

Tuberactinomycin-N 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

受付 昭和 47 年 5 月 10 日

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE ANTITUBERCULOUS
ACTIVITY OF TUBERACTINOMYCIN-N*

Mareichi TOYOHARA

(Received for publication May 10, 1972)

Tuberactinomycin-N (TUM-N) was isolated and purified from *Streptomyces griseovorticillatus* var. *tuberacticus* N 6-130, one variant of streptomyces producing TUM, as a new antibiotic, and it is different from Tuberactinomycin (TUM) reported previously. As it was proved that the acute and chronic toxicity as well as the ototoxicity to the experimental animals of TUM-N was less than those of TUM, the antituberculous activity of TUM-N was studied experimentally.

TUM-N is the basic peptide, and the chemical formula is shown in Fig. 1. LD₅₀ of TUM-N to mice is 485 mg/kg intravenously, 2,000 mg/kg intramuscularly and more than 3,000 mg/kg subcutaneously.

1. Antituberculous activity in vitro of TUM-N.

H₃₇Rv, H₃₇Rv resistant to SM (H₃₇RvSMR), H₃₇RvKMR, H₃₇RvCPMR, H₃₇RvVMR and H₃₇RvTUMR were employed as the test strains.

Kirchner's liquid media with 10% horse serum, Dubos liquid media and Kirchner's semiliquid agar media with 10% horse serum were employed to determine the antituberculous activity of TUM-N *in vitro*. The inoculated size of bacilli was 0.01 mg to each media.

The result is shown in Table 1.

H₃₇RV, H₃₇RvSMR and H₃₇RvKMR were sensitive, but H₃₇RvCPMR was less sensitive and H₂₇RvKMR was highly resistant to TUM-N.

2. Effect for the experimental tuberculosis of mice.

Forty mice of CF #1 strain were divided into four groups. Each group consisted of ten mice. Each mouse was inoculated bacillary suspension of 0.8 mg prepared from Dubos culture of Kurono's strain into the tail vein.

Mice of three groups were treated by TUM-N, TUM or VM for three weeks starting one week after the challenge. Each drug was injected 4mg (160 mg/kg) daily subcutaneously. As shown in Fig. 2, TUM-N as well as TUM and VM prolonged significantly the survival days of challenged mice.

Effect of combined use of RFP either with TUM-N or VM was tested in experimental tuberculosis of mice.

Fifty mice were divided into the following five groups :

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

- Gr. 1. non-treated group
 - Gr. 2. TUM-N 2.5 mg d.+RFP 0.5mg 1 W 2×
 - Gr. 3. TUM-N 2.5 mg 1 W 2×+RFP 0.5 mg d.
 - Gr. 4. VM 2.5 mg d.+RFP 0.5 mg 1 W 2×
 - Gr. 5. VM 2.5 mg 1 W 2×+RFP 0.5 mg d.
- (d : daily, 1 W 2 × : twice a week)

RFP was given orally, and TUM-N and VM were injected subcutaneously.

Each mouse was challenged intravenously by 0.01mg of Kurono's strain. Treatment was begun one week after the challenge, and continued for four weeks. All mice were killed three days after finishing treatment.

As shown in Table 2, the combined treatment of TUM-N with RFP proved to be useful.

Effect of various antituberculous drugs for experimental tuberculosis caused by KM-resistant tubercle bacilli was examined.

Mice were divided into nine groups, ten mice in each group :

- Gr. 1. non-treated group
- Gr. 2. TUM-N 2.5 mg d.
- Gr. 3. TUM-N 1.25 mg d.
- Gr. 4. KM 2.5 mg d.
- Gr. 5. VM 2.5 mg d.
- Gr. 6. RFP 0.25 mg d.
- Gr. 7. RFP 0.25 mg+TUM-N 1.25 mg d.
- Gr. 8. RFP 0.25 mg 1 W 2×+TUM-N 1.25 mg d.
- Gr. 9. RFP 0.25 mg d.+TUM-N 1.25 mg 1 W 2×

Each mouse was challenged intravenously by 0.01 mg of Kurono's strain resistant to more than 100 mcg/ml KM. Treatment was begun one week after the challenge, and continued for three weeks.

The result is shown in Table 3.

The ranking of antituberculous effect was as follows :

Gr.7≥Gr.9>Gr.6>Gr.8>Gr.5≥Gr.2>Gr.3>Gr.4=Gr.1

3. Effect of TUM-N for the experimental tuberculosis of guinea pigs.

Antituberculous effect of TUM-N was compared with that of TUM and VM.

