

INH に対する併用剤としての Sulfisoxazole 並に Pyrazinamide の試験管内効果の検討

〔第1編〕 INH・Sulfisoxazole 併用並に INH・Pyrazinamide 併用の
試験管内実験の比較，特に接種菌量による差違

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

吉 村 百 助

（受付昭和33年12月20日）

〔内 容 抄 録〕

PAS に代わる有利な INH の併用薬剤として登場した PZA 並びに我々教室に於て同様の効果を見出された Sulfisoxazole の両者に就き INH と試験管内に於て併用した際の INH の発育阻止最低濃度を比較した。即ち酸性，中性並びに塩基性に pH を修正した 10% 血清加 Kirchner 培地を用い，特に種々の濃度の菌液（10~0.001 mg/cc）に調製した人型結核菌 H₃₇Rv 株を使用して実験した結果，INH・Sulfisoxazole の併用効果は明らかに認められたのに対し INH・PZA のそれは極めて僅少であつた。但しこれらの実験成績は接種菌量によつて可成り動揺を来たし結局 1mg/cc に調製した菌液を以て実験を行うのが望ましく 0.1mg/cc 以下の菌液にては実験成績が一定しなかつた。

第1章 緒 言

現在我国に於ける肺結核の化学療法の趨勢を見るに，薬剤を単独に使用する事は例外的で，正に併用療法時代と言つた観がある。そして薬剤併用方式は先ず 2 者併用，即ち Streptomycin（以下 SM）・p-Aminosalicylic Acid（以下 PAS）を併用し，次いで Isonicotinic Acid Hydrazide（以下 INH）・PAS を併用する試みと，其の逆の順序の場合と，最初から一挙に 3 者併用，即ち SM・PAS・INH を併用する試みとがあり，何れが有利であるか否かはともかくとして現状に於ては第 1 の方式が数多く行われている傾向にある。斯様な訳で INH・PAS 併用患者の大多数は SM・PAS 法を施行された後のものであると言つてもよく，この場合 PAS 自体は元来 SM 或いは INH と比べて耐性発現が遅い¹⁾²⁾³⁾と言われてはいるものの，宿命

的に長い経過を持つ肺結核を対象とする以上やはり或る程度の耐性獲得は避け難い。又一方 PAS は副作用の一つである胃腸障碍の為長期投与を断念せざるを得ぬ場合が少なくない。其処で問題となることは SM・PAS 併用を一応終了後に INH を如何に使うべきかと言う事である。換言すれば PAS に代わる有利な INH の併用薬剤の追求と言う事になる。この意図に応じて登場して来たのが Pyrazinamide（以下 PZA）である。之は Yeager⁴⁾や Schwartz & Moyer⁵⁾等の研究に基づくもので臨床的に INH との間に著しい併用効果がある事は既に一般に認められており，この PZA・INH 併用療法⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾は抗結核剤の一併用方式として確立した位置を占めるに至つている。所で我々の教室に於ても数年前より同様な目的の下に INH と Sulfisoxazole（以下 SI）の併用が着想され，その基礎的並びに臨床的実験の詳細は既に数回に亘つて報告¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾されており，目下各方面で追試され，其の効果が認められつつある¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。従つていづれ INH・PZA と同様に広く一般化される日も遠からぬものと思考される。

扱て，PZA は試験管内抗結核菌力が諸家の報告に依れば比較的弱いものと言われ，事実我々教室で神頭¹⁹⁾が行つた実験でも中性 10% 血清加 Kirchner 培地で H₃₇Rv 株に対し 100r/cc という成績を得ているのみで，PZA 対 INH を 10：1 の割で実験せる場合の INH 抗菌力は INH 単独のそれに比べて稍々増強されるという結果が出て居る。勿論之等は pH の如何に

