

原 著

Rifampicin (RFP) の抗結核作用と作用時間に 関する試験管内実験的研究*

第1篇 結核菌発育阻止効果について

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第一

裏 辻 康 秀

(昭和51年3月1日受付)

緒 言

現在、抗結核薬として用いられている薬剤は13種類に及んでいる。即ち、INH, SM, PAS, EB, KM, CPM, TH, PZA, VM, CS, Tb₁, SF, そして RFP である。これらの薬剤の中には、結核菌に対する作用機序が分っているものもあるし明らかでないものもある。一般に抗結核薬は試験管内では結核菌に対して殺菌的に作用するが、生体内では副作用を考慮した上で定められた通常の使用量では血中濃度に一定の限界があり、また血中の薬剤濃度がそのまま病巣内に移行するとは限らないという点もあって、殺菌的に作用する場合はまれであり、菌の発育を抑制し、これに生体の防禦機構が加わって治療に導かれるものと考えられている。

どのような疾患の薬物療法にも長年の臨床経験の集積の上に立った多かれ少なかれの法則性があるが、実験計画法が比較的早く導入された結核の化学療法については、そのような経験則だけではなくて確率論的な検討に耐えうるいくつかの法則がこれに加わっている。その中で重要な問題は、薬剤或いは化学療法術式を比較する場合には菌所見の信頼性は高いということ、そして原則的に耐性薬剤は用いない方がよいと

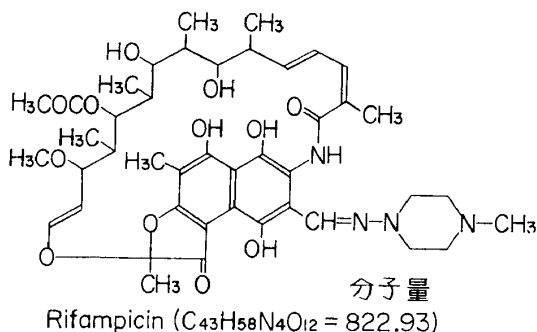
*本論文は京都大学審査学位論文である。

いうこと、更に耐性出現の阻止・協力作用・代謝競合などを考慮して併用療法を行なわねばならないということ、また、1日量の問題、投与期間の問題があり、更に、副作用を少なくし、薬剤特有の作用に基づく病巣反応を減少させ、経済的負担を軽減し、外来管理的治療を行なうため間歇療法の問題がある。

最近、新しい抗結核薬としてその効果がINHに匹敵するものとされ、我が国においても臨床共同研究が進行している Rifampicin (以下 RFP と略す) に関しても当然その間歇投与の可能性が検討されねばならないが、RFP の間歇投与に関する基礎的研究は、鈴木¹⁾, L. Verbit²⁾ によるマウス実験的結核症に関する報告にみられるけれど、いまだ内外にそう多くはない。そこで、RFP の特徴的な抗結核性を追究するための基礎的研究の一端として、結核菌に対する RFP の作用時間と抗結核性の消長に関する試験管内実験的研究を行なった。

RFP は *Streptomyces mediterranei* の産生する抗生物質である Rifamycin SV から半合成的に導かれた新抗生物質である。1957年に *Streptomyces mediterranei* の培養液からグラム陽性菌及び結核菌に有効な Rifamycin B が分離されたが、その後 Rifamycin B の水溶液

は空気酸化することによって更に抗菌活性の高い他の化合物に変化することが発見された。この活性物質は Rifamycin O 又はその加水分解物である Rifamycin S であることが分ったが、抗結核作用がいま一つ強くないことと注射時の局所痛のため広く実用に供されるには至らなかった。それ以来臨床的に治療効果のある化合物をうる目的で、(i) 経口的吸収が優れ体内持続性の高いこと (ii) 結核感染症に高い抗菌性を有すること (iii) グラム陰性菌にも有効で幅広い抗菌スペクトルを有すること、などを目標に数百種におよぶ誘導体が合成された。これらの中から RFP は Rifamycin SV の誘導体として 1965年にイタリア Gruppo-Lepetit の研究陣によって開発されたものである。RFP の化学名は 3-[(4-methyl-1-piperazinylimino) methyl] rifamycin SV ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, 分子量=822.93) で、化学構造式は下記のとおりである。



3-[(4-methyl-1-piperazinyl imino) methyl] rifamycin SV furonaphtha lene 環を母核とし、これに長い橋状構造を有している³⁾。RFP は橙赤色 (レンガ色) の無味無臭の粉末状ないし針状結晶で、クロロホルムに溶け易く、メタノールにやや溶け難く、水には極めて溶け難い物質である。183~188°C で黒変分解し、明確な融点を示さない。

実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

試験管：内径 1 cm, 高さ 12 cm のガラスキャップ付小試験管を使用した。

シリコン被覆スライド：東の方法⁴⁾によって作製した。シリコン被覆スライド (Silicone-

coated slide, SS と略す) とはスライドガラスに所定の処理を加えてその表面を silicone の薄膜で被覆したもので、スライドガラスは普通のスライドガラスを縦に 3 切したもの (ca. 9×75 mm) を使用した。即ち、上記のスライドガラスをクロム硫酸中に 24 時間浸漬後、流水中で数時間洗滌してから乾燥、更にベンジンで洗滌した後、室温で乾燥させ、次いでこれを粘度 350~500 centistokes の Dimethyl Silicone (Dow Corning 社製 “DC 200 Fluid”) の 2% (v/v) クロロホルム溶液に約 1 分間浸漬後、室温で 1 及至 2 時間風乾し、300°C, 1 時間熱処理を加えた。

菌株：教室保存の H₃₇R_V 株で 1% 小川培地で 4 週間培養したものを使用した。

菌液及び菌接種方法：H₃₇R_V 株の菌集落を別の試験管に移し、石油ベンジンを加え、よく振盪して菌を分散させ、2~3 分間静置して粗大菌塊を沈殿せしめた後、上清を他の試験管に移し、硫酸バリウム標準液と比色することにより、約 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液とした。この菌液中に SS を池田の方法⁵⁾によって約 2 cm の深さに瞬時浸漬して菌を附着させた。

培地：pH ca. 6.5 の 10% 牛血清加キルヒナー培地を使用した。

被検薬剤：RFP, INH 及び SM である。RFP の溶解稀釈には dimethylformamide (DFA) を用い、1 mg/ml とし以後培地を用いて稀釈した。SM 及び INH は蒸留水で 10 mg/ml まで稀釈して、その後は培地を用いて稀釈した。

第2節 実験条件及び実験方法

薬剤作用温度：37°C とした。

実験群の構成：実験群の構成に当っては、臨床投与方法を参考としながらも、実験 1 に於ては作用時間を任意に選んだ。実験群の構成は表 1 に示す通りである。

実験 1：① 24 時間週 2 回間歇作用 ② 24 時間週 1 回間歇作用

これらの間歇投与方法による結核菌発育阻止効果と連続作用による効果とを比較検討した。

表1 実験群の構成(実験Ⅰ)

作用時間	薬剤数	薬剤名	薬剤濃度
連続	単独	RFP	第1管 100 mcg/ml, 以後第19管まで倍数希釈
		SM	// 1 mg/ml, //
		INH	// 1 mg/ml, //
24時間 週2回	単独	RFP	// 100 mcg/ml, //
		SM	// 1 mg/ml, //
		INH	// 1 mg/ml, //
24時間 週1回	単独	RFP	// 100 mcg/ml, //
		SM	// 1 mg/ml, //
		INH	// 1 mg/ml, //

