

原 著

Enviomycin (Tuberactinomycin) の非定型抗酸菌に対する抗菌力

その 1 試験管内抗菌力

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所

受付 昭和 52 年 8 月 16 日

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENVIOMYCIN FOR
ATYPICAL MYCOBACTERIA1. Antibacterial Activity *in vitro*

Mareichi TOYOHARA*

(Received for publication August 16, 1977)

Enviomycin (EVM) was already established as the antituberculous drug, however, some important problems remain to be studied. One of them is antibacterial activity for atypical mycobacteria. We don't have any surely effective drug at present for atypical mycobacteria in spite of the increase in the number of atypical mycobacterial diseases. From this point of view the effect of EVM for atypical mycobacteria was studied. In this report antibacterial activity *in vitro* was reported.

1. Materials and method

Seven strains of *M. kansasii*, 6 strains of *M. scrofulaceum*, 16 strains of *M. intracellulare*, 1 strain of *M. fortuitum* and 1 strain of *M. chelonae* were employed as atypical mycobacteria.

0.01 mg equivalent dose of Dubos liquid culture of each strain was inoculated on each medium.

Sensitivity to EVM was examined at the concentration of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ for Dubos liquid media and Kirchner semiliquid agar media with 10% horse serum, and at 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ for 1% Ogawa's media.

In the second experiment sensitivity to EVM, SM and KM was examined at the same time by 1% Ogawa's media at the concentration of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. Results

Sensitivity to EVM of atypical mycobacteria in Dubos media is shown in Table 1, in Kirchner semiliquid agar media in Table 2, and in 1% Ogawa's egg media in Table 3. Results were observed at the third week. As shown in Table 1, in Dubos media all three strains of *M. kansasii* and 3 among 4 strains of *M. scrofulaceum* were sensitive to 5 $\mu\text{g/ml}$ of EVM, but only 2 among 11 strains of *M. intracellulare* were sensitive to 5 $\mu\text{g/ml}$.

As shown in Table 2, in Kirchner semiliquid agar media 2 among 3 strains of *M. kansasii*, 1 among 4 strains of *M. scrofulaceum* and only 1 among 11 strains of *M. intracellulare* were sensitive to 5 $\mu\text{g/ml}$. Nine strains of *M. intracellulare* and rapid growers (*M. fortuitum* and *M. chelonae*) were resistant to 20 $\mu\text{g/ml}$.

* From the Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1 Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

As shown in Table 3, in 1% Ogawa's media no strain of *M. kansasii* and only 1 strain of *M. scrofulaceum* were sensitive to 25 $\mu\text{g/ml}$. Growth of all strains of *M. intracellulare* was not inhibited at all at 25 $\mu\text{g/ml}$, but 3 among 11 strains were sensitive to 100 $\mu\text{g/ml}$.

M. fortuitum and *M. chelonoi* were resistant to 100 $\mu\text{g/ml}$.

In the second experiment sensitivity to EVM, SM and KM of each 5 strains of *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* and *M. intracellulare* were examined by 1% Ogawa's media at the concentration of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of each drug.

Each strain was the isolated one from the patient who was never given each drug.

As shown in Table 4, EVM was more effective generally than SM and KM for the strains of *M. kansasii* and *M. scrofulaceum*, however, all strains of *M. intracellulare* were resistant to 100 $\mu\text{g/ml}$ of each drug.

3. Conclusion

Antibacterial activity of EVM to atypical mycobacteria was studied *in vitro*.

1) Antibacterial activity of EVM depended on media. The highest activity was shown in Dubos media, next Kirchner semiliquid agar media with 10% horse serum, and activity was remarkably decreased in 1% Ogawa's media.

2) A small number of strains of *M. intracellulare* was sensitive to EVM.

3) EVM was proved to be effective for strains of *M. kansasii* which were isolated from patients who have never been treated with EVM, SM and KM.

