Kekkaku Vol. 54, No. 9

原　著

Enviomycin (Tuberactinomycin) の非定型抗酸菌に対する抗菌力
その 2. 動物実験

豊　原　希　一

結核予防会結核研究所

受付　昭和 54 年 6 月 16 日

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENVIOMYCIN FOR ATYPICAL MYCOBACTERIA
2. Animal Experiments

Mareichi TOYOHARA*

(Received for publication June 16, 1979)

Antibacterial activity *in vitro* of EVM for atypical mycobacteria was already reported[1]. In this report antibacterial activity *in vivo* was studied using mice.

Two strains of Miura and Brownell were chosen from *M. kansasii* and two strains of Yamawaki and Battey 100616 from *M. intracellulare*.

Two strains of *M. kansasii* were sensitive to 5 μg/m*l* of EVM in Dubos liquid media. Strain Yamawaki of *M. intracellulare* was resistant incompletely to 20 μg/m*l*, and Strain Battey 100616 was sensitive to 5 μg/m*l*.

CF_1 mice were employed for *M. kansasii*, Balb/c and nu/nu mice were used for *M. intracellulare*.

Each mouse was injected 4 mg or 8 mg of EVM subcutaneously for four weeks from one week after the intravenous challenge by atypical mycobacteria.

All mice were killed one week after stopping treatment by EVM, and macroscopic changes and viable units in lungs and spleens were examined.

Results are shown in Tables 1, 2, 3, 4 and 5. Virulence of Strain Miura was rather strong to mice. Bacilli in lungs and spleens multiplied in untreated mice, but decreased remarkably by the daily subcutaneous injection of 4 mg of EVM.

Virulence of Strain Brownell was not so strong. EVM was effective also for the infection of Strain Brownell.

Virulence of both strains of *M. intracellulare* was generally weak for Balb/c mice, but Strain Yamawaki multiplied in nu/nu mice.

Bacilli in organs of the infected nude mice with Strain Yamawaki decreased remarkably especially in lung and also swelling of spleens was improved by treatment of 8 mg EVM for four weeks. It was thought from this result that the effect of EVM to Strain Yamawaki was not always parallel between *in vitro* and *in vivo*.

Battey strain of *M. intracellulare* did not multiply even in nude mice, but the decrease of bacilli was faster by EVM treatment than without treatment.

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

1. 緒　　言

非定型抗酸菌 (A.M.) に対する Enviomycin (EVM) の *in vitro* 抗菌力についてはすでに発表した[1]。すなわち *M. kansasii* は比較的感受性があり Dubos 液体培地で 5 μg/mlの濃度で菌増殖は阻止されたが, *M. intracellulare* には比較的感受性の高い株と感受性を示さない株があつた。

in vivo でも EVM が非定型抗酸菌症 (AM症) に対し有効であるか否か, また *in vitro* と *in vivo* の成績が一致するか否か重要な問題であるので *M. kansasii* と *M. intracellulare* につきマウスを用いて実験を行なつた。特に *M. intracellulare* は一般に弱毒と考えられるので宿主抵抗性が弱い nu/nu マウスとその原株である Balb/c マウスを使用した。

2. 材料ならびに方法

2-1. 使用菌株

M. kansasii として米国で分離された Brownell 株と日本で分離された三浦株を使用した。いずれも Dubos 液体培地で EVM 5μg/*ml* の濃度に感性株である[1]。

M. intracellulare として結研附属病院で分離された山脇株と米国で分離された Battey 100616 株を用いた。山脇株は Dubos 液体培地で EVM 20μg/*ml* の濃度に不完全耐性, Battey 100616 株は 5μg/*ml* に感性である[1]。

