

百日咳の実験治療学的研究

第 4 報

各種抗生物質並びに 2~3 化合物の百日咳菌

経鼻感染マウスに対する効果について

金沢大学医学部日置内科教室(主任 日置教授)

伊 澤 健 吉

Kenkichi Izawa

(昭和27年5月4日受附)

緒 言

著者は本研究第3報¹⁾において、著者達の教室で分離せる放線菌 No. 21 株の産生物質が百日咳菌に対し強力な試験管内発育阻止作用並びに殺菌作用を有することを見出すと共に、その作用力を Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin, Colistin 等の既知抗生物質や 2~3 の新化合物のそれと比較したが、本報では No. 21 産生物質が百日咳菌経鼻感染マウスに対し如何なる治療効果があるか、又前記の既知抗生物質や新化合物との比較を百日咳菌経鼻感染マウスにつき行えば如何なる結果となるかということの主たる研究の目標として実験を進めた。

抑々百日咳菌の動物実験に際して、感染動物の選択及びその感染方法については従来種々述べられている所である。即ち動物には猿、犬、家兎、マウスが用いられ、感染方法として鼻腔又は咽頭内塗布法、噴霧法、気管内注入法、経

鼻感染法、脳内接種法等が用いられている。

例えば Fraenkel²⁾, Klimenko³⁾, 稻葉⁴⁾, Sauer 及び Hambrecht 等^{5), 6)} は実験的猿百日咳を、Klimenko³⁾, 中島⁷⁾, 稻葉^{8), 9)}, 池野¹⁰⁾, 徳永¹¹⁾ 等は実験的犬百日咳を、又 Sprunt 及び Martin, Williams, Mc Derman^{12), 13)} 等は実験的家兎百日咳を起させており、更に又 Burnet & Timmins¹⁴⁾, 染谷¹⁵⁾, Bradford 等^{16), 17), 18)} は経鼻感染による実験的マウス百日咳を起させ、Hobby²⁰⁾, 桑島²¹⁾ 等は脳内接種による百日咳菌感染試験を行つている。

著者は以上の諸法の中より、数多く入手し易い動物で且つ百日咳の人間における自然感染に近い感染方法を用いたいという観点から、Bradford にならつて幼若マウスによる百日咳菌経鼻感染法を用いて本報の実験を行うことにした。

実験材料並びに実験方法

- 1) 実験動物：7~10g の幼若健康マウスを使用した。
- 2) 菌株：北陸血清製造所より分譲された L₄ 株第1相菌を使用した。
- 3) 菌液調製：菌液調整前に予め菌力測定をマウ

ス脳内接種法により行い、LD₅₀ : <10,000 なることを菌液調製の条件とした。元來百日咳菌は培地継代培養による菌力低下が甚だしいため、常にマウス脳内通過による菌力保持に苦心した。

Bordet-Gengou 培地に 37°C, 48時間培養せる上記

懸株をマウス脳内通過後更に Bordet-Gengou 培地 2 代継代せしめたものを 1% 「ペプトン水に、1.0cc 中 10 billion の割に浮遊させた。

4) 供試物質： 供試物質は次の 8 種類である。

1. No. 21 製剤
2. Streptomycin
3. Chloromycetin (Chloramphenicol)
4. Aureomycin
5. Terramycin
6. Colistin
7. d-Usninsäure (K-Salz)
8. Guanofuracin (HCl-Salz)

5) 薬物投与方法： 薬物投与はすべて皮下注射法によつた。薬物投与第 1 回は菌接種 2 時間後に行い、2 回以上の投与を行う場合は以後第 1 回と同量を 1 日 1 回、6 日間、24 時間間隔で投与した。

供試物質中、水溶性の No. 21 製剤、Streptomycin、Colistin、Guanofuracin は滅菌生理的食塩水に溶解し、水に難溶な Chloromycetin は 75% 「プロピレングリコール」に、Aureomycin と Terramycin は N/100 HCl 液に夫々溶解せしめた。(但し Terramycin は本法によるも完全溶解であり得なかつた。)