大いに関係ある如く思われるが、ともかく前述の我々の教室に於ける実験成績より判断すれば PZA・INH 併用は McCune & Tompsett²⁰⁾ が述べた *in vivo* で *eradicated* な効果を示す程の注目に値するものではない様にも見える。之に対して SI は単独にては試験管内で PZA と余り大差のない弱い抗菌力を示すが、INH と併用する事によつて明らかに INH の阻止力を増強するという結果^{11) 12) 13) 14)}を得ている。

然しこの様な INH に関する相似た 2種の併用療法効果の優劣を実験者が異り、実験時が異なる 2つの実験によつて判断する事は甚だ危険であろう。又試験管内菌発育阻止実験では或場合には接種菌量によつて其成績がかなり大幅に動揺するものである。

文献に依れば Michael²¹⁾等は SM, PAS 及び INH に就いて接種菌量を変えて試験管内実験を行い抗菌力にかなりの変動があつた事を指摘し、接種菌量の多寡は生体内病巣に於ける薬剤の感受性と接近した関連性を有するであろうと結論している。その他菌量と抗菌力との関係に就いて、PAS ではその試験管内抗菌力が接種菌量に反比例 (Vennesland,²²⁾ Youmans²³⁾) するのに対し SM のそれは余り著しい影響を受けない (Willston,²⁴⁾ Youmans,²⁵⁾ Robinson²⁶⁾) という報告がある。

其処で著者は INH・PZA 併用と INH・SI 併用との効果を比較する基礎的試験管内実験を企て、酸性、中性及び塩基性メヂウムに於て併用を行い、接種菌量を種々変化せしめて実験を試みた。

第2章 実験方法

1) 培養基

使用した培地は Kirchner 培地で、その組成は次の通りである。

Dinatrium phosphate	3.0g	} pH 6.6~6.8
Monokalium phosphate	4.0g	
Magnesium sulfate	0.6g	
Natrium citrate	2.5g	
Asparagine	5.0g	
Glycerine	20.0cc	
Aq. dest.	1000.0cc	

以上の基本培地を 90cc 宛分注し、型の如く蒸気滅菌を施したものに、無菌的に採取せる山羊血清を 10cc 加え、56°C 30分 加温した後自然冷却せしめた。次いで培地 pH を酸性、中性及び塩基性に修正すべく滅菌定規塩酸並びに苛性曹達を加え、水素イオン濃度試験紙標準変色表を使用して比色法により pH 修正を行つた。尙この標準変色表に於ける pH 色調は予め光電比色計に基づいて訂正した。酸性培地の場合は前述の定規塩酸を所要量加えて、pH 試験紙 Methylred (MR) により pH 5.5~5.8 に、塩基性培地にては定規 苛性曹達を加えて Cresolred (CR) により pH 7.2~7.4 に修正した。中性培地の場合は pH 6.6~6.8 で通常修正を要しない。以上の操作はすべて無菌的に行つた。