The following four groups were compared :

- Gr. 1. non-treated group
- Gr. 2. VM 50 mg daily subcutaneously
- Gr. 3. TUM 50 mg daily subcutaneously
- Gr. 4. TUM-N 50 mg daily subcutaneously

Each guinea pig was inoculated 0.005 mg of Kurono's strain subcutaneously. Treatment was begun three weeks after the challenge and continued for four weeks. All the guinea pigs were killed three days after finishing the treatment. The result is shown in Table 4.

The tuberculous lesions of the treated groups were improved remarkably, and no significant difference was found between groups. Two guinea pigs of the VM-treated group and one of the TUM-treated group died during the period of treatment, but no guinea pig of TUM-N treated group died during the experiment.

Effect of TUM-N with RFP was compared with that of VM with RFP.

Fifty guinea pigs were divided into the following five groups :

- Gr. 1. non-treated group

- Gr. 2. TUM-N 50 mg d.+RFP 10 mg 1 W 2×
 Gr. 3. TUM-N 50 mg 1 W 2×+RFP 10 mg d.
 Gr. 4. VM 50 mg d.+RFP 10 mg 1 W 2×
 Gr. 5. VM 50 mg 1 W 2×+RFP 10 mg d.

Each guinea pig was inoculated 0.01mg of Kurono's strain subcutaneously. Three weeks after the challenge, treatment was begun and continued for four weeks.

As seen in Table 5, TUM-N with RFP showed the remarkable effect to the experimental tuberculosis, but there was no significant difference between TUM-N with RFP and VM with RFP.

4. Conclusion

- 1) The antituberculous activity of TUM-N was proved, and the effect was similar to that of TUM previously reported.
- 2) The antituberculous activity of TUM-N was proved to be almost equal with that of VM. And TUM-N showed the remarkable effect for the experimental tuberculosis of mice challenged with KM-resistant tubercle bacilli.
- 3) TUM-N combined with RFP showed marked effect for the experimental tuberculosis of mice and guinea pigs.

Tuberactinomycin (TUM と略) の抗結核作用については基礎、臨床の両面から研究がすすめられすでに報告したり¹⁻³⁾。その後、TUM 産生菌の変異菌 *Streptomyces griseovercillatus* var. *tuberacticus* N 6-130 より得られた抗菌物質の化学分析をする一方、毒性、聴器傷害等の動物実験を行なつたところ化学構造では TUM とわずかに異なっており⁴⁾ 急性あるいは慢性毒性⁴⁾ 聴器傷害⁵⁾⁶⁾ は TUM よりさらに少ないことがわかつた。そこで、この新抗生物質を Tuberactinomycin-N (TUM-N と略) と名付け、あらためて抗結核作用を検討したので報告する。TUM-N は塩基性ペプチドで、その分子式は塩酸塩として $C_{25}H_{49}N_{19}O_{10} \cdot 3HCl$ であり TUM との相違は Guanidyl 基を有する構成アミノ酸が TUM では Tuberactidine, TUM-N では Capreomycidine という点である。TUM-N の化学構造式は図 1 のように決定している。

また TUM-N のマウスに対する急性毒性は静脈内 485mg/kg, 筋肉内 2,000mg/kg 以上、皮下 3,000mg/kg

kg 以上 (いずれも LD_{50}) である。

1. TUM-N の試験管内抗結核菌作用

使用菌株として $H_{37}Rv$, $H_{37}RvSMR$, $H_{37}RvKMR$, $H_{37}RvCPMR$, $H_{37}RvVMR$, $H_{37}RvTUMR$ (R: 耐性菌の略) を用いた。各耐性菌は各抗生物質に対し 100mcg/ml 以上の耐性を示した。

培地として 10% 馬血清加 Kirchner 液体培地, Dubos 液体培地, 10% 馬血清加 Kirchner 半流動寒天培地の 3 種類を用いた。各培地に Dubos 液体培地継代培養菌 0.01mg 相当量を接種し 3 週後に観察した。

結果を表 1 に示した。

$H_{37}Rv$, $H_{37}RvSMR$, $H_{37}RvKMR$ は Dubos 培地では 1.56mcg/ml, Kirchner 半流動寒天培地では 3.12mcg/ml, 血清加 Kirchner 液体培地では $H_{37}Rv$, $H_{37}RvSMR$ は 6.25mcg/ml, $H_{37}RvKMR$ は 12.5mcg/ml で発育を完全に阻止された。培地によつて多少発育阻止濃度は異なるが SMR, KMR は TUM-N に対し耐性はないと考

