

持続性サルファ剤の抗結核作用特に INH との併用効果

第 1 編 試 験 管 内 実 験

京都大学結核研究所化学療法部 (主任教授 内藤 益一)

副 手 清 水 明

(昭和37年9月20日受付)

内 容 抄 録

Sulfisoxazole (SI) 及び Sulfisomidin (SIM) を対照として、持続性サルファ剤 Sulfisomezole (MS-53), Sulfamethoxypyridazine (SMP), Sulfadimethoxine (SDM), Sulfaphenazole (SP), Sulfamethomidine (SMM), 及び Sulfathiomethylpyridazine (SY-1) の試験管内に於ける制菌作用並びに INH との併用効果について、H₃₇Rv 株を対象に10%血清加キルヒナー培地を用いて検討した結果、持続性サルファ剤単独の制菌力はどれも弱い、MS-53, SP, SY-1 は SI に匹敵する効果を持ち、又何れの薬剤も接種菌量が少なく、培地 pH が酸性になる程制菌力は増強された。INH との併用効果は SI が最もすぐれ、続いて SP, SY-1, 次で MS-53, SDM, 以下 SIM, SMP, SMM の順であった。MS-53 に於ては SI 同様、INH 感受性菌に対するよりも耐性菌に対して比較的制菌効果が強かった。

第 1 章 緒 論

昭和29年4月第29回日本結核病学会総会に於て内藤が始めて結核化学療法に於ける INH と Sulfisoxazole との併用効果を発表してから8年余になる。今では此の併用術式は健康保健の治療指針や結核予防法の医療基準にも採用され、広く一般に利用されるに至って居る。

一方最近新しく持続性サルファ剤が続々と現われ一般感染症に広く使用されている。即ち Sulfisomezole (シノミン) Sulfamethoxypyridazine (レダキン, ピリダジン) Sulfadimethoxine (スルキシン, アプシッド, オムニボン) Sulfaphenazole (メリアン) Sulfamethomidine (メ

トファジン) 等である。其処で斯様な新しいサルファ剤も Sulfisoxazole と同様に抗結核剤としてその一翼を担い得るや否やは極めて深い興味の対象となる。

著者は我々の研究部門に於ける本主題の研究の内基礎的部分を担当し、既に其一部は昭和35年4月第35回日本結核病学会総会に於て発表した、此処に原著として、本編に於ては試験管内実験の詳細を報告する。

もとより本主題は我国に於て多数の人々の興味の対象となった様で、其の臨床的成績を述べた報告は枚挙に暇がない位であるが、基礎的研究となると案外に多くなく、殊に総てのサルファ剤を同一条件で比較し、しかも INH との併用効果を検索したものは少い。

先ず持続性サルファ剤個々の試験管内制菌作用に就ての報告を文献の上で拾って行くと、谷脇¹⁾²⁾、影浦³⁾、桜井⁴⁾、貝田⁵⁾、青木⁶⁾、塩田⁷⁾、療研⁸⁾、大藤⁹⁾の研究があり、どれも弱いながらも或程度の制菌力を承認して居る。然し我々の研究室で多年の Sulfisoxazole に就て検索して来た様な実験条件に就ての吟味、即ち例へば培地 pH とか、接種菌量などの差違による制菌力の変動に就ての検討は試みられていない。

又サルファ剤と INH との試験管内併用効果を検索したものとしては、谷脇¹⁾²⁾、影浦³⁾、貝田⁵⁾、塩田⁷⁾、大藤⁹⁾の報告があるが、どれも或特定の条件下に於ける実験である。INH と Sulfisoxazole との試験管内併用実験の成績が、培地条件特に pH と接種菌量とによって大きく動揺する事は我々の研究室よりの発表がつとに指摘している処であって、かかる吟味の上に立

