ON THE CHEMOTHERAPY OF MURINE LEPROSY

Norimasa HIRANO and Kiyo SUSHIDA

(Dept. of Bacteriology, Tokyo Women's Medical College)

As the results of the treatment and inhibition of isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone upon murine leprosy, following facts were obtained.

1. The subcutaneous injection or per os administration of it in the mice which had developed marked murine leprosy ulcer or nodules completely cured the lesions, after a few months, and the continuation can make disappear the acid-fast bacilli from the visceral organs. Then even in the inoculated site, the discovery was very difficult and only several of them could be found even in one field.

2. After the healing of the murine leprosy ulcer, the discontinuation of treatment provoked sometimes the recidive and retreatment seemed to have no effect against the recidive-ulcer. Perhaps, incomplete treatment might get the acid-fast bacilli some resistance. But after studies can clarify the problems of this point.

3. After the treatment of several weeks of healing of the inoculated site, the muscles of the inoculated site were again transplanted upon the normal mice. By six months afterwards, any involvement of murine leprosy were not seen except only one case after seven months, and others remained without any changes. When the treatment of this drug can be continued for the longer period, the murine bacillus may be unable to survive.

4. The daily administration of isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone in 10mg after a week of inoculation of the murine leprosy bacilli upon the mice, not only the onset of the disease was inhibited, but also the acid-fast bacilli in the inoculated site were not found. In the groups of animals administered 1 mg the onset was strikingly prevented, namely, in 3 of 12 mice, the acid-fast bacilli were quite negative, in 7 only in a few number and a number of them were recognized only in one mouse, while remarkable onset and innumerable bacilli were found in the control animals.

6. The above results lead us to a conclusion that isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone acts as a bacteriocidal drug upon the murine leprosy bacillus.

鼠癩の化学療法について

東京女子医科大学細菌学教室

平 野 憲 正 須 子 田 キ ヨ

(昭和31年7月27日受稿)

Isonicotinic acid hydrazide (INAH) が鼠癩の発症を著しく阻止することは、多くの学者 (Chang⁽¹⁾, Hobby and Donikian⁽²⁾, 西村³, 川口⁴, 高山⁵, 市原⁶ 等) によつて報告されている。われわれは本剤の誘導体につい

て、結核及び鼠癩に対する作用を研究中、Isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone (以下 No. 254 と記す) を著明な潰瘍を有するラットの静脈内に注射したところ、わずかに2週間にして治癒したことを認め

たので、これが偶然か、否かを確かめるために、本実験を行った。No. 254 の化学構造は次のようである。

本剤は三共高峰研究所砂川玄俊氏によつて合成され、結核の化学療法研究のため、254 番目に実験されたので、仮りに No. 254 とした。

本報告はマウスを鼠癩に感染せしめ、接種部位に著明な結節もしくは潰瘍が発生したものについて、治療試験を行った成績と、本剤を経口的に与えた場合に於ける発症阻止試験の成績である。

実験方法

No. 254 は黄色の粉末であつて、水に溶解しないけれども、少量のアルカリを加えて加熱すると溶解する。われわれは 0.05 g に蒸留水もしくは生理食塩水 4.3 cc と 10% Na_2CO_3 0.7 cc を加え、重湯煎で加熱溶解した。

本剤は経口的には、相当の大量を与えることができる。しかし、静脈内注射を行うと、本剤の LD 50 は 0.35 g per kg (マウス体重)以上である。注射する場合は、極めて徐々に行わなければ、注射中にマウスは斃れる。

治療試験

マウスの胸部皮下にハワイ株を接種し、約 3～4 カ月後著明な結節もしくは潰瘍が現われてから治療試験を行った。治療を終つたマウスについては、接種部位の筋肉を切りとつて塗抹標本を作り、抗酸性菌の有無を検索した。二・三のマウスに於ては、その筋肉を磨砕して、健康マウスの皮下に接種し、その部に於ける抗酸性菌が、感染力をもっているか、否かを検査した。またそれ等のマウスの脾臓及び肝臓を病理組織学的に検討した。治療試験は 3 回行つたが、治療に就ての大体の見当をつけるために、総計 15 四について行つた。

実験 I：約 4 カ月前にハワイ株を接種した 4 四のマウスに、No. 254 を毎日（日曜を除く）皮下に 0.7 mg 注射した。うち 2 四に於ては、潰瘍の治癒後治療を中止し、潰瘍が再発するか、どうかを観察した。