Fig. 1

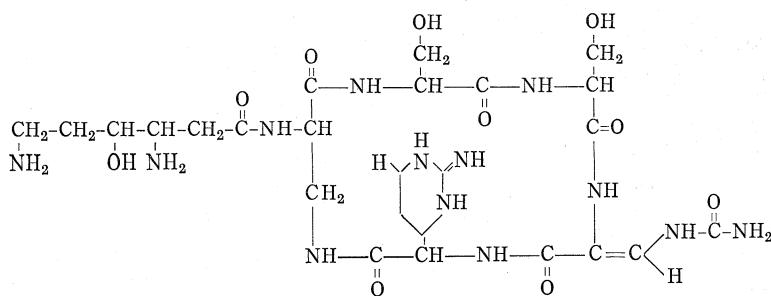


Fig. 2. Survival Rate of Tuberculous Mice Treated by TUM-N, TUM and VM

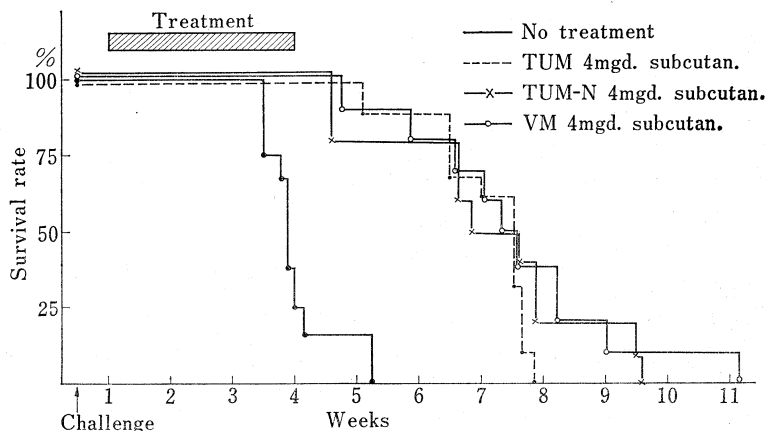


Table 2. Comparison of Effect between TUM-N and VM in the Combined Treatment with RFP for Experimental Tuberculosis of Mice

Groups	Non-treated	TUM-Nd. + RFP 1W2×	TUM-N 1W2× +RFPd.	VM d.+ RFP 1W2×	VM 1W2×+ RFP d.
Macro-lesions of lungs (Aoki's) ⁷⁾	3	0	0	0.3	0
Lung weight (mg)	301±55	248±57	278±47	251±43	229±41
Body weight (g)	31.0±2.4	30.3±2.3	30.9±3.1	30.6±2.0	29.8±2.6
√S.L.W.	9.85	8.99	9.48	9.03	8.72
Viable units in 1mg of lung	240	43	0	29	0

Number indicates mean of each group.

d.: daily 1W2×: twice a week.

$$\sqrt{\text{S.L.W.}} = \sqrt{\text{specific lung weight}} = \sqrt{\frac{\text{Lung weight (mg)}}{\text{Body weight (g)}} \times 10}$$

感染1週後より治療を始め4週間継続し治療終了3日後に殺し肺の肉眼所見⁷⁾, 肺重量, $\sqrt{\text{比肺重}}$, 肺内生菌数をみた。

成績を表2に示した。

治療群はいずれも対照群に比べ, すぐれた治療効果を示している。肺の肉眼病変は VM d+RFP 1W2× 群にわずかに認められたのみで他の治療群では結核結節を全く認めなかった。肺の生菌数からみると RFP d 群 (3 または 5 群) は RFP 1W2× 群 (2 または 4 群) に比べ明らかに効果的であった。

肺の生菌数からみると RFP d 群 (Gr.1 または 5) は RFP 1W2× 群 (2 または 4 群) に比べ明らかに効果的であった。RFP d 群は菌の増殖が全く認められなかった。

3) KM 耐性結核菌に対する効果

次の実験群に分けた。各群 dd 系♀マウス 10 匹ずつとした。

Gr.1. 無治療対照群

Gr.2. TUM-N 2.5mg d

Gr.3. TUM-N 1.25mg d

Table 3. Effect of TUM-N for Experimental Tuberculosis of Mice Challenged with KM Resistant Tubercle Bacilli