RFP に対する対照薬剤として SM, INH を用いた。

実験Ⅰ

実験には前記の小試験管を用い、薬剤含有培地の第1管濃度を RFP 100 mcg/ml, SM, INH 1 mg/ml とした。第2管から第19管までそれぞれ倍数希釈し、第20管は薬剤非含有培地とした。

実験操作：1%小川培地上に4週間培養した結核菌集落に石油ベンジン液を注ぎ、ピペット操作によって集落を集め、別の試験管に移し阻大菌塊を沈殿せしめた後、硫酸バリウム標準液と比色することによって約 0.1 mg/ml のベンジン菌液をつくった。そして池田の方法⁹⁾、即ち実験に必要な数の SS を縦に並列させることのできる金属製の網セット(1つのセットに約 50枚の SS を並列できる、つまり約 50枚の SS を同時に同じ深さで浸漬できるセット)を使用することによって、上記のベンジン菌液中に SS を可及的同時に数秒間浸漬して結核菌を付着させた。このスライドを上記の薬剤含有及び非含有培地系列の試験管内に1枚ずつ投入し、37°C で培養した。所定の時間、薬剤を作用させた後、SS を生理的食塩水で洗滌し、間歇作用群のものは予め用意した薬剤非含有培地系列の対応する試験管に移し、また連続作用群のものは、新しく調製した薬剤含有培地系列の該当試験管に移して培養を続ける。以後4週間にわ

表2 実験群の構成(実験Ⅱ)

作用時間	薬剤数	薬剤名	薬剤濃度
連続 3時間 週2回	単独	RFP	第1管 100 mcg/ml, 以後第19管まで倍数希釈
	単独	RFP	// //
1時間 週2回	単独	RFP	// //
	単独	RFP	// //

たり各週1回及至2回同じ実験操作を繰り返した。なお、菌附着スライドは必ず同一番号の試験管で薬剤作用・培養の操作が繰り返されたことはない。又、薬剤含有培地から非含有培地へ移す時は対照の SS も同様に洗滌した。全実験を通じて1度使用した培地は薬剤含有の有無に拘らず2度と使用せず又、生理的食塩水もすべて新しく調製して実験を行なった。

判定方法：肉眼的に観察して SS 上に発育した結核菌の集落が SS 表面(SSのベンジン菌液附着部分)の2/3以上を被うとき(卍)2/3~1/3のとき(卍), 1/3以下のとき(十)とし、集落数100以下の場合には大略その数を記録した。結核菌発育阻止効果の判定時期は実験開始後第3週目とした。

実験Ⅱ

実験群の構成は、第3章で後述する実験成績(実験Ⅰ)から設定したものである。

実験Ⅱ ①3時間週2回間歇作用 ②1時間週2回間歇作用 ③1時間週1回間歇作用などは表2に示す通りである。被検薬剤は RFP のみで実験材料、実験方法及び実験操作と判定方法は実験Ⅰと全く同様である。

実験成績及びその比較検討

実験Ⅰにおける判定成績を総括したのが表3である。この判定成績をいかなる基準で比較検討すべきかは種々の考え方があろう。対照と比較すれば(卍)の成績も発育阻止作用を受けていることを示していると考えてもよいだろう。(十)は更に強い発育阻止作用を受けたことを示しており、集落数100以下ではますます強い作用を受けたことになる。この場合、肉眼的に

1 個の集落も認めない最低薬剤濃度で各実験群を比較することも出来るが、この方法によると自然耐性菌の発育が存在する場合には比較を誤まるおそれがある。(H)の成績の最低薬剤濃度で比べてもよいであろう。しかし発育阻止作用が著明で、しかも自然耐性菌等による誤まりのない判定成績で比較検討するのが最も妥当であろう。その意味から(十)の判定成績を基準にとることは最も適当していると考えられる。したがって、本論文においては菌集落数100までと(十)は発育阻止効果あり、(H)及び(III)は発育阻止効果なしと仮定して検討したい。

第1節 実験Iの場合(表3)

1, RFP 単独作用: 24時間週2回及び週1回という間歇作用方式では共に第11管まで発育阻止効果がみられた。発育阻止最低濃度(以後MICと略す)は0.098 mcg/mlであった。他方、連続作用の場合第12管まで効果があり、MICは0.049 mcg/mlであった。RFPの場合、間歇作用と連続作用との差はわずか2倍である。

2, SM 単独作用: SM 連続作用では第11管まで、24時間週2回作用では第8管まで発育阻止効果をもとめた。そして24時間週1回作用では本実験に用いた最高濃度でも菌発育があり阻

止効果はみられなかった。MICは上記の順にそれぞれ0.975, 7.81, >1000 mcg/mlであった。24時間週2回間歇作用及び週1回間歇作用と連続作用との差はそれぞれ8倍及び>2¹¹(2048)倍であった。

3. INH 単独作用: 連続作用, 24時間週2回及び週1回間歇作用のMICはそれぞれ第17管, 即ち0.015 mcg/ml, 第15管, 即ち0.0608 mcg/ml, そして第7管, 即ち15.63 mcg/mlであった。24時間週2回及び週1回間歇作用と連続作用との差はそれぞれ4倍及び2¹⁰(1024)倍であった。

以上の成績から、何れの薬剤においてもその効果は間歇作用が連続作用に比して劣っているが、RFPの場合は差が極めて小さいのが著明であり、SM, INHの場合には薬剤作用時間が短くなるにつれ効果が減弱する傾向をみとめ、SMの場合その傾向が最も著明であった。

以上、実験Iの成績からRFPは短時間間歇的な作用方式でもINH, SMに比べてはるかに強い発育阻止力を発揮することがわかったため、更に短い接触時間を設定して実験を行なった。したがってSM, INHについては24時間週2回及至1回間歇作用でも連続作用に比し著明な効果の減弱を認めたので更に短時間間歇

表3 結核菌発育阻止効果(実験I)

薬剤作用方法	薬剤名	試験管番号 第1管濃度 mcg/ml	試験管番号																			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
連 続	RFP	100																				
	SM	1000																				
	INH	1000																				
24時間 週2回	RFP	100																				
	SM	1000																				
	INH	1000																				
24時間 週1回	RFP	100																				
	SM	1000																				
	INH	1000																				

薬剤濃度: 第2管から第19管まで倍教稀釈法による(第20管薬剤非含有培地)

結核菌発育の程度 ■ (H) ▨ (+) □ 肉眼的発育なし

表4 結核菌発育阻止効果 (実験II)

薬剤作用方法	薬剤名	試験管番号 第1管濃度 mcg/ml	試験管番号																			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
連続	RFP	100																				
3時間週2回	RFP	100																				
1時間週2回	RFP	100																				
1時間週1回	RFP	100																				

薬剤濃度：第2管から第19管まで倍數稀釈法による(第20管 薬剤非含有培地)

結核菌発育の程度 (++) (+) 肉眼的発育なし

作用という実験群を構成しなかった。この際、当然対照薬剤をおく必要は認められない。

第2節 実験IIの場合 (表4)

1. RFP 3時間週2回作用による菌発育阻止効果：この場合、MICは第7管、即ち1.56 mcg/mlであった。連続作用との差は32倍であった。なお、実験IにおけるRFP 24時間週2回及び週1回作用との差は16倍である。

2. RFP 1時間週2回作用による菌発育阻止効果：この場合のMICは第6管、即ち3.13 mcg/mlであった。連続作用との差は2⁶(64)倍であり、3時間週2回間歇作用との差はわずか2倍であった。なお、実験Iにおける24時間週2回及び週1回間歇作用との差は32倍である。

