

# 結核化学療法に於ける INH 及び其の誘導体に対する Sulfisomidin の併用効果に関する基礎的並びに臨床的研究

〔第1篇〕 INH 及び其の誘導体と Sulfisomidin との試験管内併用効果並びに試験管内併用による INH 及び其の誘導体耐性上昇の変化に就いて

京都大学結核研究所化学療法部 (主任 教授 内藤益一)

浜 口 精 一

(昭和33年12月20日受付)

## 【内 容 抄 録】

Sulfon 剤の1つである Sulfisomidin (SIM) と INH 並びに其の誘導体 IHMS とを併用せる際の抗結核作用に就いての試験管内実験を行なった。先づ結核菌発育阻止作用に関しては実験に使用した菌量並びに SIM 併用量による影響が大きく、一定した実験成績は得難いが、或程度の併用効果が認められた。

次に INH, IHMS 耐性獲得に及ぼす影響は増量継代培養法では IHMS・SIM に就いて行なったが、明らかに IHMS の耐性上昇は SIM によつて遅延された。恒量置換培養法にては INH 及び IHMS を高濃度に含む培地内に於いて置換培養を続けた際は SIM 併用による耐性獲得遅延効果は殆んど認められないが、INH 並びに IHMS 低濃度培地では SIM 併用により、INH, IHMS の耐性獲得を遅延せしめた。

## 第1章 緒 言

既に我々の教室に於ては INH と Sulfisoxazole (以下 SI) との協力作用に就いて基礎的並びに臨床的研究が遂げられ、其の都度詳細なる報告が行なわれている<sup>1)2)3)4)5)6)7)</sup>。

これが研究の狙いは要するに臨床的に SM-PAS 併用に前後して取るべき方法として INH を如何に有効に使うかという事即ち PAS に代

る INH の、より良き協力薬剤を探求する事にある。我々の研究室に於いては先づ伊庭<sup>6)</sup>が種々の Sulfon 剤の多くの者と INH との間に試験管内結核菌発育阻止に於いて協力がある事を作用見出したのであるが、臨床的に副作用が比較的少ない Sulfon 剤として先づ SI が取上げられた次第であつた。

さて同様に副作用の少ない Sulfon 剤としては Sulfisomidin (以下 SIM) が知られている。著者はこれを取上げて INH との併用効果を吟味したいと企劃したのである。

一方我国の最近の傾向として INH の種々の誘導体が広く使用されているので、其の1つである INH・Metansulfonate (以下 IHMS) を取上げ、之に対する SIM の併用効果を検討したいと考えた次第である。

扱て Sulfon 剤を抗結核剤に併用せんとする試みは前述の如き我々教室の研究業績の他に日置<sup>8)</sup>の Sulzolin・PAS の併用、勝沼<sup>9)</sup>の Sulfathiazole・INH 併用があり、Gillissen<sup>11)</sup>は著者の実験と同一の INH・SIM の試験管内併用効果を発表しており、これは著者と実験条件は異なっているが甚だ興味深いものがある。所で予かじめ述べておきたい事は SI に関しては齋藤<sup>12)</sup>、小酒井<sup>13)</sup>等によれば此の者は *in vitro* で 10 $\gamma$ /cc 程度に結核菌発育阻止を認めたと報告しているが、然し現在では Sulfon 剤は未だ一般に単独

では抗結核剤としては認められておらず、著者の実験主題である SIM も後述の如く単独の結核菌発育阻止作用は問題にならぬ位弱い、従つて Sulfon 剤と抗結核剤の作用実験に於いて前者自体の抗結核作用は余り重く見る訳には行かぬと考えられる。

以上の意図に基づいて著者は先づ IHMS・SIM、次いで INH・SIM に就いて試験管内結核菌発育阻止作用並びに併用時の IHMS 及び INH の耐性上昇変化の実験的研究を行つた。