1. 緒 言

Enviomycin(EVM)の抗結核薬としての地歩は確立されたが、なお検討されねばならない重要な問題がいくつか残っている。その中の1つに非定型抗酸菌(A.M. と略)に対するEVMの抗菌力の問題がある。わが国におけるA.M.症から分離されるA.M.の菌種はA.M.症が問題になりだした当時に比べ最近はかなり様相が変わってきているようである^{1)~4)}。しかしいずれにせよA.M.のなかでも殊に起炎菌として最も多くを占める*M. intracellulare*に対する適切有効な抗菌剤がない^{5)~8)}ということは臨床家にとって治療上の難問となつていく。

既知抗結核薬^{9)10)~11)}あるいはサルファ剤¹²⁾のA.M.に対する試験管内抗菌力についてはすでに報告があるが、新たに抗結核薬として認められたEVMのA.M.に対する抗菌力については学会等で断片的な報告があるのみで、その詳細についての論文はまだみない。そこで今回はEVMの*in vitro*におけるA.M.に対する抗菌力について知見を得たので報告する。

2. 材料ならびに方法

2-1. 使用菌株と接種菌量

M. kansasii 7株, *M. scrofulaceum* 6株, *M. intracellulare* 16株, *M. fortuitum* 1株, *M. chelonoi* 1株。各菌株とも Dubos 液体培地培養菌で 1/100mg 相当

量を各培地に接種した。

2-2. 培地および濃度

Dubos 液体培地, 10% 馬血清加 Kirchner 半流動寒天培地では 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$, 1% 小川培地では 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。

第2実験では EVM, SM, KM に対する感受性を 1% 小川培地を用い同時にしらべた。EVM, SM, KM の濃度は 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。培養成績の記録は衛生検査指針¹³⁾によつた。

3. 成 績

[第1実験]

各菌株の EVM に対する感受性を Dubos 液体培地, Kirchner 半流動寒天培地, 1% 小川培地で観察した。表1に Dubos 液体培地, 表2に Kirchner 半流動寒天培地, 表3に 1% 小川培地での感受性を示す。いずれも3週観察の結果である。表1にみるように Dubos 培地では *M. kansasii* (Runyon 分類第1群) は3株とも EVM 5 $\mu\text{g/ml}$ に感性であつた。また *M. scrofulaceum* (Runyon 分類第2群) 4株も EVM 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で有芽株の1本に疑発育(±)を認めたのみであつた。これに対し *M. intracellulare* (Runyon 分類第3群) 11株のうち若松, No. 100616 株の2株 (18.2%) が 5 $\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止されるにとどまつた。また上田株は 10 $\mu\text{g/ml}$, No. 2788, No. 3058 株は 20 $\mu\text{g/ml}$ で発育が阻止された。しかし他の6株 (54.5%) は 20 $\mu\text{g/ml}$ でも発育が阻止

Table 1. Sensitivity of Atypical Mycobacteria for EVM in Dubos Liquid Media

Gr.	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	0	5	10	20	
1	Brownell	###	###	- -	- -	- -
	Coffey	###	###	- -	- -	- -
	Miura	++	++	- -	- -	- -
2	Cole	###	###	- -	- -	- -
	Miike	++	++	- -	- -	- -
	Ariga	##	##	± -	- -	- -
	Nagashima	###	###	- -	- -	- -
3	Wakamatsu	++	++	- -	- -	- -
	Yamawaki	###	###	##	##	+ +
	Ueda	###	###	+ +	- -	- -
	Abe	##	##	##	##	+ +
	1928	###	###	###	###	++
	2675	###	###	###	###	+ +
	2788	###	###	###	##	+ -
	2993	###	###	###	###	##
	3085	###	###	++	##	+ -
	100616	###	###	- -	- -	- -
121326	##	##	+ +	+ +	+ +	
4	605	###	###	###	###	###
	19001	##	##	- ±	- -	- -

Conc.: Concentration of drug in media

Gr.1: *M.kansasii*Gr.2: *M.scrofulaceum*Gr.3: *M.intracellulare*

Gr.4: Rapid grower

605: *M.fortuitum*19001: *M.chelonei*

されなかつた。*M.fortuitum*(Runyon分類第4群) No. 605株は20 $\mu\text{g/ml}$ でも全く発育抑制がみられなかつた。これに対し*M.chelonei*(Runyon分類第4群) No.19001は5 $\mu\text{g/ml}$ でほとんど発育が阻止された。

