

オルトアミノフェノール・メタンスルホン酸ソーダ(SOM) と他種抗結核薬との試験管内併用効果に関する研究

京都大学結核研究所内科学第1 (教授 内藤 益一)

津久間 俊次・田中 健一・雑賀宣二郎

(昭和39年7月31日受付)

緒 言

オルトアミノフェノール・メタンスルホン酸ソーダ(SOM)は、1959年、われわれと協同研究を行なっている京都薬科大学藤川研究室において合成され、われわれの研究室における検討の結果、オルトアミノフェノールに比して毒性が低くかつ水溶性で、臨床的に試みる価値ある抗結核薬としてとりあげられた物質である。

SOMの抗結核菌作用に関する基礎的実験の成績は、試験管内実験については田中¹⁾が、動物実験については久世²⁾が、それぞれ原著として詳細に報告する予定であるのでここではその概略を述べるにとどめるが、この物質は既存の抗結核薬と交叉耐性を有せず、その発育阻止最低濃度(MIC)は約5 γ /ml前後であり、殺菌作用も強力である。動物実験においては毒性が弱く、血中制菌力の持続時間においてCycloserineとの併用においてすぐれた成績を示し、家兎を対象とした治療実験においてもかなりの治療効果をおさめている。

以上の基礎的実験の中で、試験管内併用実験については著者等の一人田中¹⁾が、併用制菌効果、併用殺菌効果の2方面にわたり、交叉法ともよびうる方法にもとづいて検討を試みているのであるが、われわれはこれと別箇に発育阻止最低濃度および臨床投与量の比率で薬剤を組合わせ、試験管内併用制菌効果を検討したのでここにその実験成績を記載したいと思う。

実 験 材 料

1. 培 地

10%牛血清加キルヒナー培地を使用した。培地作成は成書に記載の通り行なった。

2. 菌 株

Tween-albumin培地に継代培養した研究室保存のH37Rv株を使用した。

3. 検 体

SOM, Dihydrostreptomycin (SM), Sodium p-Aminosalicylate (PAS), Isonicotinic acid hydrazide (INH), Kanamycin (KM), Cycloserine (CS), Tetracycline (TC), Pyrazinamide (PZA), Viomycin (VM), Ethionamide (TH), Sulfisoxazole (SI), の11検体を使用した。

この中でSM, KM, VMはヴァイアルを、CSはアンプルに滅菌封入されたものを蒸溜水で溶解し、INH, SIはそれぞれ2%ハイコチッド溶液、10%サルファジン溶液をそのまま用いた。またPAS, TC, PZAは秤量後70%エタノールで、THは秤量後プロピレングリコールで溶解して実験に供した。これらの溶解液を蒸溜水で適宜稀釈することにより、所定濃度の薬液を作成した。

実 験 方 法

1. MIC比によるSOMと他種抗結核薬との併用制菌効果の検討

10管1系列の小試験管3系列を試験管立に併列した。各系列について10%牛血清加キルヒナー培地をそれぞれ第1管3.2ml、第2管以下2ml分注した。ついで第1管へ1,000 γ /ml SOM溶液0.4ml、100 γ /ml SM溶液0.4mlを注加攪拌し、その2mlを第2管へ移し、以下同様にして順次倍数稀釈を行ない、第10管は薬液を含まない対照培地とした。この方法によれば

第1管薬剤濃度は SOM100 γ /ml, SM10 γ /ml であり、以下第9管迄その併用比は 10:1、即ち表1で示される標準 MIC³⁾ の比率になっている。

表1 抗結核薬の標準 MIC, 臨床投与量, 試験管内併用比

抗結核薬	標準 MIC	1日の臨床投与量	SOM: 他剤併用比	
			MIC 比	投与量比
SOM	6.25	2.0	—	—
SM	0.625	1.0	1:0.1	2:1
PAS	0.313	10.0	1:0.05	1:5
INH	0.0625	0.5	1:0.01	4:1
KM	1.25	1.0	1:0.2	2:1
CS	12.5	0.5	1:2	4:1
TC	12.5	1.0	1:2	2:1
PZA	250	2.0	1:40	1:1
VM	6.25	—	1:1	—
TH	0.625	0.5	1:0.1	4:1
SI	62.5	3.0	1:10	2:3

