EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECT OF KANAMYCIN (KM) AND STREPTOMYCIN (SM) IN THE TREATMENT OF MURINE LEPROSY IN RATS

Toyoho EUROHASHI

(Chief; Tuberculosis Department, National Institute of Health, Tokyo)

Takeyo TAKAHASHI, Shinnosuke OSHIMA & Motoko UEMURA

(National Sanatorium, Oshima-seisho-en, Kagawa Pref.—Chief: T. Nojima)

White rats infected with the *KUMAMOTO*-strain of *M. leprae* murium were divided into 3 groups; the first was treated with 5 mg of KM daily, the second with the same dose of SM and the third was remained as the non-treated control. After the treatment of 3.5 to 4.5 months animals were autopsied and the nodules at the site of inoculation were removed, weighed and emulsified. The emulsions were diluted in decimal system. Two smears were prepared from every dilution degree of the emulsion quantitatively and were stained with victoriablue simultaneous staining and malachitegreen-fuchsin staining respectively for the counting of the number of bacilli in 0.1 ml, and then total number of bacilli per leproma was calculated. After that, 0.5 ml of 1/500 dilution of the emulsions of nodules were inoculated subcutaneously into normal healthy rats and the development of nodule at the site of inoculation was observed.

In the treated groups the weight of nodules were markedly lighter and the total numbers of bacilli per nodules were also smaller than the control group. In the control group, majority of the bacilli stained to malachitegreen and was typical rod shaped form, whereas in the treated groups they could not be stained by malachitegreen and represented granular or beaded form. Such a difference was more evident in the KM group than in the SM group.

Leprosy nodules which were produced by inoculation of the emulsions of the nodules from treated animals appeared much later than those produced by the emulsion from control animal.

From these results it is clear that the administration of KM or SM is very effective in the treatment of murine leprosy in rats. Further, malachitegreen-fuchsin staining seems to be usable in the evaluation of the therapeutic effect of medicaments enabling to show qualitative differences of murine leprosy bacilli between the treated and the untreated animals.

鼠癩菌感染ダイコクネズミに対する Kanamycin (KM) 及び Streptomycin (SM) の治療効果判定について

室 橋 豊 穂

国立予防衛生研究所結核部長

高 橋 竹 代・大 島 新 之 助・植 村 許 子

国立療養所大島青松園 (園長 野島 泰治)

(1958 年 4 月 28 日 受稿)

緒 言

鼠癩に対する薬剤の治療効果判定にあたって、感染局所鼠癩結節の重量測定以外に、結節内鼠癩菌の定量的染色鏡検を行って、菌数の多少ならびに菌体の染色性を比較する方法を併用すれば、直接的に菌の動態を観察しうるので便利であろうとかつて報告した。¹⁾ ひき続き、Kanamycin (KM) 及び Streptomycin (SM) を用いた鼠癩治療実験において、前報告を確認する成績をえたので報告する。

実験材料並びに方法

熊本株鼠癩菌感染ダイコクネズミ癩結節の 500 倍乳剤 0.5ml づつを下部皮下に接種されたダイコクネズミのうち、1 群を対照非治療群、1 群を SM 治療群、他の 1 群を KM 治療群とする。感染後 75 日目、結節が充分出現してから、治療群には KM、SM 夫々 1 日量 5 gm 宛、週 6 回皮下注射した。治療継続 3.5 カ月後、各群から 2 疋づつを、また治療継続 4.5 カ月後残り全部を剖検し、局所結節重量を測定すると共に、既報の方法¹⁾ に従って鼠癩結節中の菌数の推定を行った。

すなわち、まず 100mg/ml の結節乳剤を 2mg/ml trypsin 添加 phosphate buffer (pH 7.2, M/15) で作り、これを蒸溜水で 10 倍段階稀釈したものから定量的に塗抹標本を作り、victoria blue 同時染色法²⁾ で染めた標本の計数によつて菌数を算定すると共に、malachtegreen-fuchsin (M-F) 染色法³⁾ で分別染色された菌数を算えて、推定総菌数および推定総緑染菌数を定めた。