Kirchner 半流動寒天培地では表2にみるように1群菌 *M.kansasii* では3株中2株が5 $\mu\text{g/ml}$, 1株は20 $\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止された。2群菌 *M.scrofulaceum* では4株中1株が5 $\mu\text{g/ml}$, 2株が20 $\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止された。3群菌 *M.intracellulare* では11株中1株が5 $\mu\text{g/ml}$, 1株が10 $\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止されたのみで, 残りの9株は20 $\mu\text{g/ml}$ でも増殖が阻止されなかつた。4群菌 *M.fortuitum* No.605株も20 $\mu\text{g/ml}$ で対照と同程度の発育をみた。*M.chelonei* No.19001株も20 $\mu\text{g/ml}$ で発育が阻止されなかつた。

小川培地では表3にみるように1群菌 *M.kansasii* 3株中1株は50 $\mu\text{g/ml}$, 1株は100 $\mu\text{g/ml}$ で発育が阻止された。残りの1株(Brownell株)は100 $\mu\text{g/ml}$ でも菌の発育を完全には阻止しえなかつたが対照に比べると, かなりの程度に増殖が抑制された。2群菌 *M.scrofulaceum*

4株中1株は25 $\mu\text{g/ml}$, 2株は100 $\mu\text{g/ml}$ で発育が阻止された。他の1株は100 $\mu\text{g/ml}$ でも発育が阻止されなかつた。3群菌 *M.intracellulare* 11株中3株(27.3%)は100 $\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止されたが他は阻止されなかつた。4群菌 *M.fortuitum* は100 $\mu\text{g/ml}$ で対照と同程度の発育をみた。*M.chelonei*も100 $\mu\text{g/ml}$ でわずかながら菌の発育をみた。

〔第2実験〕

1群菌 *M.kansasii*, 2群菌 *M.scrofulaceum*, 3群菌 *M.intracellulare* それぞれ5株を選び EVM, SM, KM に対する各菌株の感受性を1%小川培地を用いてしらべた。各薬剤の濃度は培地1ml当り25, 50, 100 μg とした。なお各菌株とも各薬剤未使用 A.M. 症患者からの分離株である。

表4にみるごとく1群菌 *M.kansasii* 5株中 EVM には1株が25 $\mu\text{g/ml}$ に感性で, 残り4株は50 $\mu\text{g/ml}$ に感性であつた。SM には1株が25 $\mu\text{g/ml}$, 3株が50 $\mu\text{g/ml}$ に感性で残り1株(山本株)は100 $\mu\text{g/ml}$ にも耐性であつた。KM には4株が100 $\mu\text{g/ml}$ に耐性で1株のみ

Table 2. Sensitivity of Atypical Mycobacteria for EVM in Kirchner's Semiliquid Agar Media

Gr.	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	0		5		10		20	
1	Brownell	###	###	++	++	*+ ₁₀	+ ₁₀	-	-
	Coffey	###	###	-	-	-	-	-	-
	Miura	++	++	-	-	-	-	-	-
2	Cole	++	++	++	++	+	+	-	-
	Miike	+	+	-	-	-	-	-	-
	Ariga	###	###	###	###	++	++	+	+
	Nagashima	###	###	++	++	++	++	-	-
3	Wakamatsu	###	###	###	###	-	-	-	-
	Yamawaki	###	###	###	###	###	###	++	++
	Ueda	###	###	++	++	+	+	-	-
	Abe	###	###	###	###	###	###	++	++
	1928	###	###	###	###	###	###	++	++
	2675	###	###	###	###	###	###	++	++
	2788	###	###	###	###	++	++	+	+
	2993	###	###	###	###	###	###	###	###
	3058	###	###	###	###	###	###	+	+
	100616	###	###	-	-	-	-	-	-
121326	###	###	###	###	+	+	+	+	
4	605	###	###	###	###	###	###	###	###
	19001	###	###	###	###	###	###	+	+

* +₁₀ indicates growth of 10 colonies.

Table 3 is written as same.

50 $\mu\text{g/ml}$ に感性であつた。

2群菌 *M. scrofulaceum* では EVM には2株が25 $\mu\text{g/ml}$, 1株が50 $\mu\text{g/ml}$ に感性で残り2株は100 $\mu\text{g/ml}$ に耐性であつた。SM には2株が25 $\mu\text{g/ml}$, 1株が100 $\mu\text{g/ml}$ に感性で残り2株は100 $\mu\text{g/ml}$ にも発育した。KM には5株とも25 $\mu\text{g/ml}$ に耐性, 2株が50 $\mu\text{g/ml}$ に感性であつたが, 残り3株は100 $\mu\text{g/ml}$ にも耐性であつた。