たねば、併用効果の真の姿は確認し難い事もあり得る。

以上の実験条件を吟味した著者の実験は左様な意味で多少とも大方の御参考になり得るかと思考する。敢て報告して御批判を仰ぐ所以である。

第2章 実験材料及び実験方法

1. 検 体

実験に用いたサルファ剤は表1に示す通りである。この中 Sulfisomezole (MS-53), Sulfamethoxy-pyridazine (SMP), Sulfadimethoxine (SDM), Sulfaphenazole (SP), Sulfamethomidine (SMM), 及び Sulfathiomethylpyridazine (SY-1) の6剤は持続性サルファ剤であり、Sulfisoxazole (SI) 及び Sulfisomidine (SIM) は従来的高级サルファ剤で、対照として実験に供した。

これ等サルファ剤の中、SDM, SP, SMM, SI, 及び SIM の5剤は、注射液を蒸留水で稀釈し、夫々

10,000γ/cc の溶液を作り、SMP 及び SY-1 は Propyleneglycole で、MS-53 は蒸留水で夫々溶解後加熱滅菌し、10,000γ/cc の溶液を作り制菌力試験に用いた。併用実験に用いた INH は市販の注射液(武田)を蒸留水で稀釈して使用した。

2. 培 地

10%血清加キルヒナー培地を用いた。必要に応じて培地 pH を 5.5, 6.5, 及び 7.5 の3種に修正した。この修正方法は、研究室の伊藤¹⁰⁾が詳しく報告しているが、ガラス電極 pH メーターで pH 試験紙標準変色表の蛋白誤差等を修正し、pH 試験紙を用いて培地 pH を測定し、1N-NaOH 及び 1N-HCl の適量を培地に加えて、所定の pH に修正する方法である。

3. 菌 接 種

Tween-albumin 培地に繰返えし継代培養した研究室保存の H₃₇Rv 感性株 (H₃₇RvS), 及び同 INH 耐性カタラーゼ陽性株 (H₃₇Rv-INH (+)), 同陰性株 (H₃₇Rv-INH (-)) を用いた。これらの株を Tween-albumin 培地に 10~14日間 深部均等培養した培養液

表 1 本実験に使用したサルファ剤

| 化 学 名 | 構 造 式 | 一 般 名 | 略 号 | 分子量 |
|--|-------|---------------------------|-------|-----|
| 5-Methyl-3-sulfanilamidoisoxazole | | Sulfisomezole | MS-53 | 253 |
| 3-Sulfanilamido-6-methoxy-pyridazine | | Sulfamethoxy-pyridazine | SMP | 280 |
| 6-Sulfanilamido-2,4-dimethoxy-pyrimidine | | Sulfadimethoxine | SDM | 310 |
| 3-Sulfanilamido-2-phenylpyrazole | | Sulfaphenazole | SP | 314 |
| 2-Methyl-4-methoxy-6-sulfanilamido-1,3-diazine | | Sulfamethomidine | SMM | 312 |
| 3-Sulfanilamido-6-methylthiopyridazine | | Sulfathiomethylpyridazine | SY-1 | 296 |
| 3,4-Dimethyl-5-sulfanilamidoisoxazole | | Sulfisoxazole | SI | 267 |
| 6-Sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidine | | Sulfisomidine | SIM | 278 |

を、駒込ピペットで十分に攪拌して菌を分散させた後、Spectrocolorimeterで2.5mg, 0.5mg, 及び0.05mg/ccの濃度になる様にTween-albumin液で稀釈した。

4. 実験方法

単独薬剤の制菌力検査の方法は次の如くである。小試験管(12×110mm)10本を併列し、2ccの駒込ピペットで第1管へ3.6cc, 第2管以下へ2ccずつキルヒナー培地を分注, 第1管へ薬剤溶液0.4ccを加えて攪拌し, その2ccを第2管に移して順次減倍数稀釈を行ない, 第10管は薬剤を含まない対照培地とした。次いでこの稀釈列に上記菌液を駒込ピペットで1滴ずつ(2.5mg/ccの菌液のときは2滴)滴下, 菌接種後37°Cに培養, 2週間及び4週間後に判定した。