3. RFP 1時間週1回作用による菌発育阻止効果：この場合のMICは第4管即ち、12.5 mcg/mlであった。1時間週2回間歇作用との差は4倍である。以上、実験IIにおける成績を示したのが表4である。

表5 結核菌発育阻止最低濃度 (実験I)

薬剤作用時間	薬剤数		
	単独	単独	単独
薬剤名	RFP	SM	INH
連続	0.049	0.975	0.015
24時間週2回	0.098	7.81	0.061
24時間週1回	0.098	>1000	15.63

菌集落数100迄、及び(+)は発育阻止力あり、(++), (++)は発育阻止力なしとみなした場合。(表中の数字は mcg/ml を示す)

以上の実験成績から、RFPは3時間、1時間という極めて短時間の間歇作用によっても、なおかなり強力な結核菌に対する発育阻止効果を発揮し、かつ連続作用ならびに24時間週2回及至週1回間歇作用の場合と比較して、阻止力の減弱は比較的軽度であった。

即ち、RFPはin vitroでは連続作用と間歇作用との差が非常に小さく、かつ極めて短時間の作用でもかなり強力な結核菌発育阻止効果を示す薬剤である。以上の成績から菌発育阻止最低濃度をまとめて、表5及び表6とした。

考 按

第1節 実験条件及び実験方法に対する考察

本実験に使用したSilicone-coated Slide Culture法(SSC法、シリコン被覆スライド培養法)^{4,6)}は当研究室で考察された方法で、結核菌が油水系界面に吸着される現象を利用して、油性の物質Siliconeで被覆したSlideを応用した

表6 結核菌発育阻止最低濃度 (実験II)

薬剤作用時間	薬剤数	RFP
	単独	
薬剤名		
連続		0.049
3時間週2回		1.56
1時間週2回		3.13
1時間週1回		12.5

菌集落数100迄、及び(+)は発育阻止力あり、(++), (++)は発育阻止力なしとみなした場合。(表中の数字は mcg/ml を示す)

結核菌培養法である。スライドへの菌の定着が極めて良好なため、スライドからの菌の脱落という従来のスライド培養法にみられた現象が殆んど起こらないという特徴をもっている。

従ってスライド上に培養された結核菌は、肉眼的判定が可能なまで増殖してもスライドから脱落せず、固形培地での判定と同様、スライド上の集落の算定を肉眼的にも行ない得る。又、スライド上の結核菌及びその集落は過大な発育、機械的な払拭、脂肪溶剤による洗滌等を加えない限り普通の細菌学的操作では脱落し難いので結核研究の分野に種々応用範囲の広いことが示されている。SSC法において、スライドへの菌附着（接種）にあたり、(1)単孤菌化、(2)菌附着の均等性、(3)接種菌量の均一性、等々を満足させるための菌液作成方法がいろいろと検討された。

辻、山本⁷⁾は結核菌の分散媒として脂肪溶剤が極めて良好で、この中に分散させられた結核菌は殆んど単孤菌に近い状態になること、更に脂肪溶剤の中で結核菌に対する障害作用は石油ベンジンが最も弱いこと、そして石油ベンジン菌液を用いると結核菌がスライドに附着し易いことを証明し、スライド培養法における石油ベンジン菌液の利用を提唱し、その優秀性は広く評価されている。従ってこれらの方法を組合せて用いれば、間歇投与法、換言すれば菌と薬剤とが間歇的に接触するような作用方式の実験を *in vitro* で比較的簡易に行なうことができるのである。特に今回行なった試験管内実験の様に極めて短時間薬剤を作用させるような場合にはこれほど最適の実験方法は他に類をみない。しかもこの方法によれば薬剤作用期間が1か月以上に及んでも実験操作は可能である。

本実験は比較実験であるから、実験条件は総て同一でなければならない。SSへの菌の附着数、石油ベンジンによる影響、生理的食塩水で洗滌する際に菌が脱落するか否かの検討が必要となる。内藤ら⁸⁾はSSへの結核菌の附着に影響する諸因子に関する検討を行なっている。菌液濃度について、濃度が低くなるにしたがって、成績判定の際の誤差が大きくなる可能性が

あるのでやむを得ない場合以外は 0.1 mg/ml 以上の菌液濃度で諸実験を行なうのがよいとされている。なお附着菌量と薬剤効果の関係については久世の報告⁹⁾があり、SSC法では菌量による影響はあまり認めないとされている。薬剤作用温度は 37°C としたが、実験操作中には一時的に 37°C 以下になることは避け難いけれども、すべてのSSができる限り同じ条件になる様に連続作用群も生理的食塩水で洗滌し、同じくらいの時間室温に曝すように留意した。

第2節 諸家の報告との比較考察

RFPの結核菌に対する試験管内抗菌力について、久世ら¹⁰⁾は H₃₇R_v 株に対する RFP の MIC は Kirchner 培地で 5 mcg/ml と報告している。杉山ら¹¹⁾は H₃₇R_v 株に対する RFP の MIC は Kirchner 半流動培地で 1 mcg/ml としている。又、岡ら¹²⁾によれば H₃₇R_v 感性菌に対する RFP の MIC は Dubos 液体培地で 0.1 mcg/ml とされている。豊原¹³⁾によれば、RFP の MIC は Kirchner 半流動寒天培地では 0.5 mcg/ml とされている。

著者の行なった実験成績では RFP の MIC は 10% 牛血清加キルヒナー培地では 0.05 mcg/ml であった。

さて、試験管内における間歇投与法の検討は A. R. Armstrong の報告¹⁴⁾、池田の報告⁵⁾などにみられるが数少ない。これはおそらく抗結核剤の試験管内間歇投与による実験が従来の細菌学的手段では方法論的に非常に困難であったためであろう。A. R. Armstrong は Millipore Chamber なる実験装置を考案使用した。この装置では一種の Membrane filter を使用し、この Membrane を通して薬剤含有培地及び薬剤非含有培地の交換を行ない、6日間の薬剤作用後に Membrane 上に発育した菌集落を肉眼的ならびに顕微鏡的に観察している。この方法では装置及び操作が複雑となり、大規模な比較実験では非常な労力を必要とする。Armstrong の Millipore Chamber 装置を用いた INH 単独作用の実験成績では、発育阻止効果、殺菌効果共連続作用法が間歇作用法より優れているとい

う。また池田の INH を中心とした抗結核剤の単独及び併用作用法に関する Silicone-Coated Slide Culture 法を用いた実験成績では、薬剤の種類、作用方式等により、程度の差はあるが、連続作用法は間歇作用法より劣ることはなく、むしろ明らかに優れている場合もあるという。

また、臨床的に RFP 毎日投与法と1週2日投与法とを比較した、東海北陸地区国療共同研究班による報告¹⁵⁾があるが、これによれば準単独といえる条件で RFP 毎日法と間歇法の臨床効果を比較して得られた成績は、菌陰転率、菌陰転までの期間、X線像改善率の各項目について、毎日法の方が間歇法よりもよい数値を示した。しかし、両者の間に有意差はなかったため、この成績からただちに毎日法の方がすぐれていると結論するわけにはいかないとしている。又、鈴木¹⁾によれば、マウス実験的結核症に対する RFP 間歇投与について、RFP 投与量 2 mg/kg で週2日法と毎日法の効果比較の場合、2 mg/kg 毎日は 2 mg/kg 週2日より効果大であったとされており、更に又、RFP 投与量3段階で実験しているが、20, 10, 5 mg/kg で週2日法と毎日法の効果を比較すると、20 mg/kg 毎日 > 20 mg/kg 週2日 > 10 mg/kg 毎日 ≒ 10 mg/kg 週2日 = 5 mg/kg 毎日 > 5 mg/kg 週2日であった、とされている。