尚、斯様な試験管内実験は衆知の如く実験条件による成績の動揺は不可避であるので、著者はこの点を充分考慮に入れて以下に述べる実験を行なつた次第である。

## 第2章 実験方法

### [A] 試験管内発育阻止実験

(1) 培養基 10%血清加 Kirchner 培地を使用した。其の組成は次の通りである。

Dinatrium phosphat	3.0g
Monokalium phosphat	4.0g
Magnesium sulfat	0.6g
Natrium zitrat	2.5g
Asparagin	5.0g
Glycerin	20.0cc
Aq. dest.	1000.0cc

以上の基本培地を調整し、これの pH を 6.6 ~ 6.8 に修正した後に 100 °C, 30 分蒸気滅菌を 3 回に互つて行なつた。次いで無菌的に採血した山羊より分離した血清を 10% の割に注加したる後、56 °C 30 分加温非動化滅菌し、孵卵器中に 24 時間放置し、雑菌混入なき事を確めた上、実験に供した。

### (2) 結核菌浮游液

10%血清加 Kirchner 培地にて発育旺盛なる時期にある（通常移殖後 10 日位）人型結核菌 H37Rv 株を白金耳にて採集し、これを無菌的に乾燥秤量後小川氏肉厚コルペンに入れ、次いで滅菌生理的食塩水を漸次注加しつゝ振盪し、充分均等性の浮游液を作る。この場合菌液は次章に述べる如き 5 mg/cc, 1 mg/cc, 0.5 mg/cc, 0.1 mg/cc, 0.01 mg/cc, 0.001 mg/cc なる如く調

整し、これを実験に供した。

### (3) 被検検体調整法

SIM は 10% 注射液を使用した。一方 IHMS 及び INH は蒸溜水を以て溶解した後蒸気滅菌を施した。斯くして SIM は IHMS に対して 3 倍量, 6 倍量, 10 倍量併用の 3 種の組合せを作り、又 INH に対しては 10 倍量併用のそれを作つた。之等の併用量は臨床的使用量に基づいて定めたものである。

### (4) 実験術式

並列した 10 本の小試験管内に Kirchner 培地を注加し、第 1 試験管に被検検体溶液を入れ、10 倍稀釈次いで倍数稀釈されるよう漸次右方に稀釈していく。最後の第 10 管は薬液を含まぬ対照培地とする。次いで菌液を培地に 1 cc 1 滴宛滴下したる後で孵卵器に納める。

### (5) 成績判定

通常 4 週後に行なう。判定に際しては必ず対照培地と比較しつゝ菌の発育如何を検して肉眼的に明らかに菌発育を認めざる濃度を阻止限界とした。尚肉眼的判定困難なる場合には念の為染色鏡検して限界を定めた。

### [B] SIM を試験管内にて併用せる際の IHMS 及び INH 耐性獲得実験

#### (I) 場量継代培養法

(1) 培養基 [A], (1) に同じ。

(2) 結核菌浮游液 [A], (2) に同じ。但し実験に使用した菌液の菌量は 0.5 mg/cc に調整したものを用いた。

(3) 被検検体調整法 [A], (3) に同じ。

(4) 実験術式 最初に前述, [A], (4) の如き実験を行ない、1 ヶ月毎にその系列に於ける菌発育許容最高濃度の培地に於いて発育せる菌或いは該培地に於ける菌発育が僅少である時は、この濃度に近い培地中に菌を採り、増菌後菌浮游液を調製し、逐次高濃度の薬剤を含む培地に継代してゆく。