これに対し3群菌 *M. intracellulare* は全株 EVM, SM, KM の100 $\mu\text{g/ml}$ に耐性であつた。

4. 考 察

ここ10年来抗酸菌の再分類の作業がすすみ分類しえなかつた非定型抗酸菌もそのほとんどが菌種として分類しうるようになった¹⁴⁾¹⁵⁾。したがつて A. M. 症という疾患名も本来なら結核菌によつて発症する結核症と同様, 起炎菌例えば *M. kansasii* によつて発症したものならカンサス菌症と呼ぶべきであろうが, 菌種が多いことや同定が容易でないことなどから今後当分は臨床的には A. M. 症という通称で呼ばれることであろう。A. M. 症の起炎菌として重要な菌種は Runyon 分類1群菌では *M. kansasii*, 2群菌では *M. scrofulaceum*, 3群菌では

M. intracellulare であり更に4群菌では *M. fortuitum*, *M. chelonae* などであろう。これら各菌種の薬剤感受性についてはすでに多くの報告があるが一般的には抗結核薬に対する *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* および迅速発育株の感受性は極めて低く *M. kansasii* の中には比較的感受性の高い株もあるということであろう⁵⁾。

EVM 感受性についても, これら主要菌種について3種類の培地を用いて検討した。結核菌に対する EVM の M. I. C. は培地によつて異なり^{16)~18)}, 小川培地ではその力価がかなり低下することはすでによく知られている¹⁹⁾。また成分に血清や寒天を含む Kirchner 血清加半流動培地はアルブミンを蛋白成分として加えた Dubos 液体培地よりやや M. I. C. が高い²⁰⁾。どの培地がもつとも正しい抗菌力を示しているかとなると薬剤非含有の対照培地に十分な菌が発育していれば成分として薬剤に影響を与える物質の含有が少なく, より強い抗菌力が示される培地と考えてよいであろう。この観点からすれば EVM の A. M. に対する抗菌力は Dubos 培地で判断してよいと思われ *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* に対しては5 $\mu\text{g/ml}$ で発育が阻止され結核菌に対すると同等の抗菌力を示すと考えてよからう。*M. intracellulare* に対し

Table 3. Sensitivity of Atypical Mycobacteria for EVM in 1% Ogawa's Media

Gr.	Conc. (µg/ml)	0		25		50		100	
1	Brownell	###	###	##	##	+2	+2	+1	+1
	Coffey	###	###	##	##	+5	+10	-	-
	Miura	##	##	+ ⁶⁹	+ ¹⁰	-	-	-	-
2	Cole	###	###	##	##	+ ⁵⁷	+ ⁵⁶	-	-
	Miike	##	##	-	-	-	-	-	-
	Ariga	###	###	###	###	###	###	++	++
	Nagashima	###	###	##	##	+ ¹¹	+ ¹⁰	-	-
3	Wakamatsu	###	###	###	###	+6	+3	-	-
	Yamawaki	###	###	###	###	###	###	###	###
	Ueda	###	###	##	##	+6	+8	-	-
	Abe	###	###	###	###	###	###	##	##
	1928	###	###	###	###	##	##	+ ²⁰	+ ¹⁵
	2675	##	##	##	##	##	##	++	++
	2788	###	###	###	###	##	##	##	##
	2993	##	##	##	##	##	##	+5	+ ¹²
	3058	###	###	###	###	##	##	++	++
100616	###	###	+ ⁴⁸	+ ⁴³	+1	+3	-	-	
121326	###	###	###	###	###	###	++	++	
4	605	###	###	###	###	###	###	###	###
	19001	###	###	##	##	+ ²²⁵	+ ²⁰⁴	+5	+2

Table 4. Sensitivity of Atypical Mycobacteria for EVM, SM and KM in 1% Ogawa's Media

