346	0.3	25
TU 2 mg s.c.	24.7	252	288	1.0	56
TU 4 mg p.o.	25.7	270	246	1.5	76
TU 2 mg p.o.	25.5	285	321	2.4	202

TU: Tuberculin s.c.: Subcutaneously p.o.: per oral

## 4. マウスの結核菌感染に対する治療効果

## a) 実験材料ならびに方法

i. 使用動物：体重約25gのDD系♂マウス。

ii. 感染菌と感染方法

黒野株のDubos培地培養7日菌から比濁法により0.1mg/ml相当の菌液を調製し、1匹につきその0.1mlすなわち0.01mg相当を尾静脈内に接種する。接種菌数は1匹当たり $2.2 \times 10^4$ コであつた。

iii. 治療方法：10匹ずつ5群に分かつ。

第1群：無処置対照群

第2群：TU 4mg 毎日皮下注射

第3群：TU 2mg 毎日皮下注射

第4群：TU 4mg 毎日経口投与

第5群：TU 2mg 毎日経口投与

治療群は感染翌日より治療をはじめ3週間続ける。治療終了3日後に殺し肺の肉眼所見を観察し同時に培養を行なう。

## b) 成績

各群の平均値を表3に示す。

肺の病変度は青木分類<sup>5)</sup>による。TU 4mg皮下注射群の効果は著明で肉眼所見を認めないものもあつた。2mg皮下注射群もかなりよい効果を示した。また興味あることに4mg経口投与群も対照の約半分程度の病変でおさえられ、ある程度の効果が認められた。しかし2mg経口投与では効果がほとんどなかつた。肺の還元培養成績も肉眼所見とほぼ平行していた。

## 5. 考 察

新たに合成された抗生物質を臨床に応用するためには基礎実験による有効性が立証されていなければならない。基礎実験は試験管内実験と動物実験とを柱としているが、抗結核薬として有効であるというためには試験管内抗菌力とともにマウス、モルモット両者の実験結核症に有効であることを確かめる必要がある。この点、TUは抗結核薬としての基本的条件に合格しているとみてよいであろう。

試験管内実験からみると VM 耐性菌と CPM 耐性菌ことに前者には感受性がきわめて低下しており、TU と VM の間には交叉耐性があると思われる。これは塩析クロマトにより TU、VM のスポットが接近しており構造上の類似性があることから推測される<sup>6)</sup>。

モルモット実験結核症に対しては TU は VM とほぼ同程度で SM の 1/4 あるいはそれよりやや弱いであろうと思われる。このことは人体使用量を定めるときの参考になるであろう。

マウス結核症に有効であることを証明するためには結核菌の大量感染後の延命効果や結核菌を比較的小量感染し直後より治療開始し、その肉眼所見や臓器内生菌数を見る Rist のいう Traitement abortif<sup>7)</sup> とモルモットの治療実験と同様に感染後、数週をおき治療を開始する Traitement curatif がある。小関<sup>8)</sup>によると TU の延命効果は良好であるというので、著者は Traitement abortif の方法に基づいて TU の効果をみたが、2 および 4 mg 皮下注射で治療効果を認めモルモットに対するとほぼ同程度の効力をもつていると思われる。

ここに興味があることはマウスに対し 4 mg の経口投与で有効であることである。TU をマウスに 1 回経口投与すると血中濃度が上昇するという知見<sup>9)</sup>があるので経口投与による治療を試みたのであるが、水に溶かした TU はマウスの味覚に合わぬためか経口投与をしても完全に飲み込まないものがあつた。剤形をかえ、飲みやすくすればさらに効果をあげることができるのではないかと思われた。この点、さらに検討してみる必要がある。

TU の腎障害、第八神経障害など慢性毒性については、現在、実験継続中であるが急性毒性については LD<sub>50</sub> が筋肉内注射で 1,600 mg/kg 以上、静脈内注射 200 mg/kg 以上で十分、臨床的に使用しうるものである。亜急性毒性についてはラットに 200 mg/kg 以下の量を 30 日筋肉内に連続注射した成績からは異常を認めなかつた<sup>9)</sup>。

VM に試験管内で耐性のあるところから、VM 耐性症

例にはおそらく無効であろうが本物質の生産性は良好であるので、経済的見地から VM に代わりうるものとして期待できよう。

試験管内で分離した KM 耐性菌には有効であるが、KM 耐性の野生株についても現在、検討中である。

## 6. む す び

*Streptomyces griseovorticillatus* var *tuberciticos* から分離精製した新抗生物質 Tuberactin の試験管内結核菌作用および実験結核症に対する効果について検討し次の結果を得た。

1) Kirchner 血清加液体培地における MIC は H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>RvSMR, H<sub>37</sub>RvKMR に対し 4 mcg/ml であつた。これに対し H<sub>37</sub>RvCPMR は 16 mcg/ml, H<sub>37</sub>RvVMR は 32 mcg/ml でも、その増殖が阻止されなかつた。なお各耐性菌は当該薬剤に対しいずれも 100 mcg/ml 以上耐性である。

2) モルモット実験結核症に対し TU は 1 日 40 mg 皮下注射 5 週治療で良好な効果を示し VM とほぼ同力価であつた。

3) マウスの結核菌感染に対しては 1 日 4 mg 皮下注射で良好な病巣形成および菌増殖阻止効果を認めた。

## 謝 辞

岩崎所長のご教示とご校閲を謝す。病理組織学的所見については工藤賢治博士のご援助を得た。記して謝意を表す。また本実験遂行にあたり多大の労をわずらわした高橋テル技師に深く感謝する。最後に Tuberactin を分離された東洋醸造研究陣に敬意を表するとともに Tuberactin を快く提供していただいたことに対しお礼申しあげる。

本論文の要旨は第 41 回日本細菌学会において報告した。

## 文 献

- 1) 早野和夫他 第 41 回日本細菌学会講演, 4, 昭 43.
- 2) 工藤賢治: 第 43 回日本結核病学会講演, 4, 昭 43.
- 3) 青木正和: 結核, 42: 302, 昭 42.
- 4) 工藤賢治: 結核, 43: 41, 昭 43.
- 5) 青木正和: 結核, 36: 355, 昭 36.
- 6) 永田明穂他: 日本抗生物質学術協議会第 160 回研究会講演, 3, 昭 43.
- 7) Rist, N. et al.: Ann. Inst. Pasteur, 98: 373, 1960.
- 8) 小関勇一他: 結核, 43: 55, 昭 43.