

実験的マイコプラズマ感染マウスにおける Methylglyoxal bis-thiosemicarbazones の肺炎抑制効果

福 安 嗣 昭

麻布大学獣医学部家畜衛生学第Ⅱ*

(昭和 62 年 9 月 17 日受付)

試験管内で強い抗マイコプラズマ活性を有する methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) の生体内でのマイコプラズマに対する有効性を明らかにするために、実験的マイコプラズマ感染マウスを用いてこれら化合物の肺炎の抑制効果について試験した。

Mycoplasma pulmonis m-53 の培養菌液 50 μ l (10^5 CCU/50 μ l/mouse) を経鼻感染したマウスに methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) を 12 時間ごとに 5 回、1 回 2 mg/マウスの経口投与と 50 ppm 添加飼料の 3 週間給与を併用投与した。

その結果、マイコプラズマ感染対照群、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) 投与群および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) 投与群の肺炎の発症率は、それぞれ 100%、90% および 70% であった。また、肺全体に対する肺炎病巣の割合を示したスコアは、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) 投与群および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) 投与群では、それぞれ 23.8 ± 16.1 および 26.1 ± 24.6 であり、マイコプラズマ感染対照群の 52.8 ± 19.9 と比べ、いずれも統計的に有意差があり、これら化合物はマウスの実験的マイコプラズマ性肺炎の発症を抑制することが認められた。しかし、マウスの血中 CF 抗体価および肺、気管などの呼吸器系器官からのマイコプラズマの分離率は、これら化合物の投与においてもマイコプラズマ感染対照群と変らなかった。

Key words : Methylglyoxal bis-thiosemicarbazones, マイコプラズマ性肺炎, マウス

これまでに α -ketoaldehyde bis-thiosemicarbazone (以下 bis-TS と略) 類は、マウスのザルコーマ 180¹⁾ およびラットの癌肉腫やリンパ肉腫²⁾ などに対する抗腫瘍活性やトリコモナスおよびコクシジウムに対する抗原虫活性³⁾ を示すことが知られている。さらに、 α -ketoaldehyde bis-TS 類化合物が試験管内で強い抗マイコプラズマ活性を示すこと、特に methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) は、強い抗マイコプラズマ活性を有することが明らかにされている⁴⁾。

今回、これら化合物の生体内における抗マイコプラズマ活性を明らかにするために、実験的マイコプラズマ感染マウスを用い methylglyoxal bis(4-methyl-TS) と methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) のマイコプラズマ性肺炎の抑制効果について検討した。

I. 材料と方法

供試化合物：Methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) は、北里大学衛生学部有機化学教室西村民男博士および徳 広茂博士により合成され、分与されたものを用いた。

供試菌株：*Mycoplasma pulmonis* m-53 は、東京大学農学部家畜微生物学教室跡部ヒサエ博士より分与されたものを用いた。マイコプラズマ感染後 3 週間を試験期間とした。

使用培地：*M. pulmonis* m-53 の培養には、CHANOCK ら⁵⁾の液体培地とそれに Bacto-agar を 1.5% 添加した寒天培地を用いた。

マウス：ICR 系 SPF 雄マウス (5 週齢, 30 匹平均体重 26.5 ± 0.52 g) は、静岡県実験動物組合から購入し、各試験群 10 匹のマウスを供試した。各試験群マウスは試験期間中ポリカーボネート製ケージで飼育し、マウス用飼料 CF-2 (日本クレア(株)) を給与した。

化合物の投与：各化合物は 5% アラビアゴム溶液を用いて 2 mg/0.5 ml になるように調整した。この化合物溶液を胃ゾンデを用いてマイコプラズマ感染前日より約 12 時間ごとに 5 回、1 回 0.5 ml を各マウスに投与した。さらに、マウス用飼料中に各化合物をそれぞれ 50 ppm 添加して、各マウスに試験期間中自由摂取させた。