なお各供試物質とも本実験における使用量ではマウスに対し認むべき毒性はなかつた。

6) 感染方法： 感染方法は Bradford & Day¹⁶⁾、¹⁷⁾、¹⁸⁾ の方法に倣い、先ず「エーテル」と「クロロホルム」を 2:1 の割に混合した液に浸した綿花を「ガラス容器中に置き、この中で幼若マウスを麻酔する。歩行停止し、呼吸促進且つ規則的になつた時、これを取り出し、その後頭部を左の示指、拇指頭間に支えて鼻腔を垂直に保ち、速やかに 1/4 針によつて百日咳菌浮遊液 0.05cc (菌量 500 million) を外鼻腔に滴下した。

同時に前記の菌浮遊液の 10 倍希釈各段階液を作り、夫々を用いて同様感染方法を行つて、菌浮遊原液の接種量が LD₅₀ : 5million の 100 倍なることを検した。

7) 効果判定： 動物は感染後 3 週間観察し、生存数を以て効果判定の規準とした。斃死したものは、その無菌的に取り出した肺臓細片を Bordet-Gengou 培地に塗抹培養して感染死なることを確かめた。

而してこの斃死したマウスの肺の剖検所見は Burnet & Timmins¹⁴⁾、染谷¹⁵⁾ の記述の如く、充血、浮腫共に著明で暗赤色を呈し、病理組織学的には Fibrin 析出、単核細胞浸潤を伴う急性気管枝肺炎像を示しており、その培養においては時に混合感染の認められたものもあつたが、大多数において百日咳菌の純培養を得た。又下記治療により感染後 3 週間生存し続けたものは、これを撲殺してその肺臓より菌培養を行つたが何れも菌を証明出来なかつた。

実 験 成 績

〔1〕 No. 21 製剤に関する実験： (第 1 表)

No. 21 製剤をマウス 10g につき 1.0mg の割に唯 1 回投与せる実験と、マウス 10g につき 1 回 0.3mg 宛 24 時間毎に 6 回投与せる実験を行つた。No. 21 製剤の毒性が既報¹⁾ の通りであるので、前記の投与量を超えることは出来なかつた。

成績は第 1 表に見る如く、対照動物が第 5 ~ 7 日目に全頭死亡したのに対し、No. 21 製剤 1.0mg 1 回投与のものは第 5 日目と第 6 日目に各々 1 頭宛死亡したが以後 2 頭は生存し続け、又 0.3mg 宛 6 回投与のものも第 4 日目と第 5 日目に各々 1 頭宛死亡しただけで残りの 2 頭は生き残つた。

第 1 表

| 薬 剤 | 一投与 回量 mg/10g | 注 回 射 数 | 使 用 マ ウ ス 数 | 経過日数別生存マウス数 | | | | | | | | | | | 生 存 率 (%) |
|------------|---------------------|------------|-------------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|------|-------|---|---|--------------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8-14 | 15-20 | | | |
| No. 21 製 剤 | 1.0 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 50 |
| No. 21 製 剤 | 0.3 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 50 |
| 対 照 | — | — | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

〔2〕各種抗生物質及び2~3化合物に関する実験：(第2表)

本実験は供試物質中 No. 21 製剤を除いた7種類の物質について行つた。投与量は比較的大量を用い、就中 Colistin, Usninsäure, Guanofuracin は安全量の最高に近いものである。

成績は Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin を夫々投与したものはすべて感染死より免がれ、生存率 100%であつたが、Colistin, Guanofuracin を夫々投与したものは両者共に4頭中1頭生残つたのみであり、Usninsäure 投与群は全頭死亡した。

第 2 表

| 薬 剂 | 一投与 回量 mg/10g | 注 回 射 数 | 使 用 マ ウス 数 | 経過日数別生存マウス数 | | | | | | | | | | 生 存 率 (%) | | |
|---------------|---------------------|------------|---------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|------|-------|---|--------------------|---|-----|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8-14 | 15-21 | | | | |
| Streptomycin | 1.0 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 100 |
| Chloromycetin | 1.0 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 100 |
| Aureomycin | 1.0 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 100 |
| Terramycin | 1.0 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 100 |
| Colistin | 1.0 | 6 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 25 |
| d-Usninsäure | 0.2 | 6 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Guanofuracin | 0.3 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 25 |
| 対 照 | ∖ | ∖ | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