なお結核菌は EVM 5μg/*ml* に感性である[2]。

2-2. 使用マウス

M. kansasii に対しては CF_1 マウス, *M. intracellulare* に対しては Balb/c と nu/nu マウスを使用した。

2-3. 実験方法

各菌株感染1週後より EVM を毎日皮下に4週注射し治療終了後1週放置し全マウスを殺し肉眼所見をみるとともに肺, 脾を培養した。

感染菌は1％小川培地発育菌より調製した。感染菌量は *M. kansasii* 0.1 mg (生菌単位 Brownell 株 10^5, 三浦株 4.2×10^4), *M. intracellulare* は Balb/c に対しては0.1 mg (生菌単位, 山脇株 3×10^6, Battey 100616 株 7×10^5) nu/nu マウスに対しては 0.01 mg (生菌単位, 山脇株 1.9×10^5, Battey 100616株 1.9×10^4) とした。いずれも尾静脈より接種した。

EVM 使用量は *M. kansasii* 感染では4 mg 毎日, *M. intracellulare* 感染では Balb/c マウス使用の場合は 4 mg 毎日, 8 mg 毎日の2群, nu/nu マウス使用の場合は 8 mg 毎日とした。

3. 成　　績

3-1. *M. kansasii* 感染症に対する EVM の効果

表1に結果を示す。

三浦株はマウスに対しかなり強い毒力を示し無処置対照群は肺の肉眼所見の平均が 2.6 であつた。肺, 脾も腫大し $\sqrt{\text{比肺重}}$ も大きかつた。また肺, 脾の生菌数も多

Table 1. Effect of EVM for Infection of CF_1 Mice by *M. kansasii*

Groups	Brownell untreated	Brownell EVM 4 mg	Miura untreated	Miura EVM 4 mg
V.U./10 mg of lung	8.8×10^2	0.3	1.4×10^5	69
V.U./10 mg of spleen	4.2×10^2	45	1.9×10^3	99
Lung wight(mg)	228.8±41.9	238.8±19.6	392.0±69.1	276.7±67.1
$\sqrt{\text{S.L.W}}$*[3]	8.98±0.69	9.14±0.52	12.67±2.33	9.22±0.79
Spleen weight(mg)	202.5±46.2	177.5±44.3	428.0±216.5	216.7±64.1
Lung lesion[4]	0.5	0	2.6	0.2

* S.L.W.: Specific lung weight
The results of the sixth week after infection are shown.
Same legends applied to others tables.

Table 2. Effect of EVM for Infection of Balb/c mice by Strain Yamawaki (*M. intracellulare*)

Groups	Untreated	EVM 4 mg	EVM 8 mg	1 day after infection
V.U./10 mg of lung	7.3×10^3	126	99	8.9×10^3
V.U./10mg of spleen	8×10^3	8×10^2	6.5×10^2	1.5×10^3
Lung weight(mg)	183±1.35	187.5±10.6	192±84.2	
$\sqrt{\text{S.L.W.}}$	8.37±1.35	8.51±0.24	8.36±1.58	
Spleen weight(mg)	158±13.2	121±16.1	192±84.2	
Lung lesion	0	0	0	

Table 3. Effect of EVM for Infection of Balb/c Mice by Strain Battey 100616 (*M. intracellulare*)

Groups	Untreated	EVM 4 mg	EVM 8 mg	1 day after infection
V.U./10 mg of lung	120	8	2	1.2×10^3
V.U./10 mg of spleen	278	6	4	6×10^3
Lung weight(mg)	166±21.9	186.7±8.8	175.8±24.6	
$\sqrt{S.L.W.}$	8.15±0.47	8.53±0.24	8.16±0.53	
Spleen weight(mg)	150±18.7	139.2±13.6	150.8±9.2	
Lung lesion	0	0	0	

Table 4. Effect of EVM for Infection of nu/nu Mice by Strain Yamawaki (*M. intracellulare*)

Groups	Untreated	EVM 8 mg	1 day after infection
V.U./10 mg of lung	1.6×10^3	31.3	190
V.U./10 mg of spleen	2.2×10^5	7.2×10^3	750
Lung weight(mg)	215±12.9	224±36.5	
$\sqrt{S.L.W.}$	9.45±0.21	8.96±0.60	
Spleen weight(mg)	327.5±113.3	209±92.0	
Lung lesion	0	0	