#### (II) 恒量置換培養法

(1) 培養基 [A], (1) に同じ

(2) 結核菌浮游液 [A], (2) と同様の方法にて菌液を作成し、菌量 0.5 mg/cc となる様調製して実験に供した。

(3) 被検薬剤溶液 [A], (3)に同じ

(4) 実験術式 INH, SIM の臨床使用量を基として予め10%血清加 Kirchner 培地内の INH : SIM の量を 1 : 10 となる様調整し, 4 個の小三角コルベンを並べて夫々 INH 含有量 5 $\gamma$ , 0.5 $\gamma$ , 0.05 $\gamma$ , 0.005 $\gamma$ /cc となる様稀釈し, 次いで之等含有量別に各 5 本宛の特製ガラスキャップ附スピットグラスに 2.0 cc 宛分注し, 別に薬剤を加えない培地を 5 本とつて対照とした。その後, 先に調整した菌液を培地 1cc に 1 滴宛夫々に接種し, ガラスキャップを施し, 37.0°C 孵卵器内にて培養した。培養後に含有量別に 1 本宛取り, 遠心沈澱を行ない, 滅菌生理的食塩水にて 3 回洗滌し, その沈渣を夫々 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に接種した。各含有別の他の 4 本は無菌的に静かに上清をピペットにて除去し, これに新たに作成した薬剤含有量の等しい培地を 2.0cc 宛注入して恒量置換を行ない, 再び 37.0°C にて培養を続けた。その後も 1 ヶ月毎に恒量置換培養を繰返し, その都度下記の如く夫々の耐性検査を施行し, 薬剤接触 5 ヶ月にて実験を終了した。

(5) 成績判定 1 ヶ月毎に 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地上で増菌した夫々の菌を用いて 1 mg/cc の菌液を作り, 予かじめ INH を種々の濃度に含有せしめた 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に 0.1cc 宛接種し, 4 週間培養後判定して菌発育を認めた最高濃度を以て耐性値とした。IHMS・SIM 併用に於いても INH・SIM 併用の場合と同様の方法により実験を行なった。

### 第3章 実験成績

(A) 試験管内結核菌発育阻止作用に及ぼす INH 並びに IHMS と SIM の併用効果及び其の接種菌量による変動

#### 予備実験

主題の実験を行なうに先立ち, SIM 単独の結核菌発育阻止作用を検索した結果は第 1 表の如くになった。

第 1 表 SIM 単独の菌発育阻止最低濃度

菌液	5mg/cc	1mg/cc	0.5mg/cc
SIM ( $\gamma$ /cc)	> 400	> 400	400

(備考) 表中数字は発育完全阻止最低濃度を示す。

即ち 5 mg/cc から 0.5 mg/cc の菌液を使った場合 SIM の菌発育阻止最低濃度は 400  $\gamma$ /cc 或はそれ以上で単独の効果は殆んど問題にならないものであつた。但し菌量を非常に小さくすれば此の濃度は相当小さいものになるだろうと思われる。

#### 第 1 回実験

菌液 5 mg/cc から 0.001 mg/cc の 4 種類に就て IHMS 単独と之に 3 倍量の SIM, 6 倍量の SIM 及び 10 倍量の SIM を併用した場合の菌発育阻止最低濃度は第 2 表に示した如くになった。

即ち此の実験では少数の例外を除いて単独と併用との差異が認められなかつたのである。菌量を小さくすると IHMS の阻止力が余りにも強く現われて Sulfon 剤の併用効果が目立たなくなる事は先に吉村<sup>7)</sup>が報告している所であるので, 第 2 回実験は菌量を次の様に改めて実施した。

#### 第 2 回実験

今回は菌液 5mg/cc, 1mg/cc, 及び 0.5mg/cc の 3 種類とした。其の結果は第 3 表に示す如くである。

即ち今回は何れの SIM の倍量に於ても, また, 何れの菌液を使用しても或る程度の併用効

第 2 表 第 1 回 実験 (IHMS)

	5mg/cc	1mg/cc	0.1mg/cc	0.01 mg/cc	0.001mg/cc
IHMS 単独 ( $\gamma$ /cc)	0.25	0.12	0.03	0.016	0.016
+SIM 3 倍量 (IHMS $\gamma$ /cc)	1	0.12	0.03	0.016	0.016
+SIM 6 倍量 (IHMS $\gamma$ /cc)	1	0.25	0.016	0.016	0.016
+SIM 10 倍量 (IHMS $\gamma$ /cc)	0.5	0.25	0.03	0.03	0.016