〔3〕Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin の効力比較に関する実験：(第3表)

本実験では〔2〕実験において生存率 100%を示した Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin の4抗生物質の効力を比較するため、投与量を減じて検討した。即ち4種類共1回投与量を 0.5mg 宛24時間毎6回投与

した所、Chloromycetin, Aureomycin の2種が共に4頭中1頭死亡して生存率 75%を示し、Streptomycin が4頭中2頭死亡して50%の生存率を示したのに対し、Terramycin のみが全頭生存して 100%の生存率を示して、〔2〕実験における投与量の半量を与えたのに拘わらず、なお生存率においては〔2〕実験の Terramycin の成績と等しく 100%を示した。

第 3 表

| 薬 剂 | 一投与 回量 mg/10g | 注 回 射 数 | 使 用 マ ウス 数 | 経過日数別生存マウス数 | | | | | | | | | | 生 存 率 (%) | | |
|---------------|---------------------|------------|---------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|------|-------|---|--------------------|---|-----|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8-14 | 15-21 | | | | |
| Streptomycin | 0.5 | 6 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 50 |
| Chloromycetin | 0.5 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 75 |
| Aureomycin | 0.5 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 75 |
| Terramycin | 0.5 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 100 |
| 対 照 | ∖ | ∖ | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

〔4〕更に Terramycin の少量投与による効果に関する実験：(第4表)

〔3〕実験において Terramycin のみが他の3抗生物質より強力で、1回投与量を 0.5mg

に減じてなお 100%の生存率を示したので、更に投与量を減じて Terramycin の治療効果を追求して見た。その結果は第4表の如く、1回投与量を 0.1mg とした群は4頭中1頭生残

り、生存率25%、0.3mg とした群は4頭中2頭が生残つて生存率50%であつた。

第 4 表

| 薬 劑 | 一投与 回量 mg/10g | 注 回 射 数 | 使 用 マ ウス 数 | 経過日数別生存マウス数 | | | | | | | 生 存 率(%) | | |
|------------|---------------------|------------|---------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|----------------|------|-------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | 8-14 | 15-21 |
| Terramycin | 0.1 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 25 |
| 〃 | 0.3 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 50 |
| 対 照 | ∖ | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

総括並びに考按

優秀な抗生物質の相次いで出現する最近の趨勢下にあつて、著者も百日咳菌に対し有効に作用するものとして放線菌 No. 21 株産生物質を見出し、百日咳菌に対する試験管内作用力においては他の抗生物質に優るとも劣らぬものと思われたので、本報ではその作用力を動物実験において検索すると共に、併せて他の抗生物質の成績をも検討して No. 21 製剤の効力判定の資に供した。

その結果、No. 21 製剤の投与可能の最大量を1回投与では10g マウスにつき1.0mgを、分割投与では10g マウスにつき0.3mg宛6回与えたが、何れの場合も4頭中2頭を救い、生存率50%であつた。而してこの分割投与方法によるNo. 21 製剤の効力は同投与方法の Terramycin の成績(第4表)に匹敵した。もし No. 21 製剤の毒性がより少いか或いはこれを何らかの方法でより減少せしめ得て、本実験より多量に与え得たならば、より大なる効力をもち得るのではないかと、残念に思つた次第である。これに反し Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin は何れもより多量に用い得る結果、1.0mg 宛6回投与で100%の生存率を得、就中 Terramycin は0.5mg 宛6回投与で100%の生存率を得た。

以上、本報の成績を総括するに、No. 21 製剤はその毒性のため他の抗生物質と同量を用い

得ないが、その投与可能の最大量を投与した成績は Terramycin の同量を投与した成績と等しく、又他の供試物質中では Terramycin が最強の効力を示し、次いで Chloromycetin と Aureomycin が同効力を有し、次に Streptomycin が強力な作用を發揮した。