また、3.5 カ月治療実験群については、対照および KM 群の各 1 匹から、また 4.5 カ月治療実験群については各群の 1 匹から、夫々癩結節乳剤をつくり、その 500 倍

乳剤の 0.5ml づつを健康ダイコクネズミの下部皮下に接種して、感染局所に生ずる癩結節を観察し、各乳剤の鼠癩発症力を比較した。

結節乳剤中の菌数算定には推定式⁴⁾

$$N = 2 \cdot 10^5 \cdot n$$

を用い、まずある稀釈度における 0.1 ml 中の菌数を計算してから、これに稀釈度を乗じて結節 1 mg 中の菌数を、ついで全結節中の総菌数を算出した。式中 n は 1 視野平均菌数である。

実験成績

1. 結節重量ならびに結節中の菌数:

3.5 カ月治療実験群の成績を表 1 に、4.5 カ月治療実験群の成績を表 2 に掲げた、表中 N_1 は 1 mg 当り菌数、 ΣN_1 は全結節中菌数、また α は M-F 染色で緑にそまる菌の割合、 ΣN_0 は全結節中の緑にそまる菌数である。

表 1. 3.5 カ月治療実験群の鼠癩結節重量と菌数

群	Rat Nos.	癩結節重量(mg)	1mg当り菌数 N_1 /mg	結節中総菌数 ΣN_1 /結節	α (%)	結節中緑菌数 ΣN_0 /結節
対 照	1 *	850	3.2×10^8	2.8×10^{11}	68	1.9×10^{11}
	2	880	3.6×10^7	3.2×10^{10}	93	2.9×10^{10}
S M	3	400	2.8×10^7	1.2×10^{10}	22	2.6×10^9
	4	340	1.2×10^7	4.1×10^9	67	2.7×10^9
K M	5	650	2.3×10^7	1.5×10^{10}	18	2.8×10^9
	6 *	150	1.0×10^7	1.5×10^9	13	1.9×10^8

注: α : M-F 染色による緑染菌の割合

*: 対照-No 1 及び KM-No 6 の結節乳剤を健康ダイコクネズミ皮下に接種 (表 3)

表 2. 4.5カ月治療実験群の鼠癩結節重量と菌数

群	Rat Nos.	癩結節重量(mg)	1mg当り菌数		α (%)	結節中緑菌数 ΣN_2 /結節
			N_1 /mg	ΣN_1 /結節		
対 照	1	1,610	2.4×10^8	3.9×10^{11}	86	3.4×10^{11}
	2*	1,740	2.3×10^8	4.0×10^{11}	83	3.3×10^{11}
	3	980	5.3×10^7	5.2×10^{10}	60	3.1×10^{10}
	4	840	3.2×10^7	2.7×10^{10}	49	1.3×10^{10}
S M	6	130	6.0×10^5	7.8×10^7	12	1.3×10^7
	7	130	7.0×10^6	9.1×10^9	18	1.6×10^9
	8	220	3.3×10^7	7.3×10^9	32	2.9×10^9
	9	250	2.8×10^7	7.0×10^9	58	4.1×10^9
	10	250	2.2×10^7	5.5×10^9	45	2.5×10^9
	11*	280	3.2×10^7	9.0×10^9	39	3.5×10^9
K M	12	60	3.4×10^6	2.1×10^8	9	2.1×10^7
	13*	450	1.4×10^6	6.3×10^8	30	1.9×10^9
	14	310	4.3×10^7	1.4×10^{10}	9	1.3×10^9
	15	170	6.5×10^7	1.1×10^9	10	1.1×10^8
	16	270	1.2×10^7	3.3×10^9	49	1.6×10^9
	17	210	7.6×10^6	1.6×10^9	28	4.5×10^8
	18	300	9.7×10^6	2.9×10^9	27	7.8×10^8

注: * (対照-No 2, SM-No 11, KM-No 13) の結節乳剤を健康ダイコクネズミ皮下に接種 (表 4)