Gr.	Conc. (µg/ml)	0		EVM			SM			KM							
				25	50	100	25	50	100	25	50	100					
1	Miura	###	###	++	++	-	-	-	-	-	-	###	###	##	##	++	++
	Fujikawa	###	###	++	++	-	-	-	-	-	-	###	###	##	##	++	++
	Yamamoto	###	###	++	++	-	-	-	-	###	###	###	###	##	##	++	++
	Chinen	###	###	++	++	-	-	-	-	++	++	##	##	##	##	++	++
	Kiyohara	##	##	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
2	Sugano	###	###	++	++	++	++	++	++	++	++	##	##	++	++	++	++
	Saito	##	##	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
	Miike	###	###	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Ariga	###	###	++	++	++	++	++	++	++	++	##	##	++	++	++	++
	Nagashima	##	##	++	++	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
3	Tomioka	###	###	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
	Chikira	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	##	##
	Isozaki	###	###	###	###	##	##	###	###	##	##	###	###	###	###	##	##
	Gamo	###	###	###	###	++	++	++	++	++	++	##	##	++	++	++	++
	Kimura	##	##	##	##	++	++	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##

でも 11 株中 3 株および *M. chelonae* 19001 株に対して 10µg/ml で発育が阻止された点は注目してよいであろう。

一方、血清加 Kirchner 半流動寒天培地では Dubos 培地に比し抗菌力は低下しているが、注目すべき点は Dubos 培地 5µg/ml で発育が阻止された *M. intracellulare*

のうち若松株, 100616株は Kirchner 培地でも $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で発育が阻止された。小川培地では大幅に抗菌力は低下するが, この点は結核菌でも同様であり *M. intracellulare* 11株中3株は小川培地 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ で発育が阻止され, しかもこの3株は Dubos および Kirchner 培地でも $5\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ で発育しない点は興味深い。ただし第2実験の *M. intracellulare* の5株はすべて小川培地で $100\mu\text{g}/\text{ml}$ に増殖しているの、株数を更に多くすると相対的に *M. intracellulare* に対し臨床的に効果を期待しうる菌株は少なくなる可能性は大きい。また *in vitro* で有効であつても *in vivo* では無効の物質は極めて多いので, 今後 A.M. に感受性のある動物を用い *in vitro* と *in vivo* の成績が一致するか否か検討する必要があるらう。

5. 結 語

A.M. に対する EVM の抗菌力を試験管内で検討し次の結果を得た。

(1) 抗菌力は培地によつて異なり Dubos 培地で最も抗菌力が高く血清加 Kirchner 半流動寒天培地がこれに次ぎ小川培地では抗菌力の低下が著しい。

(2) *M. intracellulare* の中にも少数ながら EVM に感受性を示す菌株があつた。

(3) EVM, SM, KM 未使用患者から分離した *M. kansasii* に対し小川培地で EVM はみとむべき試験管内抗菌力を示した。

本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つた。記して謝意を表す。

本論文の一部は第51回結核病学会総会, 第10回東部地

区国際結核会議 (ソウル) で発表した。

文 献

- 1) 国療非定型抗酸菌症共同研究班: 結核, 48: 203, 1973.
- 2) Co-operative study group of the Japanese National Sanatoria on Atypical Mycobacteria: Tubercle, 51: 270, 1970.
- 3) 国療非定型抗酸菌症共同研究班: 結核, 51: 99, 1976.
- 4) 国療非定型抗酸菌症共同研究班: 結核, 51: 447, 1976.
- 5) 山本正彦: 非定型抗酸菌症, 金原出版, 東京, 1970.
- 6) 久世文幸・武田貞夫・前川暢夫: 結核, 49: 151, 1974.
- 7) 久世文幸・武田貞夫・前川暢夫: 結核, 49: 189, 1974.
- 8) 久世文幸・武田貞夫・前川暢夫: 結核, 52: 331, 1977.
- 9) Rynearson, T. K., Shronts, J. S. and Wolinsky, E.: Amer. Rev. Resp. Dis., 104: 272, 1971.
- 10) Shronts, J. S., Rynearson, T. K. and Wolinsky, E.: Amer. Rev. Resp. Dis., 104: 728, 1971.
- 11) 非定型抗酸菌症研究協議会: 結核, 47: 399, 1972.
- 12) 外間政哲: 結核, 51: 287, 1976.
- 13) 衛生検査指針: 結核菌検査指針, 日本公衆衛生協会, 1972.
- 14) 齋藤肇: 結核, 51: 233, 1976.
- 15) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第8版, The Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.
- 16) 豊原希一: 結核, 47: 181, 1972.
- 17) 小関勇一: 結核, 48: 189, 1973.
- 18) Saito, T.: Jap. J. Tbc. & Chest Dis., 18: 7, 1972.
- 19) 豊原希一: 結核, 48: 405, 1973.
- 20) 豊原希一: 結核, 47: 181, 1972.