菌液1ccは駒込ピペットで約25滴に当たるので, 接種菌量は培地1cc当たり0.1mg, 0.01mg, 又は0.001mgとなる。

INH-サルファ剤併用実験では, 第1管に培地を3.2cc注入し, INH及びサルファ剤溶液を各々0.4ccずつ加えるほかは, 単独の場合と全く同様である。

INHとサルファ剤との併用実験での併用の割合は, 各薬剤の1日の臨床投与量の比によった。この場合の臨床投与量は, INH 0.3~0.5g, SI 3.0g, SIM 3.0g, MS-53 2.0g, SMP 0.5g, SDM 0.5g, SP 1.0g, SMM 1.0g, SY-1 0.5gとして計算した。例えばINH-SI併用では0.3:3.0=1:10, INH-SP併用では, 0.3:1.0=1:3.3の割合となり, 又INH-SI併用実験の第1管はINH 1.0γ, SI 10γを含み, 以下どの稀釈列もINHとSIとの混合比は1:10の割合となるわけである。

第3章 実験成績

1) 各種サルファ剤の結核菌制菌作用

我々の研究室ではSIの結核菌に対する制菌力が, 培地pHや接種菌量に著しく影響される事を経験している¹⁾, 本実験に於ては培地pHと接種菌量を3段階にかえて行った。

表2, 表3は各種サルファ剤のMICを検討した成績である。

接種菌量培地1cc当り0.01mg, 培地pH6.5と云う標準条件での結核菌に対する最低発育阻止濃度(MIC)は, MS-53及びSPが31.3γで最も強く, SI及びSY-1が62.5γでこれに次ぎ, SDM及びSMMは125.0γでやや弱く, SIM及

表2 各種サルファ剤の結核菌発育抑制最低濃度; 培地pHとの関係

| 薬 剤 | 培 地 pH | | |
|-------------|--------|--------|--------|
| | 5.5 | 6.5 | 7.5 |
| SI | 15.6 | 62.5 | 500.0 |
| SIM | 125.0 | 250.0 | 1000.0 |
| MS-53 | 15.6 | 31.3 | 250.0 |
| SMP | 125.0 | 250.0 | 500.0 |
| SDM | 31.3 | 125.0 | 500.0 |
| SP | 7.8 | 31.3 | 250.0 |
| SMM | 31.3 | 125.0 | 500.0 |
| SY-1 | 31.3 | 62.5 | 125.0 |
| INH (対照) | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |

判 定 2週 接種菌量 0.01mg

表3 各種サルファ剤の結核菌発育抑制最低濃度; 接種菌量の影響

| 薬 剤 | 接 種 菌 量 | | |
|-------------|---------|--------|---------|
| | 0.1mg | 0.01mg | 0.001mg |
| SI | 500.0 | 62.5 | 31.3 |
| SIM | 1000.0 | 250.0 | 125.0 |
| MS-53 | 500.0 | 31.3 | 15.6 |
| SMP | 1000.0 | 250.0 | 125.0 |
| SDM | 1000.0 | 125.0 | 62.5 |
| SP | 500.0 | 31.3 | 7.8 |
| SMM | 500.0 | 125.0 | 31.3 |
| SY-1 | 62.5 | 62.5 | 31.3 |
| INH (対照) | 0.125 | 0.0625 | 0.0313 |

判 定 2週 培地 pH 6.5

びSMPが250γでこの実験条件ではもっとも弱かった。

又いずれのサルファ剤も培地pHが酸性になる程MICが小さくなり, 接種菌量が少くなる程, MICは小さくなった。言換えると制菌力は強くなった。とくにSP, SI, MS-53, SDM, SMM, 及びSY-1のpH5.5に於けるMICは, いずれも50γ以下を示し, 臨床投与量に於ける血中濃度から考えて, かかるpHではサルファ剤単独でも或る程度の制菌作用を期待出来るかも知れない。しかしpHがアルカリ性に傾き, 菌量が多い場合には, これらのサルファ剤といえどもMICは250γ以上となる事が分った。