Table 5. Effect of EVM for Infection of nu/nu Mice by Strain Battey 100616 (*M. intracellulare*)

Groups	Untreated	EVM 8 mg	1 day after infection
V.U./10 mg of lung	78.5	6.8	120
V.U./10 mg of spleen	10	0	30
Lung weight(mg)	233.8±23.6	220±14.1	
$\sqrt{S.L.W.}$	9.18±0.41	9.04±0.55	
Spleen weight(mg)	355±244.6	196.3±39.9	
Lung lesion	0	0	

く，明らかに感染菌の増殖をみた。EVM 4 mg 毎日4週治療により肺病変は減少し肺，脾の腫大も軽減し生菌数ことに肺の生菌数は著明に減少した。

Brownell 株は三浦株ほどの毒力ではなかつたが肺，脾の生菌数は EVM 4 mg 使用により減少した。

3-2. *M. intracellulare* 感染症に対する EVM の効果

Balb/c マウスに対し山脇株および Battey 株を感染したときの EVM による治療効果を表2，3に示す。なお感染1日後の生菌数は山脇株感染では肺 8.9×10^3，脾 1.5×10^3，Battey 株感染では肺 1.2×10^3，脾 6×10^3(いずれも臓器 10 mg 中）であつた。

山脇株は感染1日後と6週後の無処置対照群の生菌数に大差ないところから体内増殖は明らかでないが無処置群では6週後にもなおかなりの生菌が認められた。しかし EVM 治療により肺，脾ことに肺内菌数は激減した。EVM 8 m と 4 mg では差は明らかでなかつた。

Battey 100616 株感染群では無処置でも体内菌数は自然に減少していくが EVM は減少傾向を促進するようであつた。

次に nu/nu マウスを用いたときの結果を表4，5に示す。表4は山脇株感染群，表5は Battey 100616 株感染群に対する EVM の効果をみた成績である。

表4にみるように山脇株感染 nu/nu マウスの脾ことに無処置対照群の脾の腫大が著明であつた。感染1日後の肺，脾の菌数は臓器 10 mg に対し前者190，後者750であつたが感染6週後の無処置群は著しい菌増殖を示した。EVM 8 mg 毎日皮下注により特に肺内菌数の著減をみた。

Battey 株感染群では Balb/c マウスの場合と同じように無処置群の肺，脾内生菌数は感染6週後にはすでに少数になつているが EVM 8 mg 治療群では無処置群より更に減少していた。

4. 考　　察

AM症ことに *M. intracellulare* 感染によるAM症は適確な感性剤が少ないということもあり治療は容易でない。また実験的にマウスにAM症をつくることが困難なため *in vitro* で有力な抗菌物質がみつかつても *in vivo* における効果をみることが容易でなかつた[5]。AM症は opportunistic infection といわれるように宿主側の条件が発症に大きな影響をもつことが予想される。宿主の抵抗性が減弱している場合とか感染免疫の成立しない場合などは発症する可能性が大きいと考えられる。毒力に差があるとはいえ一般に弱毒性である *M. intracellulare* が生体内で増殖しえないのは生体のもつ自然抵抗性と弱いながらも形成される獲得抵抗性すなわち感染免疫によると思われる。*M. intracellulare* 感染症に対する有効な抗菌剤を発明し立証するには原則として動物，例えばマウスを使つて実験的AM症をつくりこれに対する効果をみるべきであろう。AMの感染動物実験は多いが[6][7]，上記のような観点からの実験は少ない。そこで本実験では一般的とはいえないが自然抵抗性が弱く感染免疫も成立しにくいnu/nuマウスを用い *M. intracellulare* の感染を行ない，これに対するEVMの効果をみたわけである。菌株としては *in vitro* で感受性の比較的高かつたBattey 100616株と感受性の低下している山脇株を用いた[1]。