Groups	Non-treated	TUM-N 2.5mg d.	TUM-N 1.25mg d.	KM 2.5mg d.	VM 2.5mg d.	RFP 0.25mg d.	RFP 0.25mg d. +TUM-N 1.25mg d.	RFP 0.25mg d. 1W2×+ TUM-N 1.25mg d.	RFP 0.25mg d. +TUM-N 1.25mg 1W2×
Macro-lesions of lungs (Aoki's) ⁷⁾	2	1	1.2	1.9	0.85	0.35	0	0.5	0.1
Lung weight (mg)	224±33	193±27	211±53	215±31	209±24	176±20	194±28	225±58	195±71
Body weight (g)	25.4±1.7	25.8±2.2	24.3±2.8	24.5±1.8	25.0±1.4	23.6±1.6	24.3±1.6	24.5±1.5	23.8±3.1
√S.L.W.	9.3	8.6	9.3	9.4	9.1	8.6	8.9	9.4	9.0
Viable units in 100mg of lung (log)	4.964	4.884	4.668	5.080	4.545	3.430	2.322	3.578	2.418

- Gr. 4. KM 2.5mg d
 Gr. 5. VM 2.5mg d
 Gr. 6. RFP 0.25mg d
 Gr. 7. RFP 0.25mg d+TUM-N 1.25mg d
 Gr. 8. RFP 0.25mg 1W2×+TUM-N 1.25mg d
 Gr. 9. RFP 0.25mg d+TUM-N 1.25mg 1W2×

KM 100mcg/ml 以上耐性結核菌黒野株の Sauton 培地培養 12 日菌より 0.1mg/ml の菌液をつくりその 0.1 ml を尾静脈に接種した。接種菌の生菌数は 2×10^6 /mg。

感染 1 週後より治療を開始し 3 週間継続した。TUM-N は皮注, RFP は内服とした。

治療終了翌日に殺し肺の肉眼所見, 肺重量, $\sqrt{\text{比肺重}}$, 肺生菌数をみた。

結果を表 3 に示した。

表から治療効果は次の順序であつた。

RFP 0.25mg d+TUM-N 1.25mg d \geq RFP 0.25mg d+TUM-N 1.25mg 1W2× > RFP 0.25mg d > RFP 0.25mg 1W2×+TUM-N 1.25mg d > VM 2.5mg d \geq TUM-N 2.5mg > TUM-N 1.25mg d > KM 2.5mg d = 無治療対照群。

3. モルモット実験結核症に対する治療効果

モルモット実験結核症に対する TUM-N の効果を従来の TUM および VM と比較し, 次いで TUM-N と RFP の併用効果を VM と RFP の併用効果と比較した。

1) TUM-N の治療効果

体重 500g 前後の♀モルモット 40 匹を 1 群 10 匹ずつ次の 4 群に分けた。

- Gr. 1. 無治療対照群
 Gr. 2. VM 50mg 皮注群
 Gr. 3. TUM 50mg 皮注群
 Gr. 4. TUM-N 50mg 皮注群

モルモット 1 匹に対し結核菌黒野株の凍結乾燥菌 0.005 mg (生菌単位 3.7×10^5 /mg) を腹壁皮下に接種した。

治療は感染 3 週後より始め休日を除き 4 週間毎日続け終了 3 日後に殺し肉眼所見, 脾重, $\sqrt{\text{Spleen Index}}$ および脾の生菌数をみた。

結果を表 4 に示した。

各薬剤による治療群はいずれもすぐれた治療効果を示していた。

治療中 VM 群は 10 匹中 2 匹, TUM 群は 10 匹中 1 匹死亡したが TUM-N 群には死亡はなかつた。

2) TUM-N+RFP と VM+RFP との比較

体重 500g 前後の♂モルモットを各群 10 匹ずつ次の 5 群に分けた。

- Gr. 1. 無治療対照群
 Gr. 2. TUM-N d+RFP 1W2×
 Gr. 3. TUM-N 1W2×+RFP d
 Gr. 4. VM d+RFP 1W2×
 Gr. 5. VM 1W2×+RFP d

黒野株 0.01mg (0.02mg/ml の菌液 0.5ml) を腹壁皮下に接種した。

感染 3 週後より治療を始め 4 週継続し終了 3 日後に殺し内臓, リンパ節の肉眼所見, 脾重, 脾の生菌数をみた。

Table 4. Effect of TUM-N for Experimental Tuberculosis of Guinea Pigs

Groups		Non-treated	VM	TUM	TUM-N
Macro-lesions	Internal organs	3.5	0.3	0.3	0.6
	Lymphnodes	8.5	1.8	2.3	2.5
Spleen weight (g)		1.6±0.6	0.9±0.3	0.9±0.2	0.9±0.1
* $\sqrt{\text{Spleen Index}}$		0.51	0.39	0.40	0.39
Viable units in 10mg of spleen		1624	4.5	5.5	21.3

$$* \sqrt{\text{Spleen Index}} = \sqrt{\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100}$$

Number of macro-lesions is according to Aoki & Kudo's method.

