

原 著

試験管内実験から見た非定型抗酸菌症治療薬
としての Cycloserine の評価

東 村 道 雄

国立療養所中部病院内科
受付 昭和63年9月12日EVALUATION OF CYCLOSERINE IN THE TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED
BY NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA VIEWED FROM *IN VITRO* EXPERIMENTS

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication September 12, 1988)

Evaluation of cycloserine as a drug in the treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria was made from *in-vitro* studies, in which *Mycobacterium tuberculosis* strains were used as the standard of the evaluation. The susceptibility testing to cycloserine was made using Ogawa egg medium. Bacterial suspensions, 10 mg wet weight/ml, prepared from 10 day-old cultures (*M. tuberculosis*, 14 day-old cultures) growing on Ogawa egg medium were used as the source of inoculation. A 0.02 ml-sample of the suspensions was inoculated onto Ogawa egg medium containing cycloserine or containing no drug, and the media inoculated were incubated at 37°C. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined after incubation for 14 days (*M. tuberculosis*, for 21 days). The MIC was determined as the lowest concentration of the drug, on which the growth of test strains was completely inhibited. However, residual growth was sometimes observed. This was regarded as growth inhibition, because control medium containing no drug showed always abundant, membranous growth. The results are shown in Fig.. The growth of *M. tuberculosis* strains was inhibited by the concentrations of 6.25 to 25 µg/ml. However, considering our previous observations on the relationship between the cycloserine resistance and the drug efficacy (reference 1), we regarded the MIC 12.5 µg/ml as critical concentration for presumable clinical efficacy. The ratios of strains of various mycobacterial species showing the MICs lower than the critical concentration are shown in Table. As seen in this table, clinical efficacy of cycloserine was expected in the treatment of infections caused by *Mycobacterium kansasii*, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum* and *M. marinum*. The efficacy of cycloserine was not so much expected in the treatment of infection due to *Mycobacterium avium* complex, because only 24% of the strains of this species showed susceptibility to this concentration.

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Key words : Cycloserine, evaluation, chemotherapy of nontuberculous mycobacteriosis, *in vitro* experiments

キーワード : Cycloserine, 評価, 非定型抗酸菌症治療, 試験管内実験

緒 言

Cycloserine (CS) が、非定型抗酸菌症の治療薬として、どの程度の意義をもつかは、現在、全く知られていない。CS は、抗結核剤としても、治療効果が低い薬と考えられている。したがって、CS を非定型抗酸菌症に単独で使用して効果があったとする報告は一つも見当たらない。多くの報告は、多剤併用療法の1剤としてCSを使用しているため、たとえ、その治療が有効であったとしても、果たしてCSがどの程度の役割を演じたかは不明である。

今回、われわれがCSに関する基礎的な実験を行ったのは、次の理由による。非定型抗酸菌症の治療は、*Mycobacterium avium* complex 感染症をはじめとして必ずしも容易ではない。そこで、溺れる者は薬をも掴むの譬えのごとく、抗菌力の弱いCSであっても、有効性が期待されるならば使用したい。しかし、CSの副作用を考えれば、無効と考えられる症例に使うべきではない。それでは、いかなる菌種に対して有効性が期待できるのか。これを考える根拠として、われわれは、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に対する発育阻止濃度を参考にすることにした。CSは、弱いとはいえ、抗結核剤の一つとして認められている以上、結核の治療には、ある程度、有効であろう。そうであれば、試験管内実験で、結核菌に対すると同程度あるいはそれ以下の濃度で発育阻止を受ける抗酸菌に対しては、ある程度の有効性を期待できると思われる。このような考えのもとに、以下の実験を行った。

実験方法

次の菌株を使用した。*Mycobacterium tuberculosis* (20株); *Mycobacterium avium* (serotypes 1 and 2) (20株); *Mycobacterium avium* complex (血清型不明株) (31株); *Mycobacterium scrofulaceum* (30株); *Mycobacterium kansasii* (30株); *Mycobacterium marinum* (26株); *Mycobacterium gordonae* (30株); *Mycobacterium nonchromogenicum* (20株); *Mycobacterium szulgai* (24株); *Mycobacterium malmoense* (16株); *Mycobacterium xenopi* (14株); *Mycobacterium simiae* (7株)、合計268株、いずれも感染症の患者から治療前に分離したものである。ただし、*M. marinum* の中の16株は魚から分離され、