表2 第1管併用薬剤濃度

併用薬剤	MIC 比	臨床投与量比
	γ /ml— γ /ml	γ /ml— γ /ml
SOM-SM	100—10	20—10
SOM-PAS	200—10	2—10
SOM-INH	100—1	4—1
SOM-KM	100—20	20—10
SOM-CS	100—200	400—100
SOM-TC	100—200	200—100
SOM-PZA	100—4,000	100—100
SOM-VM	100—100	—
SOM-TH	100—10	40—10
SOM-SI	100—1,000	200—300

ついで Tween-albumin 培地に約2週間継代培養した H37Rv株培養液を同培地で希釈することにより、約5mg/ml, 0.5mg/ml, 0.05mg/ml の各菌液を作成した。この各菌液を 2ml 駒込ピペットで前述した1系列毎に各1滴ずつ滴下した。接種菌量は培地1mlあたりそれぞれ約0.1mg, 0.01mg, 0.001mg となる。

次に 2,000 γ /ml SOM 溶液および 100 γ /ml PAS 溶液を用い、同様の倍数希釈、菌接種を行なった。第1管濃度は SOM, PAS それぞれ 200 γ /ml, 10 γ /ml であり、標準 MIC の比になっている。

同様な方法により、その他の薬剤についても第1管濃度が表2で示される各薬剤の倍数希釈列を作成し、3段階の菌接種を行なった。

最後にこれら各薬剤の単独発育阻止作用を検討した。即ち10管1系列の小試験管の第1管に10%牛血清加キルヒナー培地3.6ml, 第2管以下各2mlを分注し、各薬剤毎に第1管へ 1,000 γ /ml SOM, 100 γ /ml SM, 100 γ /ml PAS, 10 γ /ml INH, 100 γ /ml KM, 1,000 γ /ml CS, 1,000 γ /ml TC, 20,000 γ /ml PZA, 1,000 γ /ml VM, 100 γ /ml TH, 10,000 γ /ml SI の各溶液を 0.4ml 加え倍数希釈を行ない、3段階の菌接種を行なうことにより、これら薬剤の単独 MIC の検索を行なった。

これらの各系列を 37°C の孵卵器内に保存、2週および4週後に成績の判定を行なった。

以上の実験を PAS, KM, CS, VM, PZA, SI については各2回, SM, INH, TC, TH については各3回くりかえし行なった。

2. 臨床投与量比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果の検討

10管1系列の小試験管3系列を用意し、各系列についてそれぞれ10%牛血清加キルヒナー培地を第1管に3.2ml, 第2管以下2ml分注した。ついで第1管へ200 γ /ml SOM 溶液 0.4ml, 100 γ /ml SM 溶液 0.4ml を注加攪拌し、その2mlを第2管へ移し、以下同様にして第9管迄倍数希釈を行ない、第10管は薬液を含まない対照培地とした。第1管の SOM 濃度は20 γ /ml, SM 濃度は 10 γ /ml で SOM の臨床投与量を1日2gとし、SMを1gとした場合の臨床投与量比となっており、以下第9管迄この割合で薬剤が含有されていることになる。この後各系列毎に 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml の菌接種を行ない、37°C の孵卵器内に保存、2週および4週後に成績の判定を行なった。

SM 以外の各薬剤についても第1管濃度が表2で示されるような倍数希釈を行ない、3段階の菌接種を行なって孵卵器内におさめた。最後に前項における同様の方法により、各薬剤の単独 MIC を検討した。

実験成績

1. MIC 比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果の検討

培養開始後2週間目における各薬剤の単独並びに SOM 併用時における MIC を表3より表5迄に示した。以下個々の併用例について実験成績にふれて行きたい。

SOM-SM

第1実験において接種菌量が0.1mg/mlの時、SOM 単独の MIC は 12.5 γ /ml, SM 単独の MIC

表 3 MIC 比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果 (実験 1)