マイコプラズマの感染と分離：ペントバルビタールに

* 相模原市淵野辺 1-17-71

より麻酔したマウスの鼻内に、*M. pulmonis* m-53 の2日間培養菌液 50 μ l (10^8 CCU/50 μ l/mouse, 10^7 CFU/ml)⁶⁾ をシリンジディスペンサーで滴下接種した⁷⁾。また、マウス呼吸器系臓器からのマイコプラズマの分離は、マイコプラズマ感染3週後に、ペントバルビタールにより麻酔した後、各マウスの頸部血管を眼科用剪刀で切断し、放血死させ、鼻腔、気管および肺より滅菌綿棒で採材し、直接寒天平板培地(直径9 cm)の全面に塗布し、37°C 10日間加温デシケータ内で培養した。

これら寒天培地上のマイコプラズマコロニーを顕微鏡下で数計し、コロニー数50以下を+1, 51~200を+2, 201~400を+3および401以上を+4とし、各器官からのマイコプラズマの分離程度を4段階に区分した。

肺炎病変の判定:マイコプラズマ性肺炎病変は、WHITTLESTONE ら⁸⁾の方法に準拠して判定した。すなわち、肺の前葉、中間葉および副葉をそれぞれ10ポイント、後葉を20ポイントおよび左葉を50ポイントとして、各肺葉ごとに肉眼的な病変の割合を算出した。

血清学的判定:血清中のマイコプラズマ補体結合抗体価(以下CF抗体価と略)はマイクロタイター法により測定した⁹⁾。供試した抗原は*M. pulmonis* m-53の4日間液体培養菌液1,000 mlを20,000 gで30分間遠心後、PBS(pH 7.2)で3回洗浄し、この沈渣を20 mlのPBSで懸濁して作製し、使用時まで-20°Cで保存した。さらに、この抗原は使用前に超音波処理(10 kc, 5分間)して試験に用いた¹⁰⁾。

II. 成 績

M. pulmonis m-53の感染マウスを用いて肺炎病巣の形成、呼吸器系器官からのマイコプラズマの分離、血中CF抗体価などを指標として、マイコプラズマ性肺炎に対するmethylglyoxal bis(4-methyl-TS)およびmethylglyoxal bis(4-ethyl-TS)の有効性について試験した。その結果をTable 1に示した。

マイコプラズマ感染対照群ではマウス10例中10例とも肺炎病巣が形成された。これら肺炎病巣は最小スコアー24から最大スコアー80に分布しており平均52.8 \pm 19.9であった。これに対しmethylglyoxal bis(4-methyl-TS)投与群では10例中1例は肉眼的に肺炎病巣が見が認められなかった。しかし、9例には肺炎病巣が形成され、その最大スコアーは50であった。この投与群の平均スコアーは23.8 \pm 16.1と低く、マイコプラズマ感染対照群との間で平均スコアーをt検定した結果、危険率1%で有意差があり、実験的マイコプラズマ感染マウスにおけるmethylglyoxal bis(4-methyl-TS)の投与は肺炎の病巣形成を抑制した。

一方、methylglyoxal bis(4-ethyl-TS)投与群では肉眼的に正常な3例を除いて、他の7例では肺炎病巣が認められた。その最大スコアーは77であり、この投与群の平均スコアーは26.1 \pm 24.6で、methylglyoxal bis(4-methyl-TS)群よりも若干高い傾向にあった。また、methylglyoxal bis(4-ethyl-TS)投与群もマイコプラズマ感染対照群との間で肺炎病巣の平均スコアーをt検定した結果、危険率5%で有意差があり、この化合物も肺炎の病巣形成を抑制した。

Table 1. Effect of methylglyoxal bis(4-methyl-thiosemicarbazone) and methylglyoxal bis(4-ethyl-thiosemicarbazone) on mice experimentally infected with *Mycoplasma pulmonis* m-53

Treatment	No. of gross lung lesion ^{a)}	Mean lesion score \pm SD ^{b)}	Mycoplasma isolation			Mean CF titer	Average body weight ^{c)} (g \pm SD)
			nasal cavity	trachea	lung		
Infected control	10/10	52.8 \pm 19.9	10/10(+1~+3) ^{d)}	10/10(+1~+4)	10/10(+3~+4)	2 ^{d,9}	22.3 \pm 0.96
Bis(4-methyl-TS)	9/10	23.8 \pm 16.1 ^{***)}	10/10(+1~+4)	10/10(+1~+4)	10/10(+4)	2 ^{d,4}	31.4 \pm 2.47
Bis(4-ethyl-TS)	7/10	26.1 \pm 24.6 [*]	10/10(+1~+3)	10/10(+2~+4)	10/10(+3~+4)	2 ^{d,3}	26.0 \pm 2.05