3.5カ月治療の場合、癩結節平均重量は、対照群の865mgに対してKM群400mg、SM群380mgで、治療群では結節重量が明らかに少い。全結節中総菌数は、対照群では $10^{10} \sim 10^{11}$ orderであるが、治療群ではこれより少く、KM、SM両群共 $10^9 \sim 10^{10}$ orderである。M-F法による分別染色で緑にそめ分けられた菌の割合(α)は、対照群の68%及び93%に対して、SM群22%及び67%、KM群13%及び18%で、治療群では緑にそまる菌数は明らかに少く、とくにKM群では著しい。全結節中の推定緑染菌総数は、対照群の $10^{10} \sim 10^{11}$ orderに対して、治療群では $10^8 \sim 10^9$ orderで、対照群のほぼ $1/100$ 程度に相当する。

菌の染色性ならびに形態をみると、対照群では定型的桿状を呈するものが大部分で、victoriablue、M-F両染色法により、ともに良好な染色を示すが、KM群では定型的桿状を呈する緑染菌は少く、80~90%を占める赤染菌の多くは、捻珠状或は断裂した顆粒状を呈し、染色性も悪い。SM群ではほぼその中間で、菌形態の正常のものが相当見られ、かつ染色性もKM群におけるよりも幾分良好であつた。

4.5カ月治療の場合の癩結節平均重量は、対照群と治

療群とでは3.5カ月治療の場合より一層差異が顕著で、対照群の1,292mgに対し、KM群253mg、SM群210mgである。すなわち対照群では癩結節の腫大が極めて著明であるのに対して、治療群では何れも明らかに癩結節が縮小している。

全結節あたりの総菌数は、対照群 $10^{10} \sim 10^{11}$ 、KM群 $10^8 \sim 10^{10}$ 及びSM群 $10^7 \sim 10^9$ orderにあり、また推定緑染菌総数は夫々 $10^{10} \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^9$ 、 $10^7 \sim 10^9$ orderで、3.5カ月治療の場合よりも、一層緑にそまる菌数が減少している。治療群、非治療群間の菌形態及び染色性の違いは、3.5カ月治療の場合よりも一層顕著で、対照群では定型的桿状でしかもM-F染色で緑にそまる菌が圧倒的に多いのに対して、KM群では3.5カ月治療の場合よりも一層菌の染色性は不良となり、M-F染色でfuchsinにより赤くそまる菌が多く、かつ捻珠状及至顆粒状を呈するものが極めて多い。SM群では、菌所見はほぼKM群に近いが、これに比して定型的桿状を呈するものがやや多かった。

2. 鼠癩結節乳剤の発症力

3.5カ月治療実験群の対照No1及びKM-No6の癩結節から夫々500倍乳剤をつくり、その0.5mlずつを健康ダイコクネズミ皮下に接種し、結節形成経過を比較した。癩結節の大きさを西村ら⁵⁾の提唱する癩結節(腫)指数で表わせば表3の如くで、対照No1の結節乳剤に比して、KM-No6のそれは著しく鼠癩発症力の劣るこ

表 3. 3.5カ月治療実験群の結節乳剤(500倍、0.5ml)皮下注射後の鼠癩結節形成経過

実験群	接種 総 菌数	接種 菌数	Rat Nos.	接 種 後 の 日 数											
				35 7 45	53	61	68	75	81	80	96	103	110	117	
対照 (No 1)	2.8×10 ⁸	1.9×10 ⁸	1	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			2	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			3	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			4	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	
			5	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
結節群	平均結節指数			0	0.7	1.1	1.3	1.5	1.5	1.7	1.7	1.9	2.1	2.1	
KM 治療 (No 6)	1.5×10 ⁶	1.9×10 ⁶	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
			2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	
			4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			5	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
			6	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
			7	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
結節群	平均結節指数			0	0	0	0	0	0	0.070	0.36	0.8	0.9	1.1	