(備考) 予備実験の備考に同じ

第3表 第2回実験 (IHMS)

	5mg/cc	1mg/cc	0.5mg/cc
IHMS 単独 (γ/cc)	0.06	0.06	0.03
+SIM 3倍量 (IHMS γ/cc)	0.03	0.03	0.016
+SIM 6倍量 (IHMS γ/cc)	0.016	0.016	0.016
+SIM 10倍量 (IHMS γ/cc)	0.03	0.016	<0.016

(備考) 前に同じ

果が認められた。

第3回実験

此の場合も第2回実験と同様の実験を繰返したためであるが、10倍量のSIMを使用した場合に最も著明な併用効果が認められたのである。

第4表 第3回実験 (IHMS)

	5mg/cc	1mg/cc	0.5mg/cc
IHMS 単独 (γ/cc)	0.06	0.06	0.016
+SIM 3倍量 (IHMS γ/cc)	0.03	0.03	0.016
+SIM 6倍量 (IHMS γ/cc)	0.06	0.016	0.016
+SIM 10倍量 (IHMS γ/cc)	0.03	0.016	<0.016

(備考) 前に同じ

第4回実験

本実験はINHとSIMとの併用効果の検索である。菌液は1mg/ccより0.001mg/ccに到る4段階としてINH単独と10倍量のSIM併用との効果を比較したものであるが、此の場

第7表 第1回実験 (IHMS)

	I代	II代	III代	IV代	V代
IHMS 単独 (γ/cc)	0.03	10	10	10	> 100
+SIM 3倍量 (IHMS γ/cc)	0.1	1	1	1.25	6.25
+SIM 6倍量 (IHMS γ/cc)	0.1	1	1	1.25	3.13
+SIM 10倍量 (IHMS γ/cc)	0.1	1	1	1.25	6.25

(備考) 時に同じ

第8表 第2回実験 (IHMS)

	I代	II代	III代	IV代	V代
IHMS 単独 (γ/cc)	1	10	10	25	> 100
+SIM 3倍量 (IHMS γ/cc)	0.1	0.1	10	6.25	12.5
+SIM 6倍量 (IHMS γ/cc)	0.1	0.1	10	25	50
+SIM 10倍量 (IHMS γ/cc)	0.1	0.1	1	6.25	12.5

(備考) 前に同じ

合併用効果は認められなかった。

第5表 第4回実験 (INH)

	1mg/cc	0.1mg/cc	0.01mg/cc	0.001mg/cc
INH 単独 (γ/cc)	0.03	0.06	0.016	0.016
+SIM 10倍量 (INH γ/cc)	0.25	0.06	0.03	0.016

(備考) 前に同じ

第5回実験

今回は5mg/cc, 1mg/cc, 及び0.5mg/ccの3種の菌液を併用し、INH単独と10倍量のSIM併用と効果を比較したのであるが、明らかな使用効果が常に認められたのである。

第6表 第5回実験 (INH)

	5mg/cc	1mg/cc	0.5mg/cc
INH 単独 (γ/cc)	0.25	0.06	0.06
+SIM 10倍量 (INH γ/cc)	0.12	0.03	0.03

(備考) 前に同じ

[B] 試験管内IHMS及びINH耐性上昇に及ぼすSIMの影響

① 増量継代培養法による実験

(a) 第1回実験

本実験はIHMSに就いて行つたのであるが、実験の結果は第7表に示した通りでIHMS単

独の場合は5代にして100 $\gamma$ /cc以上の耐性上昇を見たが、3倍量、6倍量並に10倍量のSIMを併用した場合5代に於いて3.13 $\gamma$ 乃至6.25 $\gamma$ /ccの耐性上昇に止まっていた。

