Kanamycin に関する研究

第3報 モルモットの実験的結核症に及ぼすカナマイシンの効果(本実験)

金井 興美 柳 沢 謙

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

〔受付: 8月15日 1957年〕

これまでの私達の報告¹⁾²⁾によつて, カナマイシンは *in vitro* でも *in vivo* でも, 有毒結核菌に対して著しい発育阻止効果を及ぼすことが示され, 且つ, *in vitro* でストレプトマイシンやPASに耐性の変異株に対してその感受性親株に対すると同様の作用があることが示された。即ち, 結核菌に対する極めて有望な一新抗生物質の出現を思わせる成績が得られた。こゝにおいて, 最後の効果確認試験として, 前報³⁾にひきつづいてモルモットの本実験に移った。

実験方法 実験材料

1) 動物: 60匹の白色健常モルモットを使用した。実験開始時における体重は 320 g ~ 500 g であつた。

2) 結核菌: 小川培地上で2週毎に継代保存してきた有毒人型菌株(H2株)を用いた。菌液は手振法によつて蒸留水浮遊液とした。感染直前に希釈培養して各動物への接種生菌単位数は 26×10^4 であることがわかつた。

3) 感染: 前報³⁾に述べたような静注感染によつた。

4) 薬剤投与: 1匹1日量を10mgとし, 投与方法は全く前報³⁾に述べたところと同じである。用いたカナマイシンは, 411mcg/1000mcgの純度のもので, 上述の10mgは free base に換算した値である。

5) 組織よりの感染菌分離: 肉眼的な病変比較に際して, 細菌学的裏づけとして常に感染菌数の検討を行つた。即ち, 組織を9倍量の1% NaOHで乳剤とし, 所見に応じては希釈(蒸留水で)して小川培地に接種し, 培養後発生する集落数より組織10mg中に生残していた生菌単位数を計算した。

実験計画

60匹の動物を3群に分けた。それぞれ, 10匹, 25匹, 25匹とした。これらすべて一様に静注感染し, その後, 10匹の群は無処置対照として放置し, 25匹ずつの2群はそれぞれカナマイシン, あるいはストレプトマイシンで

治療を行つた。25匹は更に10匹と15匹の小群にわけて, はじめの10匹には感染後1日より投与開始, 別の15匹には2週後より投与を開始した。感染後9週で対照群のすべてと, 薬剤投与の4群を夫々5匹のとしてすべて剖検し, 菌分離を行つた。残つた動物には投与は中止してそのまゝ3週間放置し, こゝで剖検, 培養を行つた。この間2週毎に体重測定を行つた。この実験概要を表1に示し, 体重変化を図1に示した。

図1 各群における平均体重の推移

まず図1をみればわかるように, 対照群の平均体重は6週を境にして下降の傾向を示し, 8週をすぎるところより減少度ははやまり, この頃より全身状態も急にわるく, 早晚結核死にいたるものとみられた。一方, 薬剤投与群では, 常に体重増加の傾向を維持し, 全身状態もまた極めて良好であつた。したがつて, 感染後9週における平均体重は, 対照群のそれより実に 250 g も多かつたのである。このような効果においては, カナマイシンもストレプトマイシンも實際上差異はなく, もし剖検をしない

KANAI Koomi, and YANAGISAWA Ken: Kanamycin in experimental guinea pig tuberculosis. II. The main experiment. Department of Tuberculosis, National Institute of Health, —Jap. J. of Bact., 13(1), 1-6, 1958.

表1 実験様式

群	動物 No.	28/3	29/3	12/4	25/5	28/5	19/6
対 照 群	1...10 (Control)	有 毒 人 型 菌	k-a s-a	k-b s-b	薬 剤 投 与 中 止	1...10	
Kanamycin 投 与 群	11...20 (k-a)	H ₂ 株 の	群 に は そ れ ぞ れ 薬 剤 投 与 開 始	群 に 投 与 開 始		11...15	15...20
	21...35 (k-b)					21...30	31...35
Streptomycin 投 与 群	36...45 (s-a)	26×10 ⁴				36...40	41...45
	46...60 (s-b)	生 菌 単 位 で 一 様 に 静 注 感 染				46...55	56...60

でそのまゝ観察をつづけたならば、生存率においてこれらの薬剤は、実に対照群に対し極めて驚異的な効果を示したにちがいない。対照群10匹中の1匹は実験開始当時に死亡したが、これは実験結核症と関係のない事故死であつた。なお、カナマイシン投与を10mg 1日量として9週間、即ち総量 630mg を1匹のモルモットに注射したのであるが、局所的にも全身的にも、また急性のあるいは遅発性の何等の副作用もみられなかつた。この点ストレプトマイシンと全く同様であつて、こゝに一つの有望な所見が得られたわけである。