Note: a) Ten mice per group. Number of gross lung lesions/number examined.

b) Total lesion score of each group/number examined.

c) Body weights of mice were measured at the end of the experiment. (Average initial body weight was 26.5 \pm 0.52 g at 5 weeks).

d) Positive number/number examined. Number of mycoplasma organisms: +1, under 50 colonies; +2, 51~200; +3, 201~400; +4, more than 400.

e) There was a significant difference at the level of 1%(**) or 5%(*) between the infected control group and each compound-treated group by t-test.

さらに、各試験群におけるマウスの呼吸器系器官からのマイコプラズマの分離状況は、いずれの試験群共に全マウスから分離され、各試験群間に差は認められなかった。呼吸器系各部位ごとの分離コロニー数は、肺で最も高率に分離され、次いで、気管および鼻腔であった。このようなマイコプラズマの分離率および分離菌数は各試験群においてほぼ同様であった。

また、各試験群のマウス血中 CF 抗体価を見ると、マイコプラズマ感染対照群は $2^4 \sim 2^6$ 倍 (平均 $2^{4.9}$ 倍)、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) 投与群は $2^3 \sim 2^6$ 倍 (平均 $2^{4.4}$ 倍) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) 投与群は $2^4 \sim 2^5$ 倍 (平均 $2^{4.3}$ 倍) であり、各試験群間に大差は認められなかった。さらに、試験終了時の平均体重は、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) 投与群 31.4 ± 2.47 g、methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) 投与群 26.0 ± 2.05 g およびマイコプラズマ感染対照群 22.3 ± 0.95 g であり、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) 投与群では試験開始時より 4.9 g の体重増加が認められたが、methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) 投与群およびマイコプラズマ感染対照群では、いずれも減少した。

以上のように、マウスの実験的マイコプラズマ性肺炎における methylglyoxal bis(4-methyl-TS) と methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) の肺炎の抑制効果について検討した結果、これら化合物はともにマイコプラズマ感染マウスの鼻腔、器官および肺からマイコプラズマを消失させることができなかつたが、マイコプラズマによる肺炎病巣の形成を有意に抑制することが明らかになった。

III. 考 察

マウスのマイコプラズマ性肺炎に関する研究は、これまでに多くの報告がある^{7,10-15}。しかし、これらはいずれもマイコプラズマの起病性に関するもので、感染治療試験に関するものは少ない。

そこで、試験管内で強い抗マイコプラズマ活性が明らかにされている化合物⁹、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) について、実験的マイコプラズマ性肺炎マウスにおけるこれら化合物の肺炎の抑制効果を検討した。

実験的マイコプラズマ感染マウスに対し、methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) をそれぞれ経口投与と飼料添加投与を併用することによりマイコプラズマによる肺炎病巣の形成を著しく抑制した。特に、methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) および methylglyoxal bis(4-methyl-TS) を投与することにより、それぞれ 10 例中 3 例および 1 例のマウスは肺炎病巣を認めなかつた。しかし、これら肉眼的な肺炎病

巣が認められなかつたマウス 4 例の呼吸器系の各器官からマイコプラズマが分離され、その分離状況は肺炎病巣が認められたマウスと変らなかつた。また、これら化合物投与群の他のマウスのマイコプラズマの分離状況もマイコプラズマ感染対照群のそれとほぼ同様であった。このようなことはマイコプラズマ死菌ワクチンを接種したマウスにマイコプラズマを感染した場合にも認められている⁷。すなわちマイコプラズマを 10^{10-9} CFU 接種したマウスにワクチンを接種することにより肺炎病巣の形成が抑制されるが、呼吸器系器官からのマイコプラズマの分離は、マイコプラズマ感染ワクチン無接種マウスと変らないことが明らかにされている。マウスにおけるマイコプラズマによる肺炎病巣の形成は、その接種菌量が 10^4 CFU 以下では認められないこと、さらに肺炎病巣の形成にマイコプラズマの代謝産物などが関与していることが明らかにされている¹⁰。また、試験に用いたこれら化合物をマウスに 100 mg/kg 経口投与した場合、いずれも投与 3 時間後にマイコプラズマに対する MIC の約 10 倍量に相当する濃度が血中に検出される¹⁷ことから、これら化合物投与群マウスの肺にも分布しているものと推察される。しかし、これら化合物投与群マウスの肺からのマイコプラズマの分離状況が、マイコプラズマ感染対照群マウスのそれと同様であるにもかかわらず肺炎病巣の形成が抑制されていたことは、これら化合物が肺においてマイコプラズマの活性特に起病性にかかわる代謝産物の生成などに影響しているものと推察される。