山脇株は結核研究所附属病院通院中のAM症の患者から分離したものでその患者は毎月の検痰で大量のAMを排菌し空洞を含む病巣は漸次進展している。臨床所見からみると病原性の比較的強い *M. intracellulare* と推測された。nu/nuマウスに感染したところ明らかに増殖を示し，これに対しEVMは認むべき効果を示した。

nu/nuマウスの親株であるBalb/cマウスを用いたときの感染6週後の無処置群の生体内菌数は感染群に比し大差なかつた。1時点しかみていないので，この期間に菌が増減したか否かは不明であるが，いずれにせよEVMは菌を減少させた。nu/nuマウス，Balb/cマウスいずれでもEVM治療により脾より肺の菌数が著しく減少していたのは興味深い。

ともかくnu/nuマウスで肉眼所見は認めなかつたが菌が増殖し脾が腫大するなどの所見を得たことは山脇株により実験的AM症が成立したことを意味し，またEVM使用により菌の減少を認めたことはEVMが山脇株による実験AM症に有効であつたと考えてよかろう。しかし山脇株は *in vitro* では20 μg/ml でなお完全に阻止しえず結核菌の感受性のクライテリアから考えれば耐性であり *in vivo* でも本来有効でないはずであるが人のAM症についても *in vitro* と *in vivo* の成績が一致しないことはしばしば経験し *in vitro* で耐性であつても *in vivo* で有効であることがある。血中濃度のピークは20 μg/ml 以上になつており短時間でもM.I.C.以上の濃度に接すれば結核菌に比べ弱毒なるがために菌の減少をみたのかもしれない。

次にBattey 100616株感染についてみるとnu/nuマウスを用いても明らかな増殖とみられる所見は得られなかつた。ただ無処置群の脾の腫大が著明であつたが，EVM使用により脾の重量は減少した。Balb/cマウスを用いた場合は肺，脾の菌は感染時に比し明らかに減少し脾の腫大も認められなかつた。したがつてBattey株は山脇株に比し毒力は弱いと考えられるがEVMはnu/nuマウス，Balb/cマウス両感染群に対し，生体内菌の減少を促進させる作用を示すようであつた。これはもともと弱毒であるうえにこの菌株は *in vitro* でもEVMに対し感性であるためであろう。

M. kansasii のBrownell株，三浦株いずれもDubos培地でEVM 5μg/ml の濃度で増殖が阻止され感性であつたが，CF_1 マウスを用いた *M. kansasii* 感染症に対してもEVMは有効であり *in vitro* と *in vivo* の成績が一致した。

5. 結　　論

非定型抗酸菌のマウス体内における動態を観察しEVMの *in vivo* における非定型抗酸菌に対する効果を検討した。

(1) *M. kansasii* 感染によりマウス実験非定型抗酸菌症が成立した。三浦株，Brownell株の使用2菌株とも *in vitro* でEVM感性であつたがEVMは *in vivo* でも有効であつた。

(2) *M. intracellulare* は菌株による体内菌消長に大きな差があり使用2菌株のうち山脇株はnu/nuマウスでは増殖した。Balb/cマウスでは両株とも増殖しなかつたがBattey 100616株は体内で急速に減少したのに比べ山脇株は6週後でも感染当初の菌数を保持していた。体内菌数の消長からみるとEVMは *in vitro* で感性のBattey 100616株の感染マウスの臓器内菌数の減少を促進した。

またEVM感受性の低い山脇株の臓器内菌数も減少し *in vitro* と *in vivo* の成績が必ずしも一致しなかつた。

謝　　辞

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。記して謝意を表する。

本論文の一部は第51回結核病学会総会において発表した。

文　献

1）豊原希一：結核，53：255，1978.
2）豊原希一：結核，47：181，1972.
3）結核菌の臨床細菌学：p. 234，1970，結核予防会.
4）結核菌の臨床細菌学：p. 233，1970，結核予防会.
5）久世文幸・前川暢夫：結核，53：39，1978.
6）Pollak, A. and Buhler, V.B.: Amer. Rev. Tuberc., 71:74, 1955.
7）武谷健二他：結核，37：135，1962.