実験 2：前実験の繰り返しであつて、約 3 カ月前にハワイ株を胸部皮下に接種し、著明な病変の現れた 8 四のマウスの皮下に、No. 254 を 0.7 mg 毎日（日曜を除く）皮下に注射した。この実験に於ては、接種部に於ける抗酸性菌の消失する時期を明らかにしようと思つて、治療期間を種々にした。

実験 3：本剤を経口的に与えた場合の効果を知らうとして行つた実験であつて、約 4 カ月前に熊本株をマウスの胸部皮下接種し、著明な結節もしくは潰瘍が認められた 3 四に、No. 254 を 0.015 g 蜂蜜に混せて、毎日経口的に与えた。0.015 g という量は、1 回の投与量としては、非常な大量であるが、かような大量の連日投与に、マウスが果して耐えるか、否かを知らうために、かような量を与えたのである。

発症阻止試験

この実験には雌のマウス (dd) が用いられた。1 群のマウスは 13 四とし、各群に癩結節（ハワイ株）から作つた菌の浮游液を、0.2 cc 胸部皮下に接種し、接種後 7 日目から、1 群には No. 254 を 10 mg、2 群には 1 mg を毎日（日曜を除く）蜂蜜に混せて経口的に与え、3 群は治療せずに対照とした。鼠癩菌接種後 3 カ月目に、各群のマウスを剖検し、接種部の組織、肝臓及び脾臓から塗抹標本を作つて、抗酸性菌を検査した。

結果

治療試験（実験 1～3）の成績は表 1 に総括した。

Table 1. The chemotherapeutic effect of isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone against the subcutaneous infection with *M. leprae* murium in white mice

Animal No.	Local lesion	Duration of treatment	Route	Number of organisms observed in tissue
a	Ulcer	47	S. C.	few
b	Ulcer	83 $\frac{1}{2}$	S. C.	+
c	Ulcer	83 $\frac{1}{2}$	S. C.	+
d	Ulcer	79	S. C.	very few
1	Leprom	112	S. C.	very few
2	Ulcer	78	S. C.	—
3	Leprom	84	S. C.	very few †
4	Ulcer	127	S. C.	— †
5	Ulcer	61	S. C.	very few
6	Ulcer	60	S. C.	—
7	Ulcer	90	S. C.	few
8	Ulcer	125	S. C.	— †
9	Ulcer	108	per os	few †
10	Leprom	61	per os	few †

S. C. Drug given subcutaneously

replaced.

† died

‡ The tissue emulsion was inoculated subcutaneously into normal mice.

実験 1 の成績 4 四の内、1 四 (No. a) の潰瘍は治療後 47 日目に完全に治癒した。このマウスを殺して、接種部の筋肉を切りとり、塗抹標本を作つて染色検査したところ、少数ながら抗酸性菌が認められた。他の 3 四

(No. b, c, d) の潰瘍は、治療開始後 3 カ月以内に治癒し、治癒後 7 日目から治療を中止して、経過を観察した。その結果、1 匹 (No. b) は 3 日後に、他の 1 匹 (No. c) は 1 カ月後にいずれも再発し、胸部に小潰瘍が発生し、その部に抗酸性菌が証明された。残りの 1 匹 (No. d) は約 1 カ月に斃死し、接種部から極めて少数の抗酸性菌が検出された。

実験 2 の成績 実験に用いた 8 匹のマウスの潰瘍は、治療を始めてから、25—78 日平均 60 日で全部治癒し、その後なお 2 カ月治療を続けた。その間に死んだ 3 匹 (No. 1, 2, 3) と、他に 2 匹 (No. 5, 6) を殺して、各接種部位の筋肉及びその附近のリンパ腺を検査したが、抗酸性菌は 1 視野 1—数コ証明されたのみであつた。その内 1 匹 (No. 3) の接種部組織をとつて磨砕し、3 匹の健康マウスの皮下に接種した。その後 7 カ月を経過したけれども、未だ発症を認めない。残り 3 匹 (No. 4, 7, 8) のマウスは、治療開始後 130 日目に殺し、鼠癩菌接種部位の筋肉及びその附近のリンパ腺から塗抹標本を作つて検査したが、抗酸性菌は証明されなかつたか、極めて僅に認められたに過ぎなかつた。この内 2 匹 (No. 4, 8) のマウスの接種部組織を磨砕して、健康マウスの胸部皮下に接種した。その結果、No. 4 のマウスの組織を接種したマウスに於てのみ、接種後 7 カ月後に発症が証明され、No. 8 の組織を接種したマウスに於ては、未だ異常を認めない。