さらに、各試験群マウスの血中 CF 抗体価にも差が認められなかつた。実験的マイコプラズマの感染マウスやラットにおいて肉眼的な肺炎病巣と血中各種抗体価とは相関することが明らかにされている^{10,12,14}。しかし、これらはいずれも抗マイコプラズマ物質を投与しない場合であり、抗マイコプラズマ物質を投与した場合の肺炎病巣と各種抗体との関係は明らかでない。今回、マイコプラズマに強い活性を有する methylglyoxal bis(4-methyl-TS) および methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) を投与したマウスでは、肺炎病巣が明らかに抑制されているにもかかわらず、その血中 CF 抗体価はマイコプラズマ感染対照群のそれとほぼ同様な値を示した。これは供試した化合物は経口的に投与した場合、ある程度の濃度が肺に分布し、肺炎病巣の形成を抑制するが、呼吸器系器官からのマイコプラズマの分離がマイコプラズマ感染対照群マウスとほぼ同様であったためと考えられる。これら化合物の血中濃度や各呼吸器系器官の濃度、特に抗マイコプラズマ活性を発現するための化合物濃度あるいはその持続時間が大きく関与しているものと推察される。

これら化合物の動物生体内での吸収、排泄について

は、経口投与の場合 methylglyoxal bis(4-methyl-TS) は、methylglyoxal bis(4-ethyl-TS) よりも腸管吸収されにくい、血中からの消失は遅いことが明らかにされている¹⁷⁾。しかし、生体に投与された化合物の肺などの各呼吸器部位への分布が明らかでないので、今後は肺や気管などへの化合物の分布を明らかにすることが必要と考えられる。

(謝辞) 今回の試験を実施するにあたり、化合物を合成し提供して頂いた北里大学衛生学部有機化学教室西村民男博士および徳 広茂博士ならびにマイコプラズマを分与頂いた東京大学農学部家畜微生物学教室跡部ヒサエ博士に感謝する。