斯くして一昼夜孵卵器中に納め無菌的なることを確かめて後実験に供した。

2) 被検薬物溶液

先ず INH 単独被検液の調製には所定量の INH を秤量し蒸溜水を以て溶解したる後 100°C 15分間加熱滅菌した。

INH・SI 併用被検液の場合は予かじめ調製した INH 溶液の中に INH 1 に対し 10倍量の SI (10%注射液使用) を無菌的に注加した。

INH・PZA 併用の場合は最初 INH を所定量秤量し、次いでこの INH 量に対する 10倍量の PZA を秤量混和したる後蒸溜水にて溶解滅菌した。

以上 3種の被検液に於ける INH 濃度は 500 倍稀釈溶液となる如く調製されていることを附記する。

3) 結核菌浮游液

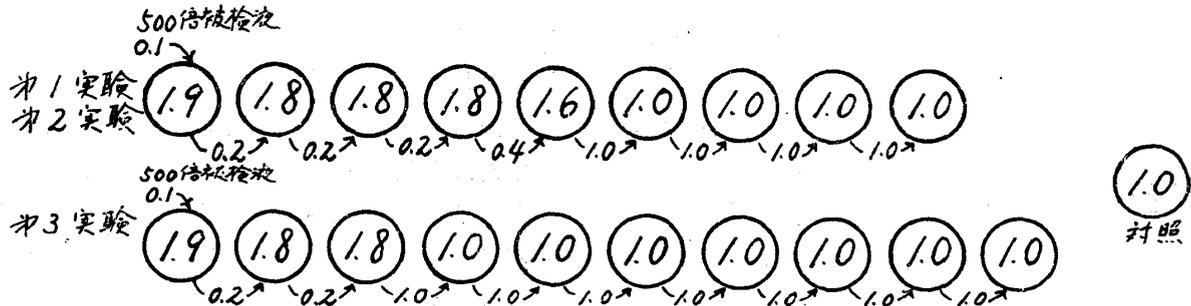
10% 血清加 Kirchner 培地にて発育旺盛なる時期にある (通常移植後 10日位) 人型結核菌 H₃₇Rv 株を白金耳にて採取し、之を無菌的に乾燥秤量後小川氏肉厚ガラス玉入コルベンに入れ、次いで滅菌生理的食塩水を漸次注加しつつ振盪し、可及的均等なる菌浮游液を調製した。この場合菌量は次章に述べるが如き種々なる菌液に稀釈した。

4) 実験術式

ガラスキャップ付滅菌小試験管 10本を架列し、先ず培地を注加したる後被検液を第1管に加えピペットにより順次稀釈していくのである

がその操作を図示すれば次の如くである。

斯くして菌液を 1滴/cc 宛滴下したる後孵卵器に納める。



備考. 表中数字はすべて cc. を表わす

5) 成績判定

原則として第4週末とした。判定に際しては必ず対照培地と比較しつつ行い、集落発生の全く認められない完全発育阻止の最低濃度を取り上げ、対照培地に比し菌発育のいくらか弱い不完全発育阻止濃度は判定の参考にする程度にとどめた。それ故阻止限界点が不鮮明な時には培地を遠心沈澱して沈渣をスライドに塗抹し、結核菌染色を施して鏡検により菌発育の有無を判定したこともある。

第3章 実験成績

酸性、中性及び塩基性の 10%血清加 Kirchner 培地に於ける INH・10倍量 PZA 併用 (以下 I+10P) 時の INH の結核菌発育完全阻止最低濃度 (以下 MIC) と INH・10倍量 SI 併用 (以下 I+10SI) 時の INH の MIC を比較した成績と、これの接種菌量による変動は以下に述べる通りである。所で菌液に関して著者は先ず最初に 0.1~0.001mg/cc の範囲を追求し (第1実験)、次いで 10.0~0.01mg/cc の範囲を (第2実験)、その後 5.0~0.5mg/cc の範囲に於いて実験 (第3実験) を行なつた。

第1実験

実験成績は第1表に示す如くである。

即ち接種菌量小なるに従つて全般に INH の MIC は低濃度となる傾向を示すが、I+10P 併用時の INH の MIC は酸性 0.1mg/cc 菌液

第1表

被検薬物	接種菌液			
	培地 pH	0.1 mg/cc	0.01 mg/cc	0.001 mg/cc
INH	酸性	0.1	0.005	0.005
	中性	0.01	0.005	0.01
	塩基性	0.01	0.02	0.005
I+10P	酸性	0.01	0.005	0.005
	中性	0.01	0.005	0.005
	塩基性	0.1	0.1	0.02
I+10SI	酸性	0.01	0.005	0.0025
	中性	0.01	0.01	0.005
	塩基性	0.01	0.005	0.005

備考: 表中数字は INH の MIC (γ/cc) を示す。

の場合と、中性 0.001mg/cc 菌液の場合とにのみ併用効果を現わし、他は不変或は逆の成績が出て居る。I+10SI 併用時には酸性 0.1mg/cc 及び 0.001mg/cc 菌液の場合、塩基性 0.01mg/cc の場合及び中性 0.001mg/cc 菌液の場合に併用効果が認められ、其他の場合には大差がない。