M. gordonae と *M. nonchromogenicum* は土壌または水または患者から single isolates として分離された。また、*M. simiae* は猿の臓器から分離された株である。

CS感受性測定は、「1%小川培地」を使用して行った。CS (明治製菓、東京) は、蒸留水に溶解し、滅菌前の培地に添加した。感受性測定に使用したCS濃度は、100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 0 $\mu\text{g/ml}$ の7濃度 (対照を含む) である。

被検株は、小川培地に37°C 10日間 (*M. tuberculosis*, 14日間) 培養した菌を、ガラス玉コルペンで5分間振盪して均一化し、これを10 mg/ml (湿菌量) の濃度に、0.1% Tween 80水溶液に浮遊させた。この菌液から、0.02 ml ずつを渦巻白金耳で各培地に接種した。培地は、7 ml ずつ、165×16.5 mm の試験管に分注して、90°C 60分間滅菌して斜面培地としたものである。接種後、試験管に、底に3 mm の切れ目のあるダブルゴム栓を覆せ、37°C (*M. marinum*, 28°C) に培養した。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、14日後 (*M. tuberculosis*, 21日後) に行った。判定は、完全阻止を原則としたが、多少の痕跡の発育は、発育阻止とみなした。対照培地は、常に、膜状の豊富な発育を示した故である。

実験成績

実験成績を Fig. に示す。*M. tuberculosis* 20株に対するCSのMICの分布は、6.3~25 $\mu\text{g/ml}$ で、中央値は12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。この *M. tuberculosis* のMICとほぼ等しいMIC分布を示した菌種は、*M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. malmoense* であった。一方、*M. tuberculosis* よりも、より低いMICで阻止されたのは、*M. kansasii* のみであった。また、*M. tuberculosis* よりも、より高いMICで阻止された菌種は、*M. avium* complex, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. gordonae* および *M. nonchromogenicum* であった。

考 察

M. tuberculosis 20株に対するCSのMICは、6.3~25 $\mu\text{g/ml}$ であった。われわれの以前の成績によると¹⁾、“actual count”法で接種菌量を20~100生菌単位 (colony-forming units) に規定した場合、治療前の結核菌52株は全株が25 $\mu\text{g/ml}$ 培地に発育しなかった。

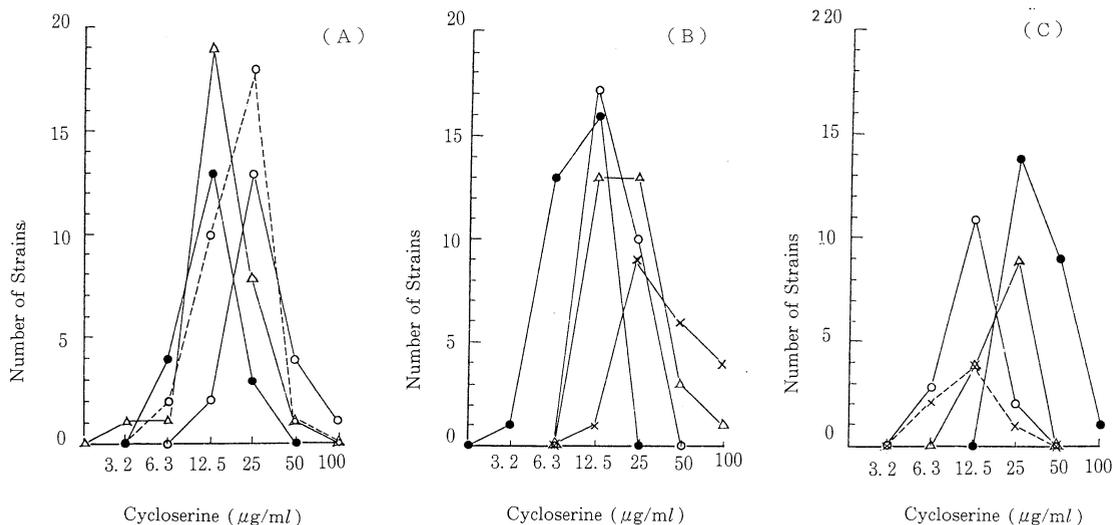


Fig. Distribution of minimal inhibitory concentrations against various mycobacterial species.