文 献

- 1) FRENCH, F A and FREEDLANDER B L: Carcinostatic action of polycarbonyl compounds and their derivatives. *Cancer Res* 18: 1290~1300, 1958
- 2) PETERING, H G BUSKIRK H H and UNDERWOOD G E: The antitumor activity of 2-keto-3-ethoxybutylaldehyde bis (thiosemicarbazone) and related compounds. *Cancer Res* 24: 367~372, 1964
- 3) BARRETT, P A BEVERIDGE E BRADLEY P L BROWN C G D BUSHBY S R M CLARKE M L NEAL R A SMITH R and WILDE J K H: Biological activities of some α -dithiosemicarbazones. *Nature (Lond.)* 206: 1340~1341, 1965
- 4) 西村民男, 徳 広茂, 福安嗣昭, 遊佐 寧, 関沢泰治: 抗 *Mycoplasma* 化合物 (第2報) Bis-thiosemicarbazone 類の抗 *Mycoplasma* 活性。薬学雑誌 97: 671~675, 1977
- 5) CHANOCK, R M HAYFLICK L and BARILE M F: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc Natl Acad Sci* 48: 41~49, 1962
- 6) 本間守男, 本多光代, 石田名香雄: マウス気管支より分離したマイコプラズマ 第2報 液体培地を用いての終末価測定。日細学誌 28: 817~820, 1968
- 7) ATOBE, H and OGATA M: Protective effect of killed *Mycoplasma pulmonis* vaccine against experimental infection in mice. *Jpn J Vet Sci* 39: 39~46, 1977
- 8) WHITTLESTONE, P LEMCKE R M and OLDS R J: Respiratory disease in a colony of rats. II. Isolation of *Mycoplasma pulmonis* from the natural disease, and the experimental disease induced with a cloned culture of this organism. *J Hyg (Camb.)* 70: 387~407, 1972
- 9) TAYLOR-ROBINSON, D SOMERSON N L TURNER H C and CHANOCK R M: Serological relationships among human mycoplasma as shown by complement-fixation and gel diffusion. *J Bacteriol* 85: 1261~1273, 1963
- 10) ATOBE, H and OGATA M: Pneumonitis in mice inoculated with *Mycoplasma pulmonis*: Production of pulmonary lesions and presence of organisms and antibodies. *Jpn J Vet Sci* 36: 495~503, 1974
- 11) HARWICK, H J MAHONEY A D KALMANSON G J M and GUZE L B: Arthritis in mice due to infection with *Mycoplasma pulmonis*. II. Serological and histological features. *J Infect Dis* 133: 103~112, 1976
- 12) LEMCKE, R M: Association of PPLO infection and antibody response in rat and mice. *J Hyg (Camb.)* 59: 401~412, 1961
- 13) ORGANICK, A B and LUTSKY I I: *Mycoplasma pulmonis* infection in gnotobiotic and conventional mice: Aspects of pathogenicity including microbial enumeration and studies of tracheal involvement. *Lab Anim Sci* 26: 419~429, 1976
- 14) SAITO, M NAKAGAWA M KINOSHITA K and IMAIZUMI K: Etiological studies on natural outbreaks of pneumonia in mice. *Jpn J Vet Sci* 40: 283~290, 1978
- 15) SAITO, M NAKAGAWA M MUTO T and IMAIZUMI K: Strain difference of mouse in susceptibility to *Mycoplasma pulmonis* infection. *Jpn J Vet Sci* 40: 697~705, 1978
- 16) LINDSEY, J R and CASSELL G H: Experimental *Mycoplasma pulmonis* infection in pathogen-free mice. Models for studying mycoplasmosis of the respiratory tract. *Amer J Path* 72: 63~90, 1973
- 17) 福安嗣昭, 芦田浄美, 西村民男, 徳 広茂: Methylglyoxal bis-thiosemicarbazones の動物生体内における動態について。家畜衛生研究会報 24: 40, 1986

EFFECT OF METHYLGLYOXAL BIS-THIOSEMICARBAZONES ON EXPERIMENTAL MYCOPLASMAL PNEUMONIA OF MICE

TSUGUAKI FUKUYASU

Department of Animal Health II, School of Veterinary
Medicine, Azabu University
Fuchinobe 1-17-71, Sagamihara-shi, Kanagawa 229, Japan

Methylglyoxal bis (4-methyl-thiosemicarbazone) and methylglyoxal bis (4-ethyl-thiosemicarbazone) show strong antimycoplasmal activity *in vitro*. The therapeutic effect of these compounds on mycoplasmal pneumonia was investigated in mice with experimental pulmonary infection due to *Mycoplasma pulmonis* m-53. All the mice were nasally inoculated with 50 μ l of broth culture containing 10^8 CCU/0.05 ml of *M. pulmonis* m-53. The compounds were also administered according to the following two methods: One method was oral administration 5 times at 12-hourly intervals, at a dose of 2 mg/mouse, or in feed for 3 weeks.

The demonstrable frequency of pneumonic lesions in the 10 mice of each experimental group was 100% in the mycoplasma-infected control group, 90% in the methylglyoxal bis(4-methyl-TS) treated group, and 70% in the methylglyoxal bis (4-ethyl-TS) treated group. The mean lesion scores for pneumonia of the infected control, the methylglyoxal bis (4-methyl-TS) treated, and the methylglyoxal bis (4-ethyl-TS) treated groups were 52.8 ± 19.9 , 23.8 ± 16.1 and 26.1 ± 24.6 , respectively. A statistically significant difference was found between the infected control group and each compound-treated group. Mycoplasma from the respiratory organs was isolated in all mice of each experimental group. The mean titer of complement fixation in serum did not differ among the experimental groups.