これ等マウスの脾臓、肝臓及び腎臓を病理組織学的に検査したが、癰結節は殆んど認められず、抗酸性菌も証明されなかつた。

実験 3 の成績 実験に用いた 3 匹の内、1 匹は途中で死んだが、他の 2 匹の潰瘍は、1 カ月以内に治癒した。その後なお治療を続け、1 匹 (No. 10) は治療開始後 61 日目に殺し、鼠癩菌を接種した部位の筋肉を検したところ、1 視野に約 20 コ程度の抗酸性菌を認めた。その部分の筋肉を磨砕して、健康マウス 3 匹の胸部皮下に接種し、既に 6 カ月を経過したけれども、未だ発症を認めない。他の 1 匹 (No. 9) は治療開始後 108 日に死んだ。このマウスの胸部筋肉には、僅に抗酸性菌を認めた。その部の筋肉を健康マウスに接種したが、5 カ月後の今日未だ結節は証明されない。

2 匹 (No. 9 及び 10) とともに病理組織学的には、脾臓及び肝臓に癰結節が認められたけれども、その数少く、大きさも非常に小さく、その部に抗酸性菌は証明されなかつた。

発症阻止試験成績

Table 2. The chemotherapeutic effect of isonicotnoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone against the infection with *M. leprae murium* in white mice. Daily treatment for 53 days after the infection.

Animal No.	Daily dose (mg)	Number of organisms observed in tissue		
		Tissue at the site of infection	Liver	Spleen
162	10	—	—	—
163		—	—	—
164		—	—	—
165		—	—	—
166		—	—	—
167		—	—	—
168		—	—	—
169		—	—	—
170		—	—	—
171		—	—	—
172		—	—	—
173		—	—	—
174		—	—	—
175	1	few	—	—
176		few	—	—
177		+	—	—
178		very few	—	—
179		very few	—	—
180		very few	—	—
181		—	—	—
182		very few	—	—
183		very few	—	—
184		—	—	—
185		very few	—	—
186		—	—	—
188	Control	+++	+	—
189		+++	++	+
190		+++	+	—
191		+++	+	—
192		+++	++	+
193		+++	—	—
194		+++	+	—
195		+++	+	+
196		+++	—	—
197		+++	+	—
198		+++	+	—
199		+++	+	—
200		+++	—	—

この実験成績は表 2 に総括した。治療群には外観上自然病変は認められなかつた。剖検の結果も、10 mg 投与のものに於ては全く病変を認めず、顕微鏡的にも接種部位、肝臓及び脾臓に抗酸性菌は証明されなかつた。1 mg 投与のものに於ては、結節らしいものを 4 匹 (No. 177, 186, 182, 183) のマウスに認めたが、抗酸性菌が少々多数に検出されたのは、その中の 1 匹 (No. 177) だけであつて、他の 3 匹に於ては、僅に証明されたに過ぎなかつた。残り 9 匹のマウスに於ては、抗酸性菌の証明は

困難であつたか、或は僅に認められた。対照マウスに於ては、接種後2カ月頃から結節が発生し、剖検当日に於ては、いずれも著明に結節もしくは潰瘍が認められ、その部に抗酸性菌が無数に証明され、また大多数に於て肝臓及び脾臓にも多数の菌が検出された。

考 按

ズルフォン剤が人の癩に効果のあることは、よく知られている。最近 INAH も鼠癩の発症を阻止することが明かとなり、Hale, Molesworth, Russell and Lee⁷等はこれを人類に応用して、効果のあることを認めた。しかし、Hobby and Donikian²によると、INAH はストレプトマイシン及びプロミンのように、治療を開始する時に既に多数の鼠癩菌の存在する場合には、抗菌作用を示さないという。われわれも大体これと同じような成績を得た。

われわれが今回実験に用いた Isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone (No. 254) は、著明な潰瘍の存在する鼠癩に対しても効果があり、完全にこれを治癒せしめる。潰瘍の治癒後、治療を中止すると再発する。この再発マウスに、No. 254 を再び与えても、効果は著明でない。おそらく鼠癩菌が耐性を獲得したためと思われるけれども、これに就ては目下研究中である。