Table 5. Comparison of Effect between TUM-N and VM in the combined Treatment with RFP for Experimental Tuberculosis of Guinea Pigs

Groups		Non-treated	TUM-N d.+ RFP 1W2×	TUM-N 1W2× +RFP d.	VM d.+ RFP 1W2×	VM 1W2×+ RFP d.
Macro-lesions	Internal organs	6.7	0.4	0.5	0.9	0.9
	Lymphnodes	11.1	4.9	3.5	3.1	3.4
Spleen weight (g)		3.8±2.3	0.7±0.2	0.6±0.2	0.8±0.2	0.7±0.2
$\sqrt{\text{Spleen Index}}$		0.75	0.38	0.34	0.38	0.35
Viable units in 10mg of spleen		440	1.3	0.3	1.3	1.5

薬剤の投与量は TUM-N および VM は 50mg (100 mg/kg) 皮注, RFP は 10mg (20 mg/kg) 経口投与とした。

結果を表5に示した。

治療群 (Gr. 2, 3, 4, 5) は対照群に比べすぐれた効果を示した。TUM-N または VM を毎日注射した Gr. 2, 4 より RFP を毎日投与した Gr. 1, 3 がより効果的であった。RFP+TUM-N と RFP+VM の間には差はない。

4. 考 察

*in vitro*の成績から $H_{37}Rv$ 原株 $H_{37}RvSMR$, $H_{37}RvKMR$ は TUM-N に対し感性であるが $H_{37}RvCPMR$ は上記3株に比べるとかなり感受性が低下しており $H_{37}RvVMR$ は TUM-N に対し耐性であることがわかった。この結果は TUM の各薬剤耐性菌に対する態度と同様¹⁾²⁾であった。注目すべきは KMR に対し TUM-N が有効なことであり臨床的に KM 耐性になった患者に TUM-N を使用しうすることは TUM-N の副作用が少ない点と合わせ結核治療に大きな福音というべきであろう。

また KM 耐性菌に TUM-N が有効であることを KM 耐性菌によるマウス実験結核症で確かめることができた。TUM-N は VM と同量の投与で同等の効果を示したが 1/10 量の RFP の内服に劣っていたことからみると強力な抗結核薬とはいえない。しかし RFP と併用すると明らかに併用効果を示した。このような成績から TUM-N は KM 耐性になった結核患者に RFP と併用して用いれば副作用もほとんどなく、すぐれた治療効果をあげることが期待できる。

マウス結核症における生残率, モルモット結核症の治療効果からみて TUM-N は VM とほぼ同じ抗結核作用があるとみてよからう。また RFP との併用効果も VM と TUM-N はほぼ等しい。しかし TUM-N は VM に

比べ聴力障害等が少ない点⁶⁾を考えれば治療薬としては VM よりすぐれているといつてよいと思う。

5. む す び

TUM-N の抗結核作用を試験管内, マウスおよびモルモット結核症に対する効果より考え次の結論を得た。

1) TUM-N は従来の TUM と同程度の抗結核作用を示した。

2) マウスおよびモルモット実験結核症に対し TUM-N は VM とほぼ等しい抗結核作用を示す。また KM 耐性菌感染マウス結核症にもすぐれた治療効果を示す。

3) マウスおよびモルモット結核症に対し TUM-N は RFP と併用すると、すぐれた併用効果を示す。

謝 辞

岩崎所長のご指導, ご鞭撻を感謝する。また実験遂行にあたり望月テル技師の労に負うところが多かった。記して謝意を表する。

なお本研究の要旨は昭和46年度(1971)日本化学療法学会(東京)において発表した。

文 献

- 1) 豊原希一: 結核, 43: 245, 昭 43.
- 2) Toyohara, M. et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100: 228, 1969.
- 3) 大里敏雄・豊原希一: 結核, 46: 59, 昭 46.
- 4) Ando, T., Matsumura, K., Izumi, R. et al.: J. Antibiotics, 24: 680, 1971.
- 5) 秋吉正豊・佐藤喜一・吉沢宗敏・早野和夫: Chemotherapy, 19: 299, 1971.
- 6) 秋吉正豊・佐藤喜一・吉沢宗敏・早野和夫: Audiology, 15, 69, 1972.
- 7) 青木正和・工藤賢治・続木正大: 結核, 36: 355, 昭 36.