今、Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin の動物実験成績を文献によつて考察するに、既に1945年 Bradford & Day¹⁷⁾, Hegarty & Thiele¹⁸⁾等が Streptomycin が試験管内及び動物実験において有効なことを記し、更に1949年には同じく Bradford & Day¹⁸⁾が Aureomycin の効力を検索して Streptomycin のそれと比較し、百日咳菌経鼻感染マウスに対し Aureomycin は毎日1回5日間0.1~1.0mg/10gを、Streptomycin は毎日1回5日間0.5~1.0gm/10gを与えればマウスは生存すると述べている。又1949年 Hobby²⁰⁾等も Terramycin につきマウス脳内接種法による動物実験において有効なことを述べている。

以上、動物実験において効力を判定せる文献を余り見ることが出来ないが、著者の実験成績及びこれらの文献に見る成績よりして、前記抗生物質が百日咳化学療法剤として或る程度希望を充し得るであろうことは認めてよいのではなからうか。しかし最後の決定は実地臨床成績の集成に待つべきは論を俟たない。

結 論

1. 著者は本実験において No. 21 製剤, Streptomycin, Chloromycetin (Chloramphenicol), Aureomycin, Terramycin, Colistin, d-Usninsäure (K-Salz), Guanofuracin (HCl-Salz) の百日咳菌経鼻感染マウスに対する作用を検した。

2. No. 21 製剤はその毒性のため 100%の生存率を示すに足るだけの薬量を与え得ず, 10g マウスにつき 1.0mg 1回投与法と, 10.3mg 宛 6回投与法により 50%生存率を示し得た。

3. No. 21 製剤の 10g マウスにつき 0.3mg 宛 6回投与による効力は, Terramycin の同量,

同投与法による効力と等しかつた。

4. No. 21 製剤を除く 7 供試物質中, その効力の強力なものより順に列挙すれば, (1) Terramycin, (2) Chloromycetin 並びに Aureomycin, (3) Streptomycin であつたが, 結局本実験を通じ, Terramycin に最も期待を置くべき結果を得た。

欄筆に当り御懇篤な御指導, 御校閲を賜つた恩師日置教授に深甚の謝意を表し, 併せて実験に御協力下さつた各位に深謝致します。

文 献

1) 伊沢 : 十全医学会雑誌, 56, 1, 1954. 2) Fraenkel, : Münch. med. Wschr., II, 1683, 1908. 3) Klimenko, : Centr. Bact., 48, 64, 1909. 4) 稲葉 : Z. f. Kinderheilk., B. 4, 252, 1912. 5) Sauer & Hambrecht, : Am. J. Dis. Child., 37, 732, 1929. 6) Sauer & Hambrecht, : Arch. Path., B. 8. 944, 1929. 7) 中島 : 伊藤教授退職記念誌, 同門会発行. 8) 稲葉 : 満洲医学, 19, 4, 585, 1933. 9) 稲葉 : 兒科誌, 400, 1951, 1933. 10) 池野 : 兒科誌, 407, 486, 1934. 11) 徳永 : 兒科誌, 422, 1030, 1935. 12) Sprunt, Martin & Williams, : Mc Dermau, J. exp.

Med., 62, 73 & 449, 1935. 13) Sprunt, Martin, Williams & Mc Derman, : J. exp. Med., 67, 308, 1938. 14) Burnet & Timmins : Brit. J. Exp. Path., 18, 1937. 15) 染谷 : 細菌学雑誌, 517, 155, 1939. 16) Bradford, : Yale. J. Biol. & Med., 16, 435, 1944. 17) Bradford, : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 60, 324, 1945. 18) Bradford, : J. Ped., 35, 1949. 19) Hegarty & Thiele, : J. Bact., 50, 651, 1945. 20) Hobby, : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 73, 503, 1950. 21) 桑島 : 実験治療, 252, 17, 1951.