第2実験

そこで次に中性培地のみを使用して菌量を 0.1mg/cc を上廻つた菌液範囲にして実験を進めた (第2表)。

之によると菌液 10mg/cc では INH 単独の MIC が 1γ/cc であるに対し I+10P 時並び

第 2 表

被検薬物	接種菌液			
	10mg/cc	1mg/cc	0.1 mg/cc	0.01 mg/cc
INH	1.0	0.1	0.005	0.005
I+10P	0.1	0.1	0.02	0.005
I+10SI	0.1	0.02	0.005	0.005

備考：表中数字は INH の MIC (γ /cc) を示す。

に I+10SI 時の INH の MIC は共に 0.1 γ /cc である。菌液 1mg/cc では INH 単独の MIC が 0.1 γ /cc に対して I+10SI 時の INH の MIC は 0.02 γ /cc と著しい低濃度を示すが、I+10P 時の INH の MIC は単独時と変りはない。所が菌液 0.1mg/cc, 0.01mg/cc 時の MIC を比較すると第 1 実験に於けると同様 PZA, SI 共に併用効果を示さない。

以上の実験成績より著者は菌液 1mg/cc を中心としてその前後の菌量を以て今一度 pH を変えて併用実験を試みた。

第 3 表

被検薬物	接種菌液			
	培地 pH	5mg/cc	1mg/cc	0.5 mg/cc
INH	酸性	0.25	0.06	0.06
	中性	0.25	0.03	0.13
	塩基性	0.25	0.25	0.25
I+10P	酸性	0.25	0.13	0.03
	中性	0.5	0.25	0.06
	塩基性	1.0	0.5	0.5

第 4 表

被検薬物	接種菌液			
	培地 pH	5mg/cc	1mg/cc	0.5 mg/cc
INH	酸性	0.13	0.016	0.016
	中性	0.25	0.13	0.13
	塩基性	0.13	0.06	0.06
I+10SI	酸性	0.06	0.016	0.016
	中性	0.13	0.06	0.06
	塩基性	0.13	0.03	0.03

備考：表中数字は INH の MIC (γ /cc) を示す。

第 3 実験

先ず PZA 併用の実験成績 (第 3 表) をみるに I+10P 時の INH の MIC は INH 単独時の MIC に比し 5mg/cc, 1mg/cc の菌液では却つて高くなり酸性並びに中性培地の 0.5mg/cc の菌液の場合にのみ僅かに低濃度を、即ち併用効果を示すのである。

之に対して SI 併用の実験成績 (第 4 表) をみると、I+10SI 時の INH の MIC は INH 単独の MIC に比し酸性培地の菌液 1mg/cc 及び 0.5mg/cc の場合 及び塩基性培地の菌液 5mg/cc の場合に於てのみ同等であるが、その他の場合の培地 pH 及び菌液を通じて MIC が低濃度を示して居る。即ち併用効果を示すのである。この点 I+10P 時とはかなり異なつた成績を示すことが注目される。

第 4 章 考 按

実験成績を総括すれば、接種菌量の小なる範囲を調べた第 1 実験に於て INH に対する PZA の併用効果は明かでなく、SI の併用効果は幾分認められた。又併用効果に対する培地 pH の影響は両者共に殆んど認められなかつた。所が接種菌量の 大なる 範囲をも含めて追求した第 2, 第 3 実験では INH と SI の併用効果は明らかに認められたが、INH と PZA の併用効果は僅少であつたのである。但し此の場合にも培地 pH の差違によつて特に併用効果に明かな逕庭は認められなかつたのである。

本研究の結果明かになつた事実の内で注目し得るものを二つ挙げたい。

其第一は、我々の研究室に於て系統的に追求された INH・SI 併用効果の試験管内実験は伊庭²⁷⁾が先に報告した処であるが、此場合接種菌量によつて併用効果が或は認められ或は認められないと言う事実が本研究成績より明らかとなつた次第である。一般に INH 単独使用時の MIC は接種菌量によりかなり動揺し、菌量が 大であれば MIC が大となり、斯様な場合には SI が明らかな併用効果を示す。之に反して接種菌量が小となると、INH 単独使用時の MIC 自体が極めて低濃度となり、之に SI を併用す