第2回実験

本実験は第1回と同様の方法を繰返した。その結果はIHMSは5代にして100 $\gamma$ 以上の耐性上昇を認め、之れに3倍量、6倍量及び10倍量のSIMを併用した場合は大体12.5 $\gamma$ /ccの耐性に止まつたのである。

② 恒量置換培養法による実験

第1回実験

本実験は実験方法の部に述べた如き恒量置換培養法を応用してINHの試験管内耐性上昇に及ぼす10倍量のSIM併用の影響を調べたものである。実験の結果は第9表に示した様になつた。即ち5 $\gamma$ /ccINHを含む培地及び0.5 $\gamma$ /cc

INHを含む培地に於けるINHの耐性上昇に於いては併用効果を認め難く、0.05 $\gamma$ /ccINHを含む培地に於けるINH耐性上昇は幾分阻止されて居り、0.005 $\gamma$ /ccINH含有培地ではまた耐性上昇に影響が認められなかつた。

第2回実験

次は同様の方法でIHMS単独とこれに10倍量SIMを併用した場合のIHMSの耐性上昇の比較である。此の場合も5 $\gamma$ /ccIHMSを含む培地並びに0.05 $\gamma$ /ccIHMSを含む培地に於けるIHMSの耐性上昇はSIMによつて殆んど影響を受けないが、0.05 $\gamma$ /ccIHMS培地並びに0.005 $\gamma$ /cc培地に於いてはIHMSの耐性は5代に於て、単独時100 $\gamma$ /cc及び10 $\gamma$ /cc、併用時には0.63 $\gamma$ /cc及び0.31 $\gamma$ /ccという著明なる差異を認めたのである。

第9表 第1回実験 INH 単独, INH・10倍量 SIM 併用との比較

		I 代	II 代	III 代	IV 代	V 代
INH 単独	5 $\gamma$	10 (500)	50 (1250)	100 (2500)	100 (2500)	100 (2500)
	0.5 $\gamma$	10 (500)	50 (1250)	100 (2500)	100 (2500)	200 (5000)
	0.05 $\gamma$	0.04 (2)	0.16 (4)	50 (1250)	100 (2500)	100 (2500)
	0.005 $\gamma$	0.02 (1)	0.08 (2)	0.16 (4)	0.5 (12)	0.5 (12)
INH・SIM 併用	5 $\gamma$	10 (500)	50 (1250)	100 (2500)	100 (2500)	100 (2500)
	0.5 $\gamma$	10 (500)	25 (625)	100 (2500)	100 (2500)	100 (2500)
	0.05 $\gamma$	0.04 (2)	0.16 (4)	10 (250)	10 (250)	25 (625)
	0.005 $\gamma$	0.04 (2)	0.04 (1)	0.16 (4)	0.25 (6)	0.5 (12)
対 照	0 $\gamma$	0.02 (1)	0.04 (1)	0.04 (1)	0.04 (1)	0.04 (1)

(備考) ( ) 内は各代の対照の耐住度を1として倍数で表わしたもの

第10表 第2回実験 IHMS 単独, IHMS・10倍量 SIM 併用との比較

		I 代	II 代	III 代	IV 代	V 代
IHMS 単独	5 $\gamma$	25 (400)	100 (2560)	200 (5120)	200 (5020)	200 (5120)
	0.5 $\gamma$	50 (800)	100 (2560)	200 (5120)	200 (5120)	200 (5120)
	0.05 $\gamma$	0.12 (2)	25 (640)	50 (1280)	200 (5120)	100 (2560)
	0.005 $\gamma$	0.12 (2)	0.04 (1)	6.25 (160)	10 (256)	10 (256)
IHMS・SIM 併用	5 $\gamma$	25 (400)	100 (2560)	200 (5120)	200 (5120)	200 (5120)
	0.5 $\gamma$	50 (800)	100 (2560)	200 (5120)	200 (5120)	200 (5120)
	0.05 $\gamma$	0.12 (2)	0.63 (16)	0.63 (16)	2.5 (46)	0.63 (16)
	0.005 $\gamma$	0.06 (1)	0.04 (1)	0.31 (8)	0.31 (8)	0.31 (8)
対 照	0 $\gamma$	0.06 (1)	0.04 (1)	0.04 (1)	0.04 (1)	0.04 (1)