他方、L. Verbist²⁾ はマウス実験的結核症に対する RFP の単独間歇投与の効果を検討しているが、それによると、まず RFP を3つの投与群、即ち 50 mg/kg 週1回投与、25 mg/kg 週2回投与、10 mg/kg 週5回投与とし、これらの投与形式でそれぞれ感染後11日目から治療を開始し、20週にわたり治療し、その間経時的にマウスの生存数を記録している。その結果、RFP 50 mg/kg 週1回投与群は 25 mg/kg 週2回分割投与群や 10 mg/kg 週5回分割投与群より優れた治療効果を発揮したと報告している。ところが同時に行なった INH による単独間歇治療実験では INH 5 mg/kg 週5回投与群は 25 mg/kg 週1回投与群より優れた効果を発揮したと報告している。この点、RFP は大量週1回投与の方が優れ、INH では週5回分割投

与の方が優れているといえる。更に、L. Verbist²⁾ は RFP 単独投与量をいろいろと変えた場合、及び間歇投与方式を2週毎1回投与、週1回投与、週5回投与と変えた場合についても報告している。実験的結核症のマウスの全肺組織中生菌数の平均値を経時的に調べて効果を判定しているが、RFP 100 mg/kg 週1回投与群は 50 mg/kg 週1回及び 25 mg/kg 週1回投与群より優れた効果を発揮したと報告している。そしてまた、100 mg/kg 週1回投与群 > 50 mg/kg 週1回投与群 > 100 mg/kg 2週毎1回投与群 > 20 mg/kg 週5回投与群 > 10 mg/kg 週5回投与群の順に治療効果を発揮したと報告している。即ち、RFP 間歇投与による殺菌効果は投与量を増すにつれ強力となり、RFP の週1回大量投与群は、同一量を分割して投与した群より優れた効果を発揮したことになる。

結 語

シリコン被覆スライド培養法を用いて、RFP について単独の連続投与法と間歇投与法との効果を発育阻止効果の面から比較検討した。

1. RFP 24時間週2回及び週1回間歇作用の場合、MIC は 0.098 mcg/ml であった。連続作用の場合 MIC は 0.049 mcg/ml で差はわずか2倍であった。これに対し、対照とした SM では同一の条件で実験を行ない24時間週2回間歇作用の場合 MIC は 7.81 mcg/ml で、更に24時間週1回間歇作用では MIC は >1000 mcg/ml と効果は著明に減弱した。他方、SM 連続作用の MIC は 0.975 mcg/ml であったから、間歇作用との差は8倍及び >2¹¹ 倍である。

INH についても同一条件で実験を行なったのであるが、24時間週2回及び週1回間歇作用の場合の MIC はそれぞれ 0.0608, 15.63 mcg/ml であり連続作用の場合、MIC は 0.015 mcg/ml であったから間歇作用との差はそれぞれ4倍及び 2¹⁰ 倍であった。

以上のように、SM, INH の場合には薬剤作用時間が短くなるにつれ効果が著しく減弱する傾向をみとめたが、RFP では間歇作用と連続作用との差が極めて小さかった。

2. RFP 3時間週2回間歇作用, 更に短時間作用で1時間週2回及び週1回間歇作用実験では MIC が上記の順にそれぞれ 1.56, 3.13, 12.5 mcg/ml であり, これらの間に著しい差はみられず, 連続作用の場合と比較しても32倍~256倍である。したがって RFP は in vitro では連続作用と間歇作用との差が非常に小さく, 極めて短時間の作用でもかなり強力な発育阻止効果を発揮する薬剤である。

本論文の要旨は第38回日本結核病学会近畿地方会(昭和47年10月7日, 京都), 第48回日本結核病学会総会(昭和48年4月2日, 福岡)において発表した。

稿を終るに臨み, 直接研究面で御教導下さった池田博士, 並びに教室の諸先生方, 教室員の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 鈴木敏弘: 結核, 46: 6, 153~16, 1971.
- 2) Verbist: L. Pneumonologie, Supplement (31.

- XII): 31, 1970.
- 3) 佐野光司他: リファジン文献集 Vol. 1 (基礎編), 第一製薬, 1, 昭46.
- 4) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3, 増刊1号, 461, 昭34.
- 5) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12-1, 21, 1963.
- 6) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3, 増刊2号, 22, 昭34.
- 7) 山本 寿: 京大結研紀要, 3-1. 49. 昭29.
- 8) 内藤益一他: 京大結研紀要, 12-2, 112, 昭39.
- 9) 久世文幸他: 京大結研紀要, 12-2, 97, 昭39.
- 10) 久世彰彦他: 日胸, 29:12, 1970.
- 11) 杉山浩太郎他: リファジン文献集 Vol. 1 (結核編), 第一製薬, 186, 昭46.
- 12) 岡捨己他: 日胸, 30: 2, 79, 1971.
- 13) 豊原希一: 結核, 46: 6, 211, 1971.
- 14) Armstrong A. R.: Amer. Rev. Tuberc., 81: 4, 498, 1960.
- 15) 横内寿八郎他: 日胸, 31:8, 638, 1972.

第2篇 殺菌効果について

緒 言

第1篇ではシリコン被覆スライド培養法^{1,2)}を用いて RFP, SM, INH について, 連続投与方法と間歇投与方法(特に短時間間歇投与方法)との効果を発育阻止効果の面から比較検討した。

間歇法の理論について, 束村³⁾は SM が登場した際に次のような観察を行なった。即ち, SM と抗酸菌とを接触させると, SM を洗い落しても菌はすぐに発育できず発育が開始されるまでに数日間の lag time が必要である。この lag time の長さは接触した SM の濃度によって左右され, 一般に SM の濃度が高いほど発育が再開するまで時間がかかる。lag time は菌の傷害を回復するまでの時間と解釈された。この観察は鳥型結核菌調株を用いてグリセリン

ブイヨン(pH 7.0, 3%)で実験されている。以上のごとく, 間歇投与方法は bactericidal action を強く有する薬剤を用いればかなり有効と考えられる。

Mitchison⁴⁾も間歇療法について細菌学的観察を行なって, 間歇投与の間隔は薬剤と接触して発育の止まった菌が, 薬剤がなくなっただけでも発育しないでいる期間にかかっているとのべている。

RFP の間歇投与が有効である可能性は, Grumbach, Canetti, Le Tirzin⁵⁾の動物実験で示唆されている。即ち, マウスを用いた実験で, 先ず RFP+INH, RFP+EB, INH+EB を毎日投与方法と週2回及び週1回間歇投与方法とで比較検討した結果, 間歇投与方法でも連続投与方法でも最も有効であったのは RFP+INH と