各々のサルファ剤について、培地 pH 及び接種菌量の影響を比較検討すると、Pyridazine 核をもつ SMP と SY-1 が最も小さく（最大 MIC/最小 MIC=2~8）、Pyrimidine 核をもつ SDM、SMM 及び SIM がこれに次ぎ（8~16）、Isoxazole 核をもつ SI 及び MS-53 と Pyrazole 核をもつ SP（16~32）が最も大きい事が明らかとなった。

2) **H₃₇Rv R-INH 株に対する MS-53 の制菌作用**

8種のサルファ剤の中、対照サルファ剤より SI を、持続性サルファ剤より MS-53 をえらび、H₃₇Rv R-INH に対する 制菌作用を 検討した。

成績は表 4 に示した如く、SI も MS-53 もその制菌力は、感性菌よりも INH 耐性菌特に R-INH (-) 株に対して強い事が分った。即ち MS-53 の H₃₇Rv S に対する MIC は 31.3γ であるに対して H₃₇Rv R-INH (+) には 15.6γ、R-INH (-) には 3.9γ を示した。

製 4 MS-53 の INH 耐性株に対する発育抑制最低濃度

| 薬 剤 | 供 試 株 | | |
|-------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | H ₃₇ RvS | H ₃₇ RvR-INH (+)* | H ₃₇ RvR-INH (-)** |
| MS-53 | 31.3 | 15.6 | 3.9 |
| SI | 62.5 | 31.3 | 7.8 |
| INH | 0.0313 | 31.3 | 125.0 |

判 定 2 週, 接種菌量 0.01mg, 培地 pH 6.5

* Katalase (+) 株, ** Katalase (-) 株

3) **INH と各種サルファ剤 との 試験管内併用効果**

我々の研究室に於ける従来の経験では、抗結核剤の試験管内併用効果は、主剤となるべき薬剤の制菌力が弱い様な実験条件のときに、より明瞭に出る傾向がある¹²⁾。この様な事実から本実験も接種菌量及び培地 PH をかえて行なった。

表 5 は培養 2 週間後の 判定成績 を示したものである。INH 単独の MIC は、接種菌量 0.01mg, 培地 pH 5.5 で 0.0625γ, pH 6.5 及び 7.5 で 0.125γ を示し、培地 pH 6.5 で接種菌量 0.1mg では 0.25γ, 0.001mg では 0.0625γ を示した。即ち INH の制菌作用は接種菌量が大となるとかなり弱く出る事が分る。サルファ剤を併用した場合には、INH の制菌力は、培地 pH 5.5, 接種菌量 0.01mg では影響がみられないが、培地 pH 6.5 で接種菌量 0.1mg ではいずれのサルファ剤を併用しても 2 倍に、同 0.01mg では、SI, MS-53, SMP, SP, SMM, 及び SY-1 併用により 2 倍に増強された。培地 pH 6.5, 接種菌量 0.001mg, 及び培地 pH 7.5, 接種菌量 0.01mg のときはサルファ剤と INH との併用効果はみられなかった。即ち 2 週間培養後の成績からは、いずれのサルファ剤も INH と多少とも併用効果を示すが、各サルファ剤の併用効果の間に優劣は明らかに認められない。

表 6 は 4 週間培養後の判定成績である。INH 単独の MIC は、接種菌量は 0.01mg では培地 pH 5.5 で 1.0γ, pH 6.5 及び 7.5 で 0.5γ, 又培地

表 5 INH の結核菌発育阻止最低濃度に対する各種サルファ剤の併用効果 (2 週判定)

| 組 合 制 | 併 用 比 | 培地 pH 5.5 | 培 地 pH 6.5 | | 培地 pH 7.5 | |
|-----------|-------|-----------|------------|----------|-----------|----------|
| | | * 0.01mg | * 0.1mg | * 0.01mg | * 0.001mg | * 0.01mg |
| INH 単独 | | 0.0625 | 0.25 | 0.125 | 0.0625 | 0.125 |
| INH-SI | 1:10 | 0.0625 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-SIM | 1:10 | 0.0625 | 0.125 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-MS-53 | 1:6.7 | 0.0625 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-SMP | 1:1.7 | 0.0625 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-SDM | 1:1.7 | 0.0625 | 0.125 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-SP | 1:3.3 | 0.0625 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-SMM | 1:2 | 0.0625 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |
| INH-SY-1 | 1:1 | 0.0625 | 0.125 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0625 |