(A) ●—● *M. tuberculosis* (20 strains); ○—○ *M. avium* (serotypes 1 and 2) (20 strains); ○—○ *M. avium* complex (serotype unspecified) (31 strains); △—△ *M. scrofulaceum* (30 strains).

(B) ●—● *M. kansasii* (30 strains); ○—○ *M. marinum* (26 strains); △—△ *M. gordonae* (30 strains); ×—× *M. nonchromogenicum* (20 strains).

(C) ●—● *M. szulgai* (24 strains); ○—○ *M. malmoense* (16 strains); △—△ *M. xenopi* (14 strains); ×—× *M. simiae* (7 strains).

Table The Ratios of Strains of Various Species Which Showed the Minimal Inhibitory Concentrations Lower Than 12.5 µg/ml Cycloserine in Ogawa Egg Medium

Species	Number of strains which showed the MIC lower than 12.5 µg/ml	Percentage
<i>M. tuberculosis</i>	17 of 20	85%
<i>M. avium</i> complex	12 of 51	24
<i>M. scrofulaceum</i>	21 of 30	70
<i>M. kansasii</i>	30 of 30	100
<i>M. marinum</i>	17 of 26	65
<i>M. gordonae</i>	13 of 30	43
<i>M. nonchromogenicum</i>	1 of 20	5
<i>M. szulgai</i>	0 of 24	0
<i>M. malmoense</i>	14 of 16	88
<i>M. xenopi</i>	4 of 14	29
<i>M. simiae</i>	6 of 7	86

一方、CSと「耐性薬剤」で6カ月間治療して排菌がとまらなかった患者25名中12名(48%)の株が、この培地に発育した。この時、使用した培地は、Löwenstein-Jensen培地であった。LJ培地では、小川培地に比較して幾分活性が強く出る傾向があるが²⁾、それを考慮し

ても、25µg/ml阻止をもって、有効の限界とすることは、「臨界濃度」として高すぎると思われる。なぜなら、25名中13名の菌株は、この濃度に耐性とならなかったからである。このような状況を考慮して、われわれは、仮に、12.5µg/ml発育阻止をもって、一応、有効性を

示す境界値と考えることにした。そこで、MIC 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を示す菌株の比率を Table に示した。これらの菌株では、CS の有効性が期待できるものと考えた。

最も効果が期待できるのは、*M. kansasii* で、30株全部が 12.5 μg 以下の濃度で阻止された。以下、50%以上の菌株の発育が 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で阻止されるのは、*M. malmoense*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum* および *M. marinum* であった。この中で、*M. kansasii* に対しては有効な抗結核剤が多いが³⁾、*M. simiae* と *M. malmoense* は多くの抗結核剤に対して自然耐性があり、治療が困難とされている⁴⁾⁵⁾。したがって、CS が弱いとはいえ、多少の有効性が期待できることは意義があると思われる。ちなみに、CS の血中濃度は、CS 0.5 g 内服で最高 25~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達するといわれているから⁶⁾⁷⁾、上記のように 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 感受性をもって線引きすることは、矛盾しないと思われる。長時間作用しうる濃度は、もっと低いところにあると思われるからである。

なお、今回は、迅速発育抗酸菌を検査しなかったが、これは、*M. fortuitum* が CS 125~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に耐性であることを前に観察しているためである⁸⁾。