されている。しかもこの Combination については、週2回投与方法による効果と連日投与方法による効果とはほぼ同じ程度であったと報告されている。更に、①RFP+INH+SM（4ヶ月、毎日）②RFP+INH+SM（1ヶ月毎日、3ヶ月週2回）③RFP+INH+SM（1ヶ月毎日）+INH+SM（3ヶ月週2回）④INH+SM（4ヶ月、毎日）⑤INH+SM（1ヶ月毎日、3ヶ月週2回）の5グループについて動物実験を行ない、肺及び脾 (total organ) から分離された菌集落数をみた結果、②RFP+INH+SM（1ヶ月毎日、3ヶ月週2回）の効果が優れていたことをのべている。

また、Batten^{6,7)}もRFPの間歇療法が有効である可能性をマウスの実験で示唆しているし Dickinson, Mitchison⁸⁾は同様な点を試験管内実験で示唆している。

更に、L. Verbist⁹⁾はマウス実験的結核症に対するRFPの単独間歇投与の効果を検討しているが、それによると、まずRFPを3つの投与群、即ち①50 mg/kg 週1回投与、②25 mg/kg 週2回投与、③10 mg/kg 週5回投与とし、これらの投与形式でそれぞれ感染後11日目から治療を開始し、20週にわたって治療し、その間経時的にマウスの生存数を記録している。その結果、RFP 50 mg/kg 週1回投与群は25 mg/kg 週2回分割投与群や10 mg/kg 週5回分割投与群より優れた治療効果を発揮したとのべている。ところが、同時に行なったINHによる単独間歇治療実験では、INH 5 mg/kg 週5回投与群はINH 25 mg/kg 週1回投与群より優れた効果を発揮したと報告している。この点、RFPは大量週1回投与の方が優れ、INHでは比較的少量による週5回分割投与の方が優れているといえる。更に、VerbistはRFP週1回単独投与方法についてRFP単独投与量をいろいろと変えた場合、及び間歇投与方式を2週毎1回投与、週1回投与、週5回投与と変えた場合についても報告している。それによると、RFP間歇投与による殺菌効果は投与量を増すにつれ強力となり、RFPの週1回大量投与群は同一量を分割して投与した群より優れた効果を発揮

したことになる。

一般に薬剤は結核菌の増殖が盛んな時ほど即ちresting cellよりもgrowing cellに対して、より強力な殺菌効果を発揮することが知られている。

従って薬剤を連続的に作用させるよりも間歇的に作用させる方がより大きい殺菌効果を期待できる可能性がある。ところが、抗結核剤の殺菌効果についてのin vitroでの間歇的作用実験は方法論的な困難さからあまり数多くなされていないようである。

前篇でもふれたように、シリコン被覆スライド培養法は“シリコンスライドに附着した結核菌乃至その集落は普通の細菌学的操作では殆んど脱落しない”という特徴によって、間歇的作用の殺菌効果の検討を可能ならしめた。即ち本法によれば、スライド上の菌単位数は実験開始から判定まで略一定であるため殺菌効果を定量的に判定でき、また薬剤の除去は菌附着スライドを生理的食塩水その他の洗滌水中で洗うことにより極めて容易に遂行できる。

化学療法剤では、一般に発育阻止力が極めて強いために殺菌力検査に際してその薬剤の発育阻止作用を何らかの方法で除去しなければならない。しかし従来の実験方法では大量の検体を処理することは実験操作上極めて困難である。更に長期間にわたる薬剤作用期間中には徐々に自然耐性菌の増殖が始まり、結果としては最初の菌のうち何%が殺菌されたかというような定量的な判定が著しく困難となる。

これらの難点はすべてシリコン被覆スライド培養法を利用することによって、解決することができる。

なお、本実験では実験の性質上細菌がその試験管内増殖能を失なうという意味で「殺菌」という語を使用した。

実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

試験管、シリコン被覆スライド、菌株、菌液及び菌接種方法、培地、被検薬剤等はすべて第

表1 実験群の構成 (実験 I)

作用時間	薬剤数	薬剤名	薬 剤 濃 度
連 続	単独	RFP	第1管 100 mcg/ml, 以後第19管まで倍数希釈
		SM	// 1 mg/ml, //
		INH	// 1 mg/ml, //
24時間 週 2 回	単独	RFP	// 100 mcg/ml, //
		SM	// 1 mg/ml, //
		INH	// 1 mg/ml, //
24時間 週 1 回	単独	RFP	// 100 mcg/ml, //
		SM	// 1 mg/ml, //
		INH	// 1 mg/ml, //

1 篇と同様である。

第2節 実験条件及び実験方法

薬剤作用温度：37°C とした。

実験群の構成：実験 I に於ては作用時間を任意に選んだ。実験群の構成は第1 篇と全く同様に表1 に示す通りである。

実験 I：①24時間週 2 回間歇作用，②24時間週 1 回間歇作用

これらの間歇投与方法による殺菌効果と連続投与方法による殺菌効果とを比較検討した。

RFP に対する対照薬剤として SM, INH を用いた。

実験 I

実験には第1 篇でのべた小試験管，シリコン被覆スライドを用い，薬剤濃度は第1 篇と全く同様である。

実験操作：第1 篇でのべた実験操作に引き続いて行なうのであるが，第1 篇の実験で4 週間薬剤を作用させた後殺菌効果を検討するためにシリコンスライド (SS) を生理的食塩水で洗滌し，間歇作用群及び連続作用群ともにすべての SS を薬剤非含有培地に移し，更に4 週間，37°C で培養した。殺菌効果の判定時期は SS を薬剤含有培地から薬剤非含有培地へ移して更に4 週間培養後とした。

判定方法は第1 篇即ち，結核菌発育阻止効果判定の場合と同様に，SS 上に発育した菌集落

表2 実験群の構成 (実験 II)

作用時間	薬剤数	薬剤名	薬 剤 濃 度
連 続 3時間 週 2 回	単独	RFP	第1管 100 mcg/ml, 以後第19管まで倍数希釈
	単独	RFP	// //
1時間 週 2 回	単独	RFP	// //
	単独	RFP	// //

を肉眼的に観察し，菌集落が SS 表面の 2/3 以上を被う時，(≡)，同じく 1/3~2/3 の時(+)，1/3 以下の時 (十) とした。なお菌集落が100 以下の場合は (十) とせず大略その数を記録した。

実験 II

実験群の構成は第1 篇，実験 II と同様に表2 に示す通りである。

被検薬剤は RFP のみで実験材料，実験方法及び実験操作と判定方法は実験 I と全く同様である。

実験成績及びその比較検討

実験 I 及び II における判定成績を総括したのが表3 及び表4 である。

判定成績をいかなる基準で比較検討すべきかは第1 篇でのべた。その考え方にもとづいて，(+)迄殺菌効果あり，(+)及び(≡)は殺菌効果なしと仮定して各実験群を比較検討したい。このような条件で殺菌最低濃度を mcg/ml により表示したのが表5 及び表6 である。

第1節 実験 I の場合 (表3)

1. RFP 単独作用：24時間週 2 回及び週 1 回作用という間歇作用では，それぞれ第10管及び第7 管まで殺菌効果をもとめた。殺菌最低濃度はそれぞれ 0.195 mcg/ml 及び 1.56 mcg/ml であった。他方，連続作用では殺菌最低濃度が第11管即ち，0.098 mcg/ml であったから，24 時間週 2 回及び週 1 回間歇作用と連続作用との差はそれぞれ2 倍及び16倍である。なお，週 2 回間歇と週 1 回間歇作用との差は8 倍であった。

2. SM 単独作用：SM 連続作用では殺菌最

表3 殺菌効果 (実験I)