* 接種菌量を示す

表 6 INH の結核菌発育阻止最低濃度に対する各種サルファ剤の併用効果 (4週判定)

| 組 合 せ | 併 用 比 | 培地 pH 5.5 | | 培 地 pH 6.5 | | 培地 pH 7.5 |
|-----------|-------|-----------|---------|------------|-----------|-----------|
| | | * 0.01mg | * 0.1mg | * 0.01mg | * 0.001mg | * 0.01mg |
| INH 単 独 | | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.5 |
| INH-SI | 1:10 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.125 | 0.25 |
| INH-SIM | 1:10 | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.5 |
| INH-MS-53 | 1:6.7 | 1.0 | 0.25 | 0.25 | 0.125 | 0.25 |
| INH-SMP | 1:1.7 | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.5 |
| INH-SDM | 1:1.7 | 1.0 | 0.25 | 0.25 | 0.125 | 0.5 |
| INH-SP | 1:3.3 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.125 | 0.25 |
| INH-SMM | 1:2 | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.5 |
| INH-SY-1 | 1:1 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.125 | 0.25 |

* 接種菌量を示す

pH 6.5 で接種菌量 0.1mg では 1.0%, 0.001mg では 0.25% と 2 週間培養後の判定成績に比べて, MIC は著明に大きくなっている。これは恐らく研究室の神田¹³⁾の実験成績が示すように培養中に INH が分解, 不活性化されるためであろう。サルファ剤を併用した場合には, 培地 pH 5.5, 接種菌量 0.01mg で SI, SP, 及び SY-1 の併用により, INH の MIC は 1/2 となり, pH 6.5, 接種菌量 0.1mg では SI, MS-53, SDM, SP, 及び SY-1 の併用により 1/4 に, 同じく 0.01mg では SI 併用時のみ 1/4 に, 他のサルファ剤の併用では 1/2 に, 培地 pH 7.5, 接種菌量 0.01mg では SI, MS-53, SP, 及び SY-1 の併用により 1/2 になったが, 他のサルファ剤の併用では協力作用を示さなかった。即ち結局培養 4 週間後の判定成績では, INH との協力作用が最も著明に出たのは SI で, 以下 SP, SY-1 が之に次ぎ, MS-53, SDM, SIM の 3 者が僅かに劣り, SMM は最下位を占めたが, 何れの差も大きくはなかった。

第 4 章 綜括並に考按

持続性サルファ剤を含めた各種サルファ剤の試験管内制菌力を比較した従来の報告を一覧表として見ると次の表 7 の如くなる。最後に著者の成績を附記する。

此の表を見て解る様に, 著者の成績を含めて各研究者の成績は必ずしも一致しない。之は培地の差にも起因するだろうし, 又同一培地の内

表 7 各種サルファ剤制菌作用一覧

| 研究者 | 制菌力序列 (強→弱) |
|-----|---|
| 谷 脇 | 1) SI>SIM>SMP 2) Sulfamethizole=MS-53=SDM>SP |
| 青 木 | SI=SMM>MS-53=SDM> Sulfadimethyl pyrimidine=SMP |
| 塩 田 | SP=SDM>SMP=MS-53=SY-1=SI |
| 療 研 | SP=Sulfamethizole= MS-53>SDM>SMP |
| 大 藤 | SDM=MS-53>SMP=SP=SIM |
| 著 者 | MS-53=SP>SI=SY-1>SDM= SMM>SIM=SMP |