(備考) ( ) 内は前に同じ

#### 第4章 総括並びに考按

以上の実験成績をみれば INH 並びに IHMS の結核菌発育阻止作用に対して SIM は或る程度の併用効果を持つ様である。

そして試験管内実験に於いては接種菌量が非常に小さい場合は併用効果が認められ難い。此の事は既に述べた如く吉村<sup>7)</sup>の SI に関する併用実験に於いても認められている通りである。

次に SIM 投入による INH 並びに IHMS の耐性上昇に及ぼす影響を観察した結果では先づ増量継代法に於いては IHMS の耐性上昇発現を或る程度遅延せしめる事を知つたのである。然し増量継代培養法では菌と薬剤濃度との関係が生体内に於ける場合と著しく異なっている事は申す迄もない事で、生体内では常に或る濃度以下の薬剤に浸されている筈である。此の見地から著者は恒量置換培養法により引続き検索した次第であるが、INH 及び SIM 併用に於ては 0.05 $\gamma$ /cc INH 培地に於いてのみ幾分の併用効果を認め、IHMS・SIM 併用に於いては 0.05 $\gamma$ /cc IHMS 培地並に 0.005 $\gamma$ /cc IHMS 培地に於いて著明なる併用効果、即ち IHMS 耐性阻止効果を認めたのである。即ち INH 或いは IHMS の一定濃度以上の高濃度の培地に於いては SIM 併用の耐性上昇阻止効果は殆んどなく、或る濃度以下の INH 或いは IHMS 含有培地では耐性上昇阻止効果を認めるという事になる。

以上の菌発育阻止実験並に耐性上昇阻止実験の結果よりみて、SIM と INH 或は IHMS との併用は意義あるものと考えられる。但し SIM と SI との間に INH に対する併用効果に於い

て差異があるか否かは実験条件を同一にして比較検討せねばなるまいと考えられる。

#### 第5章 結 論

INH 並びに IHMS の抗結核作用に及ぼす SIM の併用効果を検索した結果、次の結論に達した。

① 試験管内結核菌の発育阻止作用に於いて INH 並びに IHMS と SIM との間に或る程度の併用効果が認められる。但し接種菌量が非常に小さいと併用効果は認められない。

② 増量継代培養法に於いて IHMS 耐性上昇は SIM 併用によつて著明に阻止される。

③ 恒量置換培養法に於いては、INH 或いは IHMS の一定濃度の培地に於いて其の耐性上昇は SIM によつて阻止される。

#### 主 要 文 献

- 1) 内藤：結核臨床；3, 8, 10, 昭30—8
- 2) 内藤：日本臨床結果；15, 10, 674, 昭31—9
- 3) 内藤：内科宝函；2, 7, 639, 昭30
- 4) 北川：京都大学研究所紀要；5, 1, 68, 昭31—9
- 5) 谷：同上；5, 183, 昭31—9
- 6) 伊庭：同上；6. 1. 4, 昭32—9
- 7) 吉村：未発表
- 8) 日置：治療；34, 9, 851, 昭27
- 9) 勝沼：結核研究の進歩；1, 51, 昭28—1
- 10) Gillissen : Z. Hyg ; 139, 321, 1953.
- 11) Gillissen : Z. Hyg ; 139, 498, 1954.
- 12) 齊藤：結核；第29巻増刊号, 昭29
- 13) 小酒井：昭31年日本化学療法学会総会報告
- 14) 今井：胸部疾患 1 ; 214, 昭32