CS による非定型抗酸菌症治療の文献をみると、下出⁹⁾ は、すでに 1970 年に、*M. kansasii* が TH および CS に対して感受性があることを記している。*M. malmoense* 感染症について、Banks et al.¹⁰⁾ は、34 例の治療成績を示しているが、その中の 1 例は、肺切除後、TH+CS で治療し好結果を得たといいい、また、他の 1 例に TH+CS+SM を使用して好転したといっている。しかし、他の治療が併用されているので、CS が有効であったかどうかは不明である。最も重要な *M. avium* complex 感染症については、Davidson¹¹⁾ が 4~5 剤併用の 1 剤として CS を使用し、Dutt and Stead¹²⁾ および下出¹³⁾ も 4~5 剤併用の 1 剤として CS を使用している。また Engbaek et al.¹⁴⁾ も 5 剤併用の 1 剤として CS を用いている。いずれの報告でも、果たして CS が効果があったのか、なかったのか、記述からは明らかでない。今回のわれわれの成績からみると、*M. avium* complex 症の 24% くらいしか効果が期待できそうにない。しかも、結核の治療でみたように、CS の効力自体そんなに強力なものとは思えないから、*M. avium* complex 症の治療薬としては、あまり期待できそうにないと思われる。

結 論

Cycloserine (CS) は、それ自体、弱い抗結核剤ではあるが、*M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum* などの感染症では、多少の効果が期待できるように思われる。

文 献

- 1) Tsukamura, M., Kasai, E. and Tsukamura, S. : Reliability of resistance tests for kanamycin ethionamide and cycloserine, Jpn J Tuberc, 14 : 6-11, 1967.
- 2) Tsukamura, S. and Tsukamura, M. : Comparison of the degree of drug resistance between "1% Ogawa medium" and "Löwenstein-Jensen medium". Jpn J Tuberc, 11 : 44-47, 1963.
- 3) 束村道雄 : *Mycobacterium kansasii* による感染症, 医療, 39 : 18~23, 1985.
- 4) 束村道雄 : *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium asiaticum* および *Mycobacterium shimoidei* による感染症, 結核, 63 : 255~260, 1988.
- 5) 束村道雄 : *Mycobacterium malmoense* 感染症, 結核, 63 : 151~155, 1988.
- 6) Katz, S. : Cycloserine. The Practitioner 176 : 676-683, 1956.
- 7) Renzetti, A. D., Wright, K. W., Edling, J. H., and Bunn, P. : Clinical, bacteriologic, and pharmacologic observations upon cycloserine, Am Rev Tuberc Pulm Dis, 74 : 128-135, 1956.
- 8) 束村純雄, 束村道雄, 水野松司 : Cycloserine 感受性試験により *Mycobacterium fortuitum* を他抗酸菌から区別する方法, 日本細菌学雑誌, 22 : 18~19, 1967.
- 9) 下出久雄 : 非定型抗酸菌症の臨床的研究 (第 2 報), 主として治療成績について, 日本胸部臨床, 29 : 106~114, 1970.
- 10) Banks, J., Jenkins, P. A. and Smith, A. P. : Pulmonary infection with *Mycobacterium malmoense*, A review of treatment and response, Tubercle 66 : 197-203, 1985.
- 11) Davidson, P. T. : Treatment and long-term follow-up of patients with atypical mycobacterial infections, Bull Int Union against Tuberc, 51 : 257-261, 1976.
- 12) Dutt, A. K. and Stead, W. W. : Long-term results of medical treatment in *Mycobacterium intracellulare* infection, Am J Med, 67 : 449-453, 1979.
- 13) 下出久雄 : 非定型抗酸菌症の臨床的研究 (第 13 報), 多剤 (4~5 剤) 併用療法による *M. intracellulare* 肺感染症の治療成績, 日本胸部臨床, 40 : 669~676, 1981.

14) Engbaek, H. C., Vergmann, B. and Bentzon, M. W. : Lung disease caused by *Mycobacterium avium*/*Mycobacterium intracellulare*.

An analysis of Danish patients during the period of 1962-1976, Eur J Respir Dis, 62 : 72-83, 1981.