発 育 阻 止 最 低 濃 度 (γ/ml)						
接種菌量	0.1mg/ml		0.01mg/ml		0.001mg/ml	
抗結核薬	併用薬	SOM	併用薬	SOM	併用薬	SOM
SOM		12.5		6.25		3.13
SM	2.5		1.25		0.625	
SM-SOM	1.25	12.5	0.625	6.25	0.313	3.13
PAS	0.313		0.156		0.078	
PAS-SOM	0.156	3.13	0.078	1.56	<0.039	0.78
INH	0.0313		0.0313		0.0313	
INH-SOM	0.0313	3.13	0.313	3.13	0.0313	3.13
KM	1.25		0.625		0.156	
KM-SOM	0.625	3.13	0.313	1.56	0.156	0.78
CS	6.25		6.25		6.25	
CS-SOM	6.25	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13
TC	6.25		3.13		1.56	
TC-SOM	1.56	0.78	1.56	0.78	<0.78	<0.39
PZA	1,000		125		62.5	
PZA-SOM	250	6.25	62.5	1.56	62.5	1.56
VM	12.5		12.5		6.25	
VM-SOM	12.5	12.5	6.25	6.25	3.13	3.13
TH	1.25		0.625		0.625	
TH-SOM	0.313	3.13	0.156	1.56	0.156	1.56
SI	125		31.3		15.6	
SI-SOM	62.5	6.25	15.6	1.56	15.6	1.56

は 2.5γ/ml である。しかるに SOM-SM 併用時において SM の MIC は単独 MIC の 1/2 である 1.25γ/ml となっているが、SOM の MIC は単独時と変わりなく、したがって併用効果が認められない。接種菌量が 0.01mg/ml, 0.001mg/ml の場合、および第 2 実験においても併用効果は認められない。

SOM-PAS

第 1 実験において接種菌量が 0.1mg/ml の時、SOM の単独 MIC は 12.5γ/ml, PAS の単独 MIC は 0.313γ/ml であるが、SOM-PAS 併用時の MIC は SOM が単独 MIC の 1/4 である 3.13 γ/ml, PAS が単独 MIC の 1/2 である 0.156γ/ml であり、したがって併用効果が認められることになる。同様にして接種菌量が 0.01mg/ml, 0.001 mg/ml の時、2 回の実験中 2 回共併用効果が示されている。

SOM-INH

0.1mg/ml 接種菌量時において 3 回の実験中

2 回, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時において 3 回中各 1 回併用効果を示した。

SOM-KM

0.1mg/ml, 0.01mg/ml 接種菌量時において 2 回の実験で 2 回共, 0.001mg/ml 接種菌量時において 2 回中 1 回併用効果を示した。

SOM-CS

0.1mg/ml 接種菌量時において 2 回中 1 回, 0.01mg/ml 接種菌量時において 2 回中 1 回併用効果が認められた。

SOM-TC

0.1mg/ml, 0.01mg/ml 接種菌量時において 3 回中 2 回, 0.001mg/ml 接種菌量時において 3 回中 3 回共併用効果を示している。

SOM-PZA

0.1mg/ml, 0.01mg/ml 接種菌量時において 2 回中 2 回共, 0.001mg/ml 接種菌量時において 2 回中 1 回併用効果を示している。

SOM-VM

表 4 MIC 比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果 (実験 2)

発 育 阻 止 最 低 濃 度 (γ/ml)						
接 種 菌 量	0.1mg/ml		0.01mg/ml		0.001mg/ml	
抗 結 核 薬	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM
SOM		25		12.5		6.25
SM	1.25		0.625		0.313	
SM- SOM	1.25	12.5	0.625	6.25	0.313	3.13
PAS	0.625		0.313		0.156	
PAS-SOM	0.625	12.5	0.156	3.13	0.078	1.56
INH	0.25		0.125		0.0625	
INH-SOM	0.0313	3.13	0.0313	3.13	0.0313	3.13
KM	1.25		0.625		0.313	
KM- SOM	0.313	1.56	0.313	1.56	0.156	0.78
CS	6.25		6.25		3.13	
CS- SOM	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56
TC	3.13		1.56		1.56	
TC- SOM	3.33	1.56	1.56	0.78	<0.78	<0.39
PZA	1,000		500		250	
PZA-SOM	125	3.13	125	3.13	62.5	1.56
VM	6.25		3.13		3.13	
VM- SOM	3.13	3.13	1.56	1.56	1.56	1.56
TH	1.25		0.625		0.625	
TH- SOM	0.625	6.25	0.625	6.25	0.625	6.25
SI	125		15.6		7.8	
SI- SOM	62.5	6.25	15.6	1.56	7.8	0.78