るも其の効果は明らかに認められないのである。

此の結果を直ちに臨床の実際にあてはめる事が適切かどうかには尙疑問の余地はあろうが、被包病巣内の如く結核菌の数が比較的少いと想像される場所では INH に対する SI の併用効果は左程には現われず、空洞内面の如き菌数も多く其の発育も旺盛な場所では SI の併用効果が特に強く発揮されるのではないかと想像される。

第二に明らかとなつた事実として PZA は SI と同時に並べて実験したに関わらず、INH に対する併用効果が何れの菌量に於ても著明には認められなかつた事である。此の点に於て INH・PZA 併用の作用機転が INH・SI 併用の其れとは違つた処にあるのではないかとも想像され、今後の研究の好題目と信ぜられる。

第5章 結 論

10%血清加 Kirchner 培地、人型結核菌H₃₇Rv 株を以て行つた試験管内実験により INH・10倍量 SI 併用と INH・10倍量 PZA 併用との比較実験を行つた。

1) INH・SI の併用効果は菌液 1mg/cc 前後のものを接種せる際明らかに現われる事を確認した。然し菌量を微量にすると INH・SI の併用効果は明らかに認められなくなる。

2) 之に対し INH・PZA の併用効果は何れの菌量に於ても極めて僅少であり INH・SI 併用に劣る。

(欄筆するに当り御援助を賜つた渡辺林造博士に深甚の謝意を捧げます。)

文 献

- 1) 小酒井望：結核診療室，5，47，(昭28. 7)
- 2) 小山善之他：日本臨床結核，12，77，(昭28. 2)

- 3) 熊谷岱藏：同上，12，217，(昭28. 4)
- 4) Yeager et al：Am. Rev. Tuberc.，56，523，1952
- 5) W.S. Schwarz & Moyer：ibid.，70，413，1954
- 6) Mc Dermott et al：ibid.，69，319，1954
- 7) F. Brecke u. D. Wentz：Tbk. Arzt 10，465，1956
- 8) 島本多喜雄他：日本医事新報，1613，3，(昭30. 3)
- 9) 熊谷岱藏，大森憲太：同上，1614，3，(昭30. 11)
- 10) 沼田至他：日本臨床結核，15，132，(昭31. 2)
- 11) 内藤益一他：綜合臨床，3—4，(昭29. 3)
- 12) 内藤益一：結核の臨床，3，458，(昭30. 8)
- 13) 同上：内科宝函，2，639，(昭30. 7)
- 14) 同上：日本臨床結核，15，674，(昭31. 10)
- 15) 小酒井望他：同上，15，770，(昭31. 11)
- 16) 小川政敏他：同上，15，778，(昭31. 11)
- 17) 小山善之他：新薬と臨床，29，(昭31. 9)
- 18) 齊藤紀仁他：日本臨床結核，15，694，(昭31. 9)
- 19) 神頭勝太：胸部疾患，1，198 (昭32. 8)
- 20) Mc Cune & Tompsett, R：Transaction of the 13th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration, Area Medical Office, Feb. 168, 1954
- 21) Michael, K. et al：Am. Rev. Tuberc.，72，390，1955
- 22) Vennesland, K. et al：Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.，68，250，1948
- 23) Youmans, G.p. et al：J. Bacteriol.，54，409，1947
- 24) Willston, E. H. et al：Am. Rev. Tuberc. 59，336，1949
- 25) Youmans, G. P.：Quart. Bull. Northwestern Univ. M. School，19，207，1945
- 26) Robinson et al：Am. Rev. Tuberc.，62，484，1950
- 27) 伊庭一男：京都大学結核研究所紀要6，4，(昭32. 9)