注: 鼠癩結節(腫)指数:

結節の拡がり	触 診	記号	指数
1~30 mm ²	痕跡~半米粒大	+	0.5
31~70 "	米粒大	+	1.0
71~150 "	小豆大	+	2.0
151~300 "	小指頭大	+	3.0

とがわかる。

また 4.5 カ月治療実験群についても全く同様の実験を行った。成績は表 4 の如くで、KM-No 13 の乳剤による鼠癩結節発現は甚だ遅れ、対照 No 2 のそれより明ら

かに劣っている。また SM-No 11 の乳剤では半数において癩結節は軽微であつたが、1 匹では早期から明らかな腫脹を触れ、また残る 1 匹では結節を認めえなかつた。すなわち S M 群の乳剤による発症状態には甚だ個体差が

表 4. 4.5 カ月治療実験群の結節乳剤 (500 倍 0.5 ml)
皮下注射後の鼠癩結節形成経過

実験群	接種総菌数	接種緑菌数	Rat Nos.	接 種 後 の 日 数											
				35	40	48	55	62	69	76	83	90	97	104	111 118
対照 (No 2) 結節群	4.0×10^8	3.3×10^8	1	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			2	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			平均結節指数	0	0	1.5	1.25	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
S M 治療 (No 11) 結節群	9.0×10^6	3.5×10^6	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			3	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
			4	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
			平均結節指数	0.6	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.1	1.6	1.6	1.9	1.9
K M 治療 (No 13) 結節群	6.3×10^6	1.5×10^6	1	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
			2	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
			3	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
			4	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
			平均結節指数	0	0	0	0	0.25	0.5	1.4	1.6	2.1	2.0	2.0	2.0

大きく、総体的にみれば K M 群乳剤よりも発症力がやや強いと考えられる。

総 括・考 按

前報告¹⁾において、Kanamycin が鼠癩治療に有効であることを述べた際に、治療効果判定には、従来慣用されている結節重量の比較や臓器剖面のスタンプ塗抹標本についての菌検索に加えて、結節内鼠癩菌数の定量的測定を行うべきことを提唱し、malachitegreen-fuchsin 法による菌体の分別染色の併用は、菌の質的な面の考察をも可能ならしめるので、この目的に役立ちうるであろうと述べた。

本実験においては、S M 及び K M を治療に用いたが、結節重量、結節内菌数ならびに菌の malachitegreen-fuchsin 法による分別染色性等の諸点において、前報告に述べたところをそのまま確認しうる成績を得た。この成績からみて、S M 及び K M は、共に鼠癩治療において明らかに有効であるということが出来る。

本実験においては、さらに、分別染色された菌体の生

物学的意義を考察する目的から、それらの菌を含む癩結節乳剤を健康ダイコクネズミ皮下に接種して発症力の比較を行った。結果からみれば、接種乳剤中の総菌数において、対照群乳剤と治療群乳剤との間に既に 2 order 以上の開きがあるので、発症力の差を必ずしも malachitegreen 染色性を持つ菌の多寡に帰する訳にはゆかぬかも知れない。しかしその反面、接種総菌数が癩結節発生に関与する生菌数をそのまま代表しえないこともまた考慮に入れる必要があろう。

ここで、結核菌について得た観察を想起してみよう。すなわち、結核菌の場合に、viable な菌は malachitegreen 染色性をもち緑にそまるが、緑にそまる菌のすべてが必ずしも viable ではなく、また緑にそまる菌の数が著しく減少するような環境条件下、例えば濃厚菌液 37°C 保存³⁾や濃縮空洞⁴⁾のような場合には、たとえある割合に菌が緑に染まろうとも、培地上において分裂増殖する菌は少く、従つて集落形成もまた少いという成績をえている。鼠癩菌と結核菌とは勿論同じではないが、生物学的諸性状の類似性からみて、結核菌で得た知見はある