表 5 MIC 比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果 (実験 3)

発 育 阻 止 最 低 濃 度 (γ/ml)						
接 種 菌 量	0.1mg/ml		0.01mg/ml		0.001mg/ml	
抗 結 核 薬	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM
SOM		12.5		6.25		3.13
SM	2.5		2.5		1.25	
SM- SOM	5.0	5	2.5	2.5	1.25	1.25
INH	1.0		0.0313		0.0156	
INH-SOM	0.25	2.5	0.0313	3.13	0.0156	3.13
TC	6.25		1.56		0.78	
TC- SOM	3.13	1.56	0.78	0.39	0.39	0.20
TH	1.25		0.625		0.625	
TH- SOM	1.25	12.5	0.625	6.25	0.313	3.13

3段階の接種菌量時においていずれも2回中1回併用効果が認められた。

SOM-TH

0.1mg/ml 接種菌量時において3回中2回, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時において3

回中1回併用効果が示された。

SOM-SI

0.1mg/ml 接種菌量時, 2回中2回共併用効果が認められた。0.01mg/ml 接種菌量時において2回中1回併用効果が認められた。

2. 臨床投与量比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果の検討

培養開始後2週間目における各薬剤の単独並びに SOM 併用時における MIC を表6より表8迄に示した。以下個々の薬剤について実験成績を説明する。

SOM-SM

2回の実験において表から明らかなごとく、3段階の接種菌量時において併用効果は認められない。

SOM-PAS

3段階の接種菌量時において2回の実験中2回共併用効果が認められない。これは PAS の制菌作用が顕著で SOM の作用がこれにおおわれてしまっているためと考えられる。

SOM-INH

SOM-PAS の併用例と同様、INH の制菌作用が強力で SOM の作用が判然とせず、したがって併用効果が認められない。

SOM-KM

0.1mg/ml 接種菌量時において3回の実験中

2回、0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時において3回中各1回併用効果が認められた。

SOM-CS

0.1mg/ml 接種菌量時において2回中1回、0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時においても2回中1回併用効果を示している。

SOM-TC

0.1mg/ml 接種菌量時において3回中3回共、0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時においていずれも3回中2回併用効果が認められた。

SOM-PZA

0.1mg/ml 接種菌量時において2回中2回共、0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時においてはいずれも2回中1回併用効果を示した。

SOM-TH

0.1mg/ml 接種菌量において2回中1回併用効果が示され、0.01mg/ml, 0.001mg/ml 接種菌量時においては併用効果が認められなかった。

SOM-SI

0.1mg/ml 接種菌量時において2回中1回併用効果が認められた。

表 6 臨床投与量比によると SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果 (実験1)

発 育 阻 止 最 低 濃 度 (γ/ml)						
接 種 菌 量	0.1mg/ml		0.01mg/ml		0.001mg/ml	
	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM
SOM		12.5		6.25		3.13
SM	2.5		1.25		0.625	
SM- SOM	2.5	5	1.25	2.5	0.625	1.25
PAS	0.313		0.156		0.078	
PAS-SOM	0.313	0.0625	0.156	0.0313	0.078	0.0156
INH	0.0313		0.0313		0.0313	
INH-SOM	0.0313	0.125	0.0313	0.125	0.0313	0.125
KM	1.25		0.625		0.156	
KM- SOM	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25	2.5
CS	6.25		6.25		6.25	
CS- SOM	3.13	12.5	1.56	6.25	1.56	3.13
TC	6.25		3.13		1.56	
TC- SOM	1.56	3.13	0.78	1.56	0.39	0.78
PZA	1,000		125		62.5	
PZA-SOM	62.5	6.25	62.5	6.25	31.3	3.13
TH	1.25		—		—	
TH- SOM	0.156	0.625	—	—	—	—
SI	125		31.3		15.6	
SI- SOM	18.8	12.5	9.39	6.25	4.69	3.13