表 8 各種サルファ剤と INH との併用効果一覧

| 研究者 | 併用効果 (+) | 併用効果 (-) |
|-----|--|--------------------------|
| 谷 脇 | 1) SI, SIM, SMP 2) SDM, MS-53 | Homosulfamin Sulfamin |
| 影 浦 | MS-53, Sulfamethizole | |
| 桜 井 | MS-53 | |
| 貝 田 | MS-53 | |
| 塩 田 | SI>SY-1 | |
| 大 藤 | SDM=MS-53>SMP | SP |
| 著 者 | SI>SP=SY-1>MS-53 =SDM>SIM=SMP =SMM | |

でも微妙な条件の差違にも起因すると推定される。

然し著者は自分の実験の結果から云って、SIに匹敵する制菌力を持つものとして、MS-53, SP, SY-1のあたりをあげたいと思う。

次にINHとの試験管内併用効果を同じく一覧表として見ると次の表8の如くなる。

之を通覧すると、大体持続性サルファ剤は大なり小なりINHの試験内制菌作用を増強すると云えよう。但其の併用効果に就ては各薬剤の間に多少の逕庭が存在する様である。

著者の成績から考えると、SIに続いて併用効果を発揮するものはSP, SY-1, 続いてはMS-53, SDMであり、SIM, SMP, SMMは最も下位を占める。但何れも其の差は僅少である。前述の個々の制菌作用の比較と大まかながら一致した事は当然ながら興味深いものがある。

然し既に我々の研究室で報告している様に、INHとサルファ剤との併用効果は単に試験管内併用効果に起因するもののみではない。INHの血中濃度の上昇と持続と云う要素がある。之等の総合の上に立って個々の薬剤の併用価値が比較されねばならない。この点は第2編に於て採上げるつもりである。

尚SIの制菌力がINH感受性菌に対してよりは耐性菌に対して比較的強いと言う事は既に本研究室の石上¹⁴⁾によって発表されているが、本編に於てMS-53に就ても亦同様の性質が確認された。恐らくは他の持続性サルファ剤に於ても共通した性質ではなからうかと推定される。

第5章 結 論

1) 持続性サルファ剤は何れも弱いながらも人型結核菌に或程度の試験管内制菌作用を有して居るが、中でもMS-53, SP, SY-1はSIに匹

敵する効果を持つ。

2) INHとの試験管内併用効果は何れの持続性サルファ剤に於ても認められたが、中でもSIに続いてSP及びSY-1が位し、次にMS-53及びSDMが引続き、SIM, SMP, SMMが之に次ぐ成績を示した。但何れの群の間も其の差は僅少である。

3) MS-53に於てもSI同様、INH感受性菌に対するよりも耐性菌に対して比較的制菌効果の強い事が明かになった。

(擱筆するに当り終始御懇切なる御指導と御援助を賜った吉田敏郎博士、津久間俊次博士並びに研究室員諸氏に深甚なる謝意を捧げます。)

文 献

- 1) 谷脇舜 結核の研究 第11集 15~23 (昭34)
- 2) 谷脇舜 結核の研究 第12集 15~22 (昭34)
- 3) 影浦正輝 大阪大学医学雑誌 11-11, 4567~4574 (昭34)
- 4) 桜井宏他 日本胸部臨床 19-3, 336~341 (昭35)
- 5) 貝田勝美他 最新医学 15-5, 1338~1357 (昭35)
- 6) 青木隆一他 内科の領域 8, 766~771 (昭35)
- 7) 塩田憲三他 結核 36-2, 106~111 (昭36)
- 8) 熊谷岱蔵他 日本医事新報 1945, 3~14 (昭36)
- 9) 大藤真他 総合臨床 10-11, 1991~2000 (昭36)
- 10) 伊藤篤 京大結研紀要 7 (1); 143 (昭33)
- 11) 内藤益一他 胸部疾患 2; 232 (昭33)
- 12) 河田利延 京大結研紀要 7 (3); 増刊 2, 31 (昭34)
- 13) 神田瑞雄 京大結研紀要 7 (3); 増刊 1, 328 (昭34)
- 14) 石上幸一 京大結研紀要 6; 233 (昭33)