治療期間が3カ月以上に及ぶときは、抗酸性菌を接種局所にすら証明することは、屢々困難となる。この場合組織に於ける菌の生死を試験するために、この組織をとつて健康マウスに接種した結果によると、接種後6カ月までは発症を認めなかつたが、7カ月目に1例発症した。従つて現在のところ、組織内に於ける抗酸性菌が、全部死んでいるとは考えられないが、更に治療を続けるならば、死滅するかもしれない。

病理組織学的検査によると、充分治療を行つたマウスに於ては、全然癩性変化が認められない。

マウスに鼠癩菌を接種し、1週を経ってから No. 254 を投与すると、発症は阻止される。充分な量が与えられた場合には、癩性変化は全然現れないばかりでなく、抗酸性菌は接種部にすら認められない。

以上の成績から、われわれは No. 254 は鼠癩菌に対し、bacteriocidal に作用するであろうと思う。

結 論

われわれは Isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone (No. 254) を鼠癩の治療及び発症阻止試験に用いて、次のような成績を得た。

1. 鼠癩による潰瘍もしくは結節の著明なマウスの皮下に No. 254 を注射するか、或は経口的に与えると、約2～3カ月後に局所の病変は完全に治癒し、その後なお治療を続けると、内臓に於ける抗酸性菌は消失し、接種局所に於ける抗酸性菌も検出極めて困難となるか、1視野に数コを算するのみとなる。

2. 潰瘍の治癒後、間もなく治療を中止すると、往々再発し、再び治療を行つても治癒困難のようである。おそらく不完全な治療のために、抗酸性菌が耐性を得たものと考えられるけれども、この点については目下なお研究中である。

3. 接種局所の病変の治癒後、なお数週間治療を行つてから、接種部の筋肉をとつて健康マウスに接種したところ、接種後6カ月までは発症を認めなかつたが、7カ月目に1例だけ発症した。その他の4例に於ては、未だ異常を認めない。それ故に治療を長期に亘つて行つたならば、鼠癩菌は死滅するかも知れない。

4. マウスに鼠癩菌を接種後1週間経て、No. 254 を10 mg 毎日投与すると、発症は完全に阻止されるばかりでなく、接種部に抗酸性菌も証明されない。1 mg 投与群に於ても発症は著しく阻止され、12匹中3匹に於ては抗酸性菌は全く認められず、7匹に於ては僅に証明され、1匹に於てのみ稍々多数に検出された。対照に於ては著明な発症と；その部に無数の抗酸性菌が認められた。

6. 以上の実験成績から、Isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone は鼠癩菌に対し、bacteriocidal に作用するもののように思われる。

本研究の一部は文部省科学研究費によつた。また本研究に於ける病理組織学的検査は本学病理学教室今井教授の援助によつた。ここに厚く深謝する。

文 献

- 1) Chang, Y. T.: Chemotherapy of murine leprosy, III, Intern. J. Leprosy. **21**, 57 (1953)
- 2) Hobby, G. L. and Donikian, M. A.: An evaluation of chmotherapeutic agents in the control of experimental infections due to *M. leprae murium*, Am. Rev. Tuberc., **72**, 846, (1955)
- 3) 西村真二, 河野通之: ヒドラジットによる鼠癩の治療実験 最新医学 **7**, 1202 (昭和27)
- 4) 川口陽一郎, 野田隆雄: 鼠癩に対するイソニコチン酸ヒドラジットの影響 (学会抄録) レブラ **22**, 212 (昭和28)

-
- 5) 高山保郎: INAH 投与の鼠癩の発育阻止並びに治療効果に就て レブラ **23**, 71 (昭和29)
- 6) 市原鶴雄, 藤田幸雄, 市原強, 野中実穂: 鼠癩の治療に関する研究(第2報) レブラ **24**, 33 (昭和30)
- 7) Hale, J. H. Molesworth, B. D., Russell, D. A. and Lee, L. H.: Isonicotinic hydrazide in the treatment of leprosy, Intern. J. Leprosy. **22**, 297 (1954)

平野・須子田論文附図

Fig. 1

Fig. 5

平野・須子田論文附图

Explanation of plate

Fig. 1~4. The mice received 10 mg (daily dose) of isonicotinoyl-3-methoxy-4-hydroxybenzal hydrazone.

Fig. 5~8. The mice received 1 mg (daily dose) of the drug.

Fig. 9~11. Control mice.