表2は9週における第1回の解剖の剖検所見であるが、対照群は結核死に至る直前であると考えられていたので、その病巣のひろがり、つよさも実験結核症としては最高度のものであつた。肝、脾は無数の粟粒結核で充満し、著しい腫脹を示し、肺は比較的大きい結核結節や融合結節が散在し、肺全体としてその容量も重量も大となつていた。静注感染であるため、個体差なく平等にかゝつていたが、内臓の変化に比して門脈腺以外のリンパ腺の腫脹が小であるのが特長である。これに対して、感染1日後より投与を始めた群は、ストレプトマイシン群では5匹全部殆んど病変を肉眼的に見出すことができず、カナマイシン群では1匹以外は極めて軽度の病巣であつた。2週後より投与を始めた群は、両薬剤群ともほぼ同一の所見で、病変存在に個体差があつたが、それでも対照群と比べては驚異的な病巣治療の状態であつた。表3に示した菌分離数は忠実にこの相対的な病変の程度を表現し、ストレプトマイシンとカナマイシンとの間にも、

図2 表2における各群の剖検時脾重の比較

図3 表における各群の剖検時肺重の比較

その効果にそれほど大きな差異はみられなかつた。その他、所見として気がついたことは、2週後より治療を始めた群の脾の結節は、粟粒結節というよりはむしろ大きい **Nodular type** であり、また、これらの薬剤は脾よりも肺において効力がつよいという点である。これは竹内等⁹⁾によつて報告されたように、カナマイシンは脾、腎に分布量が高いことと説明されるであろうか。あるいは宿主側の解剖学的、生理学的要因によるものであるか。

表2 投与完了直後剖検の各群の結核病変の肉眼的比較

		りんばせん						ぞうき		
		しつへき 左 右	そけい 左 右	えきか 左 右	こうふく 左 右	もんみや く	きかん	肺	肝	脾
Control	1	++ ++	— —	++ —	+ +	+++	+	+++	++	+++
	2	+ +	+ +	+ +	+ —	++	+	++	++	+++
	3	++ —	++ +	++ +	+ +	+++	++	+++	+++	+++
	4	++ +	— ++	+ +	+ +	++	++	++	+++	+++
	6	++ ++	+ +	+ +	+ +	+++	++	+++	+++	+++
	7	++ +	++ +	— +	+ +	+	++	++	+++	+++
	8	++ +	+ +	+ +	+ +	+++	++	+++	+++	+++
	9	+ +	— +	+ +	+ +	++	++	+++	+++	+++
	10	+ +	— +	+ —	— +	++	+++	+++	++	+++
	K-a	11	+ +	— —	— —	— —	++	—	—	+++
12		+ +	— —	— —	— —	+	—	—	+	+
13		— —	+ —	— —	+ +	—	—	—	—	+
14		— —	— —	+ +	— +	+	—	—	+	+
15		— —	— —	— —	— +	+	—	—	—	+
S-a	36	— —	— —	— —	— —	—	—	+	+	—
	37	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
	38	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
	39	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
	40	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
K-b	21	— —	— —	— —	— —	+	—	—	+	+
	22	— —	— —	— —	— —	++	—	—	+	++
	23	— —	— —	— —	— —	++	—	—	—	+
	24	— —	— —	— —	— —	+	—	—	+	+++
	25	— —	— —	— —	— —	++	—	—	+	+
	26	— —	— —	— —	— —	+	—	—	—	—
	27	— —	— —	— —	— —	+	—	—	+++	+++
	28	— —	— —	— —	— —	++	—	—	+++	+++
	29	— —	— —	— —	— —	++	—	—	+++	++
	30	— —	— —	— —	— —	—	—	—	+	+
S-b	46	+ +	+ —	+ —	— —	++	—	+	+	+
	47	+ —	— —	— —	— —	++	—	+	++	+++
	48	+ —	— —	— —	— —	++	+	++	+++	++
	49	— —	— —	— —	— —	—	+	—	—	—
	50	— —	— —	— —	— —	+	++	++	+++	++
	51	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
	52	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
	53	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
	54	— —	— —	— —	— —	—	—	+	—	—
	55	— —	— —	— —	— —	—	—	+	—	—

註 ぞうき - へんかなし, + わずか結核結節, +++ 多くの結核結節, +++ 無数の粟粒結節
 りんばせん - へんかなし, ++ 小豆大, 大豆大の腫脹, +++ それ以上の腫脹