表 7 臨床投与量比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果 (実験 2)

発 育 阻 止 最 低 温 度 (γ/ml)						
接 種 菌 量	0.1mg/ml		0.01mg/ml		0.001mg/ml	
	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM
SOM		25		12.5		6.25
SM	1.25		0.625		0.313	
SM- SOM	5	10	2.5	5	1.25	1.25
PAS	0.625		0.313		0.156	
PAS-SOM	0.625	0.125	0.313	0.0625	0.156	0.0313
INH	0.25		0.125		0.0625	
INH-SOM	0.25	1.0	0.125	0.5	0.0625	0.25
KM	1.25		0.625		0.313	
KM- SOM	0.625	1.25	0.625	1.25	0.313	0.625
CS	6.25		6.25		3.13	
CS- SOM	3.13	12.5	1.56	6.25	0.78	3.13
TC	3.13		1.56		1.56	
TC- SOM	1.56	3.13	0.78	1.56	0.39	0.78
PZA	1,000		500		250	
PZA-SOM	12.5	12.5	6.25	6.25	3.13	3.13
TH	1.25		0.625		0.625	
TH- SOM	0.625	2.5	0.625	2.5	0.625	2.5
SI	125		15.6		7.8	
SI- SOM	18.8	12.5	9.4	6.25	4.7	3.13

表 8 臨床投与量比による SOM と他種抗結核薬との併用制菌効果 (実験 3)

発 育 阻 止 最 低 温 度 (γ/ml)						
接 種 菌 量	0.1mg/ml		0.01mg/ml		0.001mg/ml	
	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM	併 用 薬	SOM
SOM		12.5		6.25		3.13
TH	1.25		0.625		0.625	
TH- SOM	1.25	5	0.625	2.5	0.625	2.5
KM	5		2.5		1.25	
KM- SOM	2.5	5	1.25	2.5	0.625	1.25
TC	6.25		1.56		0.78	
TC- SOM	3.13	6.25	1.56	3.13	0.78	1.56

総括並びに考按

以上を総括すると MIC 比, 臨床投与量比の併用例のいずれにおいても拮抗作用を示すものはなく, いずれも協力作用が認められる。ただその程度は個々の併用例において多少の相違が認められる。併用効果の量的判定においては適当な方法がないが, MIC比の場合, 実験成績の数値からみて PZA, KM, INH, TC との間の併

用が特にすぐれているように思われる。また臨床投与量比の実験の場合, 主剤の制菌作用にかくれてその併用効果が不明のもの, たとえば INH, PAS 等との併用例があるが, その他の薬剤とはある程度の協力作用があるように思われる。また河田⁴⁾ が指摘したように, 概して接種菌量の大きい程併用効果が著明に出る場合が多いように思われる。

結 論

われわれは10%牛血清加キルヒナー培地を用い、新しい抗結核薬 SOM と SM, PAS, INH, KM, CS, TC, PZA, VM, TH, SI とを1) 標準 MIC の比で、2) 臨床投与量の比で併用させ、0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml の3段階の菌接種を行なうことにより併用制菌効果を検討し、次の結論を得た。

1. 両併用法を通じ、SOM はこれらのどの薬剤とも拮抗作用を示さず、いずれも多少とも協力作用を示した。

2. MIC 比で薬剤を併用させた場合、SOM との協力作用のいちじるしい薬剤は PZA, KM,

INH, TC である。

3. 臨床投与量比の併用例では主剤の制菌作用におおわれて併用効果の判然としない場合があるが、その他の場合はかなりの協力作用が認められた。

文 献

- 1) 田中：京大結研紀要掲載予定
- 2) 久世：京大結研紀要掲載予定
- 3) 河田：京大結研紀要, 7 (3): 13 (増刊第3号), 1959.
- 4) 河田：京大結研紀要, 7 (3): 31 (増刊第2号), 1959.