程度鼠癩菌にもまた当てはまりうるのではあるまいか。

このような観点からすると、本実験の場合、その発症力からみて、治療群乳剤中の菌の中発症力を備えた生菌の数は、前述の方法で計算された推定数よりも実際的には遙かに少ないのではないかと推察される。そして緑にそまる菌が必ずしもすべて viable な菌ではないという結核菌における知見に基づけば、治療群乳剤の 1 接種量中の viable な菌数は、対照群乳剤のそれに比して $1/1000$ よりさらに低い order にあつたのではないと思われる。この点に関しては、接種菌数 order と鼠癩結節形成程度とについて行われた西村らの実験成績⁵⁾が参考になる。その実験において、結節乳剤の 10^4 稀釈液 0.5ml (1 接種量中の総菌数は $10^6 \sim 10^7$ order であつたと推察される) を健康ダイコクネズミに接種した場合の鼠癩結節発現経過は、結節指数からみて本実験の対照群のそれより幾分弱いがほぼ近似している。本実験における治療群乳剤接種量中の総菌数が $10^5 \sim 10^6$ order であることを考えると、対照群乳剤 (総菌数 order 10^8) 接種に比して発症力が著しく弱かつたことは、接種総菌数の差以外に、菌の質的な面の差を慮せずには説明がむずかしいように思う。

malachitegreen 染色性の菌数の多寡と発症力とを関連づけるためには、勿論接種総菌数を同じ order に規正して比較すべきであり、その意味からすれば前述の実験条件はこの点を検討するに充分であるとはいいがたい。しかし接種総菌数 order の違いでは説明しがたい程の発症力の違いは、菌自体に、殊にその vitality における著しい相違の存することを示唆すると考えてもよさそうである。そして従来の効果判定法たる結節重量の違いと、結節内菌体の分別染色性ならびに菌形態の違いがよく平行するところからみると、malachitegreen-fuchsin 染色による菌所見は、菌の質的な面を示す意味において効果判定への補助手段として用いられるように思われる。

なお KM と SM との治療効果は、本実験の成績からみると、同一投与量では KM の方がやや優るといいうであらう。

結 論

鼠癩菌熊本株感染ダイコクネズミに KM 及び SM 治療を行い、3.5~4.5 ヶ月治療継続後に屠殺して鼠癩結節重量を測定し、結節乳剤について菌数を算定し、さらにその乳剤を健康ダイコクネズミ皮下に注射して発症力をしらべた。

治療群では結節重量は対照群より軽く、全結節当り総菌数も明らかに少なかつた。malachitegreen-fuchsin 染色

による菌所見では、治療群では malachitegreen 染色性を失いかつ定型的桿状を呈さぬものが多く、対照とは著しく異つていた。

結核乳剤を健康ダイコクネズミに接種したところ、発症力は治療群ことに KM 治療群乳剤が著しく劣つていた。

以上の成績から KM, SM 共鼠癩治療に有効であることがわかる。また malachitegreen-fuchsin 染色法は、治療効果判定への補助手段として用いられると思う。

文 献

- 1) 室橋豊穂: Kanamycin によるネズミ癩治療効果判定への malachitegreen-fuchsin 染色法の応用・医学と生物学, **48** (2), 49 (1958)
- 2) 室橋豊穂・吉田幸之助: Hallberg 結核菌染色法の一変法, Victoriablue による染色・日本医事新報, 1609 号, 987 (1955)
- 3) Murohashi, T. & Yoshida, K.: Improvement of malachitegreen-fuchsin staining, Acta tuberc. scandinav., **36** (2-3), 195 (1958)
- 4) 室橋豊穂・吉田幸之助: 喀痰塗抹標本からの検出結核菌々数に基づいた培養集落数の推定法, I, II & III. 結核, **33**, 95・293 & 341 (1958)
- 5) 西村真二他 9 氏: BCG による鼠癩免疫の研究. レブラ, **25** (2), 25, 70 (1956)
- 6) 室橋豊穂・吉田幸之助・加納保之・浜野三吾: 切除肺病巣内の結核菌の生, 死について 結核, **33**, 32, (1958)