表3 表2に示された動物よりの分離結核菌数

群	動物 No.	ぞ う き		
		肺	肝	脾
Control	1	3300	7600	3300
	2	4000	2400	2900
	3	3300	8000	2000
	4	11000	1700	9000
	6	5000	2300	2000
	7	4200	3600	3000
	8	31000	5000	1500
	9	3100	1300	4000
	10	116000	11300	36000
K-a	11	0	13	110
	12	0	23	7
	13	1	3	70
	14	1	0	10
	15	0	0	26
S-a	36	0	0	0
	37	0	0	0
	38	0	0	0
	39	0	0	0
	40	0	0	0
K-b	21	0	0	21
	22	0	0	7000
	23	0	0	3
	24	0	2	2400
	25	0	10	26
	26	5	0	0
	27	0	140	10
	28	1	230	70
	29	32	250	190
	30	3	5	20
S-b	46	19	0	5
	47	7	0	570
	48	6	31	17
	49	2	7	1
	50	83	230	2
	51	6	0	12
	52	0	0	0
	53	0	0	13
	54	0	0	8
	55	0	0	0

註 組織 10mg 中の生菌単位数

ここでは明でない。図2, 3は肺, 脾の重量をヒストグラムとして比較して示したもので, とくに脾重によってカナマイシンの効果の著しく, ストレプトマイシンに匹敵しうることが表現されている。

次に, 薬剤投与中止後3週放置し, そこで剖検, 培養された動物の所見が表4, 表5に示されているが, これらの表はそれぞれ, 表2, 表3を対照として, 薬剤投与中止の3週間に病勢あるいは感染がどのように進展したかをみるに役立つ。即ち, 一見してわかるように, この間カナマイシン, あるいはストレプトマイシンの投与中止によって, 特に感染菌の増殖が急に再発したとは考えられないのである。即ち, 投与中止にいたる9週間に, 菌の増殖がおさえられると同時に獲得免疫の発生もある程度起つて, 少なくともその後の3週間程はこの免疫力によって菌の増殖を阻止し得たのかもしれない。

考 察

1948年以来, 私達の研究室ではわが国各所の研究室より送附される抗生物質, あるいは化学合成品の抗結核性について, 検討を行つてきたのである。即ち, *in vitro*での効果, 更に実験的マウス結核症に対する効果, もしこれらをパスした場合にはモルモットでの本実験という順序をふむことにしていた。この場合, 被検材料が抗生物質である場合には, ストレプトマイシンを **positive control** とし, 化学合成品である場合にはイソニアジッドを **positive control** とした。なぜならば, 現在この2つが最も強力な抗結核剤であり, これらに匹敵し得る効力をもちえないものは, 結局抗結核剤としても, 二流三流の価値しかもちえないという私達の考え方によるものである。この立場からすれば, 少なくともこれまで私達の検査にもち来られた数多くの物質には, 実際の意義をもち得たものは皆無であつた。即ち, *in vitro*で極めて強い抗結核菌力を発揮し, 毒性も比較的少くて有望視されたホモマイシン⁴⁾ ピリドマイシン⁵⁾ も, マウスにおける試験ですでに本実験への希望が失われた。また, 細谷等によつて分離されたレテイキュリン⁶⁾, や今村等⁷⁾によつて報告された No. 23572 物質は, 私達もその効果のストレプトマイシンに匹敵し得ることを認めたがこれはストレプトマイシン耐性菌には作用せず, 化学的にも前者はストレプトマイシンと同一物質であり, 後者は一種の *streptomyces* によつて直接生産されるジヒドロストレプトマイシンであると云われている。

したがつて, 梅沢等⁸⁾によつて発見されたカナマイシンは, 私達が経験した最初の新抗結核剤であり, 臨末的

表4 投与中止後3週間放置の各群の肉眼的病変の比較

動物 No.		リンバせん						ぞうき		
		しつへき 左右	そけい 左右	えきか 左右	こうふく 左右	もん みやく	きかん	肺	肝	脾
K-a	16	+	-	-	-	+	-	-	-	++
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	18	+	+	+	+	++	-	-	+	+
	19	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	++	-
S-a	41	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	42	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	44	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-b	31	+	-	-	-	++	-	+	++	++
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	-	-	-	-	-	-	++	+	+
	35	-	-	-	-	++	-	-	+	++
S-b	56	+	-	-	-	++	-	++	-	++
	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	58	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	59	+	-	-	-	++	-	-	+	++
	60	+	+	+	+	++	-	+	-	++