薬剤作用方法	薬剤名	第1管濃度 mcg/ml	試験管番号																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
連 続	RFP	100																				13	
	SM	1000	100	20																			
	INH	1000				1	10	10	10	30	20	25	50	25		20							
24時間 週2回	RFP	100							17														
	SM	1000																					
	INH	1000				25																	
24時間 週1回	RFP	100		1	6	17	35	10															
	SM	1000																					
	INH	1000																					

薬剤濃度：第2管から第19管まで倍数希釈法による。(第20管薬剤非含有)

結核菌発育の程度 ■ (++) ▨ (++) ▩ (+) □ 肉眼的発育なし
数字(□□ニ一数)

表5 殺菌最低濃度 (実験I)

薬剤作用方法	薬剤数		
	単 独	単 独	単 独
薬剤名	RFP	SM	INH
連 続	0.098	7.81	0.0304
24時間週2回	0.195	1000	1.95
24時間週1回	1.56	>1000	>1000

菌集落数100迄，及び(+)は殺菌効果あり，(++)，(++)は殺菌効果なしとみなした場合。(表中の数字は mcg/ml を示す)

低濃度は第8管即ち，7.81 mcg/ml であり，24時間週2回及び週1回間歇作用では殺菌最低濃度はそれぞれ1000及び>1000 mcg/mlであった。SMでは連続作用時に比べ間歇作用では殺菌効果が著明に減弱したことを示す。

3. INH 単独作用：連続作用による殺菌最低濃度は第16管即ち，0.0304 mcg/ml であり，24時間週2回及び週1回間歇作用による殺菌最低濃度は1.95及び>1000 mcg/mlであった。24時間週2回作用と連続作用との差は2⁶(64)倍であった。24時間週1回間歇作用では殺菌効果は著明に減弱された。

以上の成績から，殺菌効果について，間歇作用と連続作用との差が最小の薬剤はRFPであり，次いでINHであり，SMはその差が最も

大きな薬剤であった。以上，実験Iにおける成績を示したのが表3である。

前篇で既に記したことであるが，SM，INHについては24時間週2回及び週1回間歇作用でも著明な殺菌効果の減弱を認め，従ってそれより短時間の間歇作用実験を行なっても上記以上の殺菌効果を期待できそうもないので，更に短時間間歇作用という実験群を構成しなかった。この際当然対照薬剤をおく必要は認められない。

第2節 実験IIの場合 (表4)

1, RFP 3時間週2回間歇作用による殺菌効果：殺菌最低濃度は第4管即ち 12.5 mcg/ml で連続作用，24時間週2回及び週1回間歇作用との差はそれぞれ順に2⁷(128)倍，64倍，8倍である。これほど短時間間歇作用でもRFPの殺菌効果はin vitroでなおよく保たれていることになる。

2, RFP 1時間週2回間歇作用による殺菌効果：殺菌最低濃度は第5管即ち 6.25 mcg/ml であった。3時間週2回間歇作用とほぼ同様の殺菌効果を示している。

3, RFP 1時間週1回間歇作用による殺菌効果：殺菌最低濃度は第3管即ち，25.0 mcg/ml であった。3時間週2回及び1時間週2回間歇

表4 殺菌効果 (実験Ⅱ)

薬剤作用方法	薬剤名	第1管濃度 mcg/ml	試験管番号																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
連 続	RFP	100																				13	
3時間週 2回	RFP	100	1	6	50																		
1時間週 2回	RFP	100		2	8	30																	
1時間週 1回	RFP	100	30	50																			

薬剤濃度：第2管から第19管まで倍数希釈法による。(第20管薬剤非含有)

結核菌発育の程度 ■ (++) ▨ (+) ▩ (+) □ 肉眼的発育なし
数字(□○一二数)

表6 殺菌最低濃度 (実験Ⅱ)

薬剤作用方法	薬剤名	薬剤数	
		単	独
		RFP	
連 続		0.098	
3時間週 2回		12.5	
1時間週 2回		6.25	
1時間週 1回		25.0	

菌集落数100迄、及び (+) は殺菌効果あり、(++) は殺菌効果なしとみなした場合。
(表中の数字は mcg/ml を示す)

作用に比べ、やや殺菌効果の減弱をみとめたものの、これほど極めて短時間間歇作用でもなおかなり強い殺菌効果を発揮している。以上、実験Ⅱにおける成績を示したのが表4である。

考 按

第1節 諸家報告との比較考察

Dickinson, Mitchison⁸⁾ は RFP の試験管内間歇作用実験を行なっているが、それによると、結核菌 (H₃₇R_v 株) を 7H9 Tween albumin medium に培養し logarithmic phase に Rifampicin (RFP) 0.2 mcg/ml を種々の時間作用させ、作用中及び作用後それぞれ cellulose membrane filter で濾過し洗滌 (washing) を行ない生菌単位数を計測している。その結果、RFP は INH 1 mcg/ml 作用、或いは SM 5 mcg/ml 作用に比較して、最初の24時間作用において、より強い殺菌効果を示したとのべてい

る。そして RFP を作用させた後の lag period は他の bactericidal drugs を作用させた後よりも短時間であったとされている。更に彼らは guinea pig を用いて実験結核症を起し、RFP で治療を行ない、6週間治療を行ない投与量を変えて実験している。1日、2日、4日或いは8日間隔で投与し、それらによる反応或いは効果を肉眼的病変の程度及び脾における生菌単位数の算定によってみている。これらの in vivo 及び in vitro の実験を通じて RFP が他の抗結核剤に比べて間歇投与による効果の優れて期待できる、適当な薬剤でありうる可能性を示唆している。

第2節 発育阻止最低濃度と殺菌最低濃度との関係について

発育阻止最低濃度と殺菌最低濃度との差が大きいほど発育阻止効果に比べ殺菌効果が弱いことを示している。この場合、薬剤使用中は菌の増殖を認めなくとも薬剤作用終了後に再び菌増殖が起り易いことを示している。即ち臨床上では再発・悪化という問題と結びつく可能性がある。

発育阻止最低濃度と殺菌最低濃度との差を各実験群について倍数 (薬剤濃度について) で示したのが表7 (実験Ⅰ) 及び表8 (実験Ⅱ) である。

この見地から表7及び表8をみると、RFP が極めて殺菌力が強いことを示している。次いで INH が強い殺菌力を示し、SM は殺菌力が

表7 発育阻止最低濃度と殺菌最低濃度との関係 (実験 I)

薬剤	作用方法	薬剤名	mcg/ml		差 (倍数)
			発育阻止最低濃度	殺菌最低濃度	
連 続		RFP	0.049	0.098	2
		SM	0.975	7.81	8
		INH	0.015	0.0304	2
24時間週 2回		RFP	0.098	0.195	2
		SM	7.81	1000	128
24時間週 1回		INH	0.061	1.95	32
		RFP	0.098	1.56	16
		SM	>1000	>1000	
		INH	15.63	>1000	>128

表8 発育阻止最低濃度と殺菌最低濃度との関係 (実験 II)

薬剤	作用方法	薬剤名	mcg/ml		差 (倍数)
			発育阻止最低濃度	殺菌最低濃度	
通 続		RFP	0.049	0.098	2
3時間週 2回		RFP	1.56	12.5	16
1時間週 2回		RFP	3.13	6.25	2
1時間週 1回		RFP	12.5	25.0	2