註: 記号は表2におけると同じ

表5 表4に示された動物のぞうき
よりの分離結核菌数

群	動物 No.	ぞうき		
		肺	肝	脾
K-a	16	0	0	5
	17	0	0	30
	18	0	0	19
	19	7	0	19
	20	0	16	11
S-a	41	0	0	3
	42	0	0	0
	43	0	0	0
	44	0	0	19
	45	0	0	6
K-b	31	0	7	450
	32	6	0	80
	33	0	3	31
	34	6	11	24
	35	0	1	15
S-b	56	0	0	560
	57	0	0	34
	58	0	0	200
	59	0	0	120
	60	0	0	90

註: 組織10mg中の生菌単位数を示す。

応用の段階に試験的に移しうる物質と考えられる。ストレプトマイシン, フラジオマイシン (fradiomycin), バイオマイシン (viomycin) がその例であつたように, 水溶性, 塩基性で毒性のない抗生物質は, 結核菌にも希望がかけうるという一つの想定が, 梅沢等の抗生物質探究のよりどころであつたと云われる。結核菌の菌体表面に存在すると考えられるリポイドに対する親和性を考慮しての, 水不溶, 有機溶媒可溶の抗生物質を目標とするやり方を放棄した点が注目される。

こゝに報告した私達のモルモットでの本実験によつてカナマイシンはその使用方法によつては, ストレプトマイシンに充分匹敵する効果をもつことが証明されたが, 試験内実験ではストレプトマイシンやPASに耐性の変異株にも作用することが示されている¹⁾。また, その抗菌スペクトル²⁾や紫外線吸収スペクトル³⁾によつて, その構造中にイソニアジッドを含みぬことも明である。また水に対する溶解度からTBIやストレプトパリンとも明にことなり, 少くとも現在, カナマイシンに匹敵する効力があつて, これと類似する性質の物質はなさそう

である。

カナマイシンは、ごく最近、結晶の形で得られたと聞くし、大量生産の段階に入るならば、臨的にその実用的価値について、最後の研究段階に入り得ると考えられる。また少くとも私達のこれまでの経験によれば、人間に対して毒性のないかぎり、相当の効果を期待できるものと信ずる。また逆に、この期待が裏ぎられた場合、私達の抗結核剤探究方法そのものに一つの限界、または欠陥が指摘されることになるのではなからうか。

結 論

モルモットの重症実験結核症に対して、カナマイシン 1 日量10mgを以て処置した。投与開始を感染 1 日後、または 2 週間後に行つたがいずれも、極めて顕著な効果を示し、ストレプトマイシンに匹敵しうる新抗生物質と断定された。

カナマイシンを御供与下さつた 予研抗生物質部部长梅沢博士に深謝し、実験実施に当つて援助された丸山、勝山の諸君に感謝致します。

文 献

- 1) Yanagisawa, K. and Sato, N.: Studies on kanamycin, a new antibiotic against tubercle bacilli. I. Effect on virulent tubercle bacilli in vitro and in mice. J. Antibiotics, Ser. A, (in press).
- 2) 柳沢謙, 金井興美, 立花暉夫: Kanamycin に関する研究, 第 2 報, モルモットの実験的結核症に及ぼすカナマイシンの効果 (予備実験), 日本細菌学雑誌, 12: 919, 1957.
- 3) Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Kondo, S., Yagishita, K., Utahara, K., Osato, T., Takeuchi, T. and Okami, Y.: Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. J. Antibiotics, Ser. A., (in press).
- 4) Yanagisawa, K., Sato, N., Tachibana, T., and Kanai, K.: A new antibiotic against tubercle bacilli (Homomycin). Jap. J. M. Sci. & Biol., 9, 129—132, 1956.
- 5) 未発表.
- 6) 宮本泰, 三浦馨, 柳沢謙: Reticulin のモルモットに於ける実験的結核症に対する治療効果, 殊に Streptomyces との比較について J. Antibiotics, Ser. B., 7, 246—250, 1954.
- 7) Imamura, A., Hori, M., Nakazawa, K., Shibata, M., Tatsuoka, S., and Miyake, A.: A new species of streptomyces producing dihydrostreptomycin. Proc. of Japan Acad., 32, 648—653, 1956.
- 8) Takeuchi, T., Hikiji, T., Nitta, K. Yamazaki, S., Abe, S., Takayama, H. and Umezawa, H.: Biological studies on kanamycin. J. Antibiotics, Ser. A., 10, 107—114, 1957.