弱いことを示している。更に INH, SM では薬剤作用時間が短くなるにつれ殺菌力の低下が著明になる傾向があるが、これに対し RFP では極めて短時間の間歇作用でもなお強力な殺菌力を発揮することが示された。

第3篇 薬剤耐性獲得について

緒 言

前篇ではシリコン被覆スライド培養法^{1,2)}を用いて新抗結核剤 RFP の抗結核性を SM, INH を対照薬剤として、連続作用法と極めて短時間の間歇作用法との効果を殺菌効果の面から

結 語

新しい抗結核剤 RFP は SM, INH と比較して in vitro では連続作用と間歇作用との差が非常に小さく、極めて短時間の作用でもなおかなり強力な殺菌効果を発揮する薬剤である。

本論文の要旨は第38回日本結核病学会近畿地方会 (昭和47年10月7日, 京都), 第48回日本結核病学会総会 (昭和48年4月2日, 福岡) において発表した。

撰筆するに当り、直接研究面で御教導下さった池田博士、並びに教室の諸先生方に深甚の謝意を表します。

又、長期間御助力頂いた教室員の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 東向一郎：京大結研紀要，7-3，増刊1号，461，昭34.
- 2) 東向一郎：京大結研紀要，7-3，増刊2号，22，昭34.
- 3) 東村道雄：医学と生物学，22:1，41~43，1952.
- 4) Mitchison: British Medical Journal, 1: 1333-1340, 1965.
- 5) Grumbach, Canetti, Le Lirzin: Tubercle, 50, 280-293, 1969.
- 6) Batten, J. C.: Tubercle, 50, 294-298, 1969.
- 7) Batten, J. C.: Tubercle, 51, 95-99, 1970.
- 8) Dickinson, Mitchison: Tubercle, 51, 82-94, 1970.
- 9) Verbist L.: Pneumonologie, Supplement (31 XII), 31, 1970.

比較検討したが、化学療法の実験は生体内に存在する病原菌の一掃であろう。結核化学療法剤による生体内滅菌療法という化学療法の実験に一步でも近づくために、新しい薬剤の探求と平行して、現在の化学療法剤のより合理的な投与方式の探求に一層の努力を捧げねばならない。

さて、試験管内においてさえ、抗結核剤によってすべての結核菌を死滅させることはかなり困難なことであるが、このことは抗結核剤による生体内殺菌の難かしさを如実に示唆するものである。この生き残った菌が薬剤に対して感性であるか、耐性であるかは特に臨床上、治療効果に重大な関係がある。

ところで、研究室の今井³⁾は結核菌のINH耐性獲得の問題を薬剤作用環境と薬剤濃度との点から追求した。即ち、試験管内において結核菌発育に適、不適の環境として培地組成・保存温度を変えて、培地内に種々の濃度のINHを含有せしめて培養し、その耐性獲得の状況を比較検討した結果、耐性獲得は菌増殖に好都合な環境ほど早くかつ高度であるが、それぞれの環境に応じて耐性を獲得し易い至適薬剤濃度が存在し、それ以上でも或いはそれ以下でも耐性上

昇は阻止される傾向を認めている。即ち、結核化学療法において、菌の薬剤耐性上昇を阻止する方法としては、徒らに薬剤の量を減じるより、むしろ積極的に量を増す方向をも考慮すべきであると示唆したのである。

著者は新しい抗結核剤 RFP の連続投与と間歇投与とによって、結核菌の RFP に対する耐性発現に何らかの差があらわれるものかどうかについて試験管内実験により比較検討した。

実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

試験管、シリコン被覆スライド（以下SSと略す）、菌株、菌液及び菌接種方法、培地はすべて第1篇と同様である。被検薬剤は Rifampicin (RFP) である。なおこれらの他に増菌用に1%小川培地を使用した。

表1 RFP 耐性検査成績 (3時間週2回作用群)

RFP (試験管番号) 作用濃度	耐性検査濃度 (試験管番号)	第1管濃度: RFP 2mcg/ml 以後第9管まで倍数希釈 第10管は対照培地													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K				
第1管濃度 100 mcg/ml 第2管から第19管 まで倍数希釈 第20管は対照培地	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
	8														
	9														
	10														
	11														
	12														
	13														
	14														
	15														
	16														
	17														
	18														
	19														
	K														

結核菌発育の程度 □ 肉眼的発育なし (●) (+) (■) (++) (■) (+++)

数字(□□ニ一数)

第2節 実験条件及び実験方法

第1篇記載の方法によって発育阻止効果を判定し、更に第2篇の方法によって殺菌効果を判定し、この殺菌効果判定の際にみとめられた菌集落について、RFP に対する耐性検査を行なった。

実験群の構成：① RFP 3時間週2回間歇作用，② RFP 24時間週2回間歇作用，③ RFP 連続作用，の3群について、それぞれ RFP 耐性検査を行なった。

実験操作：第2篇の実験にひきつづいて、上記3群において、菌集落の発育したSSを小試験管に入れた約2mlの石油ベンジン中に投入し、SS上の全集落より石油ベンジン菌液をつくり、その菌液約0.3mlを1%小川培地に流し、増菌した。ただしSS上に発育した菌集落が極めて少数の場合は、SSを直接1%小川培

地上に密着することによって菌集落を増菌に供した。こうして4週間後、1%小川培地上に発育した菌集落で耐性検査を行なった。耐性検査は当研究室、松島⁴⁾の方法に準じた。即ち、1%小川培地上に発育した結核菌集落に石油ベンジン液を注ぎ、ピペット操作によって集落を集め、別の試験管に移し粗大菌塊を沈殿せしめた後硫酸バリウム標準液と比色することによって約0.1mg/mlのベンジン菌液をつくった。次いでSSを池田⁵⁾の方法によってこの菌液中に瞬時浸漬した後、数秒間そのまま保持して、石油ベンジンが蒸発した後、予め用意した耐性検査培地を含む試験管内に1枚ずつSSを投入し、37°Cで培養した。

耐性検査培地：10%の牛血清加キルヒナー培地

耐性検査濃度：第1管濃度をRFP 2mcg/ml

表2 RFP 耐性検査成績 (24時間週2回作用群)

RFP作用濃度 (試験管番号)	耐性検査濃度 (試験管番号)	第1管濃度：RFP 2mcg/ml 以後第9管まで倍数稀釈 第10管は対照培地									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
第1管濃度 100mcg/ml 第2管から第19管 まで倍数稀釈 第20管は対照培地	1					■	■	■	■	■	■
	2										
	3										
	4										
	5					■	■	■	■	■	■
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
斜線：耐性検査用に 増菌できなかったもの。	11					■	■	■	■	■	
	12					■	■	■	■	■	
	13					■	■	■	■	■	
	14					■	■	■	■	■	
	15					■	■	■	■	■	
	16					■	■	■	■	■	
	17					■	■	■	■	■	
	18					■	■	■	■	■	
	19					■	■	■	■	■	
	20					■	■	■	■	■	

結核菌発育の程度 □ 肉眼的発育なし (●) (■) (■) (■)
数字(□□-数)

として、以後第9管まで倍数希釈し、第10管はRFP を含まない対照培地とした。判定時期は耐性検査培地で培養開始後第3週目とし、肉眼的観察によった。

判定方法：第1篇と同様である。

実験成績及びその比較検討

実験成績の判定基準は第1篇でのべた考え方にもとづき、(十)まで発育阻止効果あり、(++)及び(卅)は発育阻止効果なしと判定して各作用方式を検討したい。

第1節 RFP 3時間週2回間歇作用の場合

第5管 (0.125 mcg/ml) ないし第6管 (0.063 mcg/ml) で菌発育が認められたが、RFP 作用濃度の高いものから低いものまで、特に耐性上昇は認められなかった。(表1)

第2節 RFP 24時間週2回間歇作用の場合

これらについてもほぼ前節と同様の成績で耐性上昇はみとめられなかった。(表2)

第3節 RFP 連続作用の場合

RFP 0.195 mcg/ml 作用の菌株において、軽度の耐性上昇をみとめたほかは、すべて第1, 2節の実験成績とほぼ同様の成績で、特に耐性上昇はみられなかった。(表3)

考 按

岡ら⁶⁾によれば、RFP を加えた Dubos 液体培地に H₃₇R_V を継代培養して RFP に対する耐性上昇をみたところ、5代の継代培養で 100 mcg/ml の耐性菌が得られた。そして結核菌の RFP に対する耐性獲得は streptomycin 型といわれ、SM, KM と同様比較的早いとのべられ

表3 RFP 耐性検査成績 (連続作用群)

RFP 作用濃度 (試験管番号)	耐性検査濃度 (試験管番号)	第1管濃度: RFP 2mcg/ml , 以後第9管まで倍数希釈 第10管は対照培地												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K			
第1管濃度 100 mcg/ml 第2管から第19管 まで倍数希釈 第20管は対照培地	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
	6													
	7													
	8													
	9													
	10													
斜線: 耐性検査用に 増菌できなかったもの。	11													
	12													
	13													
	14													
	15													
	16													
	17													
	18													
	19													
	20													

結核菌発育の程度 □ 肉眼的発育なし (+) (++) (卅) 数字(□□二-数)

ている。堂野前ら⁷⁾も結核菌の試験管内 RFP 耐性獲得について報告しているが、それによると、RFP 耐性獲得は、初め緩やかに、後に速やかに高濃度耐性を獲得し、SM 型と表現される。更に、RFP 耐性獲得は最低発育阻止濃度以下の濃度の PAS, EB などの抗結核剤を併用することにより阻止される傾向を示すとのべている。そして4代継代にて急に RFP 耐性は上昇するようである。

岡ら⁶⁾は更に RFP に対する自然耐性結核菌の population について検討を加えているが、それによれば H₃₇R_v に含まれている RFP に対する自然耐性菌をみると、2 mg を小川培地にうえると 25 mcg/ml に発育するものが数コロニーずつあり、また 50 mcg/ml に発育するものが1コロニー発見され、ほぼ INH と同じ率で自然耐性菌が存在するものと考えられた。

豊原⁸⁾は ¹⁴C-RFP を用い RFP 感性結核菌 (H₃₇R_v) とその高度耐性菌の RFP とり込みをみたが、認むべき差はなかった。そして、この点、INH 耐性菌の INH に対するとりこみの著しい低下からみられるような細胞壁の透過性の変化はみられず、むしろ SM 耐性菌の SM のとりこみと同様の傾向であったとのべている。前後するが、自然耐性 (Natural resistance) とは (primary drug resistance) (患者体内で生じた耐性菌が他の患者に感染した場合) と異なる。

り、その薬剤が出現する前からもともと存在していた耐性のことである。

結 語

RFP 間歇作用菌株と連続作用菌株との間で RFP に対する耐性上昇の差は特にみられなかった。

本論文の要旨は第48回日本結核病学会総会 (昭和48年4月2日、福岡) において発表した。

欄筆するに当たり、直接研究面で御教導下さった池田博士、並びに教室の諸先生方、教室員の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 東向一郎：京大結研紀要，7-3，増刊1号，461，昭34.
- 2) 東向一郎：京大結研紀要，7-3，増刊2号，22，昭34.
- 3) 今井節郎：胸部疾患1:4，1~5，昭32.
- 4) 松島留蔵：京大結研紀要，8-1，増刊2号，595，昭34.
- 5) 池田宣昭：京大結研紀要，12-1，21 昭38.
- 6) 岡 捨己他：日胸，30:2，79-89，1971.
- 7) 堂野前維摩郷他：リファジン文献集 Vo. 1，基礎篇180-182，昭46.
- 8) 豊原希一：結核，46:6，211~218，1971.

STUDIES ON THE ANTITUBERCULOUS ACTIVITIES OF RIFAMPICIN (RFP) AND THE PERIOD OF EXPOSURE IN VITRO

Yasuhide URATSUJI

The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

A new antituberculous drug, rifampicin (RFP) is a semisynthetic compound belonging to the group of rifamycins that were isolated from the fermentation broth of *Streptomyces mediterranei*.

In this report, the antituberculous activities of RFP and the period of exposure were evaluated in vitro. The experiments were practiced by using the silicone-coated slide culture method (SSC-method), H₃₇Rv strain of Mycobacterium tuberculosis, Kirchner's medium, 1% Ogawa medium, silicone-coated slides, rifampicin (RFP), streptomycin (SM), and isoniazid (INH).

To obtain the microbial cell units, four week cultures of the H₃₇Rv strain of M. tuberculosis cultivated in a 1% Ogawa medium were adjusted to a density equivalent to ca. 0.1 mg/ml in petroleum benzene. Then, silicone-coated slides were dipped and attached to the petroleum benzene containing microbial cell units.

These slides with tubercle bacilli were put in test tubes containing Kirchner's media with serial concentrations of drugs. They were incubated at 37°C for four weeks.

The concentrations of drugs were compounded by serial double dilution method. Test tube No. 1 contains RFP 100 mcg/ml, SM 1000 mcg/ml and INH 1000 mcg/ml, respectively.

Test tube No. 20 is a controlled culture.

Types of drug regimen are the following.

Experiment 1

- (1) Continuous contact with 3 drugs, RFP, SM, INH, respectively
- (2) Intermittent contact with 3 drugs, 24 hours a week, respectively
- (3) Intermittent contact with 3 drugs 24 hours twice a week, respectively

Experiment 2

- (1) Continuous contact with RFP
- (2) Intermittent contact with RFP, 3 hours twice a week
- (3) Intermittent contact with RFP, 1 hour a week
- (4) Intermittent contact with RFP, 1 hour twice a week

The evaluation of bacteriostatic effect was macroscopically performed at the end of three-week incubation.

The evaluation of bactericidal effect was macroscopically performed at furthermore four-week incubation after stopped contact with drugs.

Experimental findings were the following.

Experiment 1

- (1) The bacteriostatic effects of SM and INH were remarkably weakened as the duration of contact period with drugs were shortened; on the other hand those of RFP were not and the difference of continuous and intermittent contact with RFP was very slight.
- (2) RFP was also the most effective drug in bactericidal action among three drugs. And the difference of continuous and intermittent contact with it was very slight in comparison with SM and INH.

Experiment 2

Minimal inhibitory concentrations (MIC) of intermittent contact with RFP, 3 hours twice a week; 1 hour twice a week; 1 hour a week were 1.56, 3.13, 12.5 mcg/ml, respectively, and MIC of continuous contact with RFP was 0.049 mcg/ml. In the finding of bactericidal action of RFP, slight difference of continuous and intermittent contact was still maintained.

These findings suggest that RFP has very strong bactericidal action and may be particularly

suitable for intermittent administration.

In this report, the development of drug (RFP) resistance was also evaluated. The development of drug resistance were not observed in both strains of continuous and intermittent contact with RFP.