

Griselimycine の半合成誘導体 27753RP の抗結核作用に関する試験管内実験的検討

第1編 間歇作用，短期間作用，並びに連続作用時の抗結核作用

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第一

柴 田 安 宅

(昭和59年2月3日受付)

第1章 緒 言

1944年 Waksman により Streptomycin (SM) が発見されて以来，1965年イタリアで開発された RFP に至るまで種々の抗結核薬が研究開発されてきた。現在，10数種類の抗結核薬が臨床で使用されているが，最近の研究報告では新薬の開発に関する研究より，既存の薬剤を用いる治療方式の研究が中心となっている。

しかし，isoniazid (INH) や rifampicin (RFP) を主剤とした化学療法にもかかわらず全ての症例において生体内の結核菌を絶滅させるのは困難であり，各種結核薬に耐性をもつ患者が今日も数多く存在する。これら患者の治療をいかにするかは重要な課題である。

そこで既存の薬剤の新しい組合せによる治療方式の研究とは別に前川¹⁾も述べている如く，更に強力な新抗結核薬の開発が期待されている。

1971年，フランスで2種の Streptomyces (既ち *S. coeli*us 及び *S. griseus*) から分離された抗菌剤 Griselimycine の半合成誘導体 27753 R.P. (以下 R.P. と略す) の抗結核作用については既に豊原²⁾により報告されている。それによれば，in vitro, in vivo 共に強力な抗結核作用を示している。特に in vitro では RFP を含めた既存の抗結核薬に対して交叉耐性を示していない。従ってこの R.P. は前述の期待される抗結核薬の1つとなりうる可能性が大きい。

そこで著者は教室で開発された silicone coated slide culture 法 (S.S.C. 法) を用い，さらに R.P. の持つ特性を明らかにする目的でその間歇作用，短期間作用，並びに連続作用時の結核菌発育阻止効果及び殺菌効果について検討したので報告する。

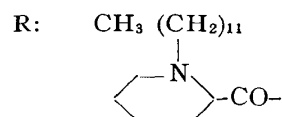
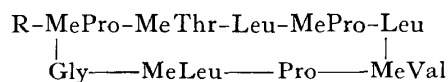
尚，R.P. の構造式は図1の如く考えられている。

第2章 実験材料及昭実験方法

第1部 実験材料

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

シリコン被覆スライド：東^{3,4)}の方法によって作製した。即ち普通のスライドガラスを縦に3切したものをクロム硫酸中に24時間浸漬後，流水中で数時間洗浄して乾燥させ，更にベンジンで洗浄した後，室温で乾燥し，これを粘度 350~500 centistokes の Dimethyl Silicone (DC



Me-Methyl, Pro-Prolin, Thr-Threonin,
Leu-Leucin, Gly-Glycin, Val-Valin,

図1

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 1～2 時間風乾し、300°C で 1 時間熱処理を加えた。

菌株：教室保存の H₃₇Rv 株で 1% 小川培地に 4 週間培養したものを使用した。

菌液及び菌接種方法：H₃₇Rv 株の菌集落に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。この菌液中にシリコン被覆スライド（以下 SS と略す）を池田⁵⁾の方法により約 2 cm の深さに瞬間浸漬して菌を付着させた。

培地：pH 6.5 の 10% 牛血清加キヒルナー培地を使用した。（以下、培地と略す）

被検薬剤：R.P., コントロール薬として SM 及び RFP を使用した。R.P. はプロピレングリコール原液で溶解希釈、SM は蒸留水で希釈、RFP はジメチルホルムアルデヒド (DFA) で溶解希釈した。

連続作用群では各々第 1 管を R.P. 50 µg/ml, SM 50 µg/ml, RFP 5 µg/ml とし、間歇作用群では各々第 1 管を R.P. 100 µg/ml, SM 100 µg/ml, とし、その後は培地を用いて倍数希釈により第 9 管までとして、第 10 管は薬剤非含有培地とした。

第 2 部 実験条件及び実験方法

1) 薬剤作用温度：37°C とした。

2) 実験群の構成：短期間作用群としては連続 1 週間作用、連続 2 週間作用、間歇作用群としては週 2 日 4 週間作用及び週 1 日 4 週間作用とした。

3) 薬剤含有培地の作製：培地を 10 管 1 系列のガラスキャップ付小試験管の第 1 管に 5.4 ml, 第 2 管以下に 3.0 ml ずつ注入し、前記の濃度になるように 10 倍濃度の薬剤希釈液の 0.6 ml を第 1 管に混和して、以後倍数希釈を第 9 管まで行ない、第 10 管は薬剤を含まない対照培地とした。

4) 菌付着スライドの作製：前述の如く、

H₃₇Rv 株の菌集落を石油ベンジンで分散させた菌液に、池田⁵⁾の方法により SS を約 2 cm の深さに瞬間浸漬して菌を付着させ、耳鼻科用ピンセットを使い各々の試験管に投入した。

5) 実験操作

① 短期間作用群

37°C で薬剤を作用させた菌付着スライドを 4 ml の生理的食塩水の入った 3 本の試験管に順次投入することで 3 回ずつ洗浄行ない付着した薬剤を除去した後、薬剤を含まない培地に移して培養した。この方法で 1 週間、2 週間、4 週間の殺菌効果を検討した。

② 間歇作用群

上記の操作を 1 週間 1 回及び 1 週間 2 回行ない、薬剤を作用させて、これを 4 週間繰返した。

一度使用した培地、薬剤希釈液、生理的食塩水などは二度と使用せず、新しく調製した。また、対照の SS も同様に生理的食塩水で洗浄した。

6) 判定方法：結核菌発育阻止効果は薬剤作用 4 週間終了時に判定した。殺菌効果は結核菌発育阻止効果判定後、生理的食塩水で 3 回洗浄し、3 ml の薬剤非含有培地に置換して 37°C で 4 週間培養した後、肉眼的に SS 上に発育した結核菌集落を判定した。

発育した菌集落が SS 表面の 2/3 以上覆う時は (≡), 2/3～1/3 の時は (≡), 1/3 以下の時は (+), 集落数 100 以下の場合はその数を記入した。

第 3 章 実験懸績及び比較検討

(1) 間歇作用群

① 結核菌発育阻止効果について

判定成績は表 1 に示す。週 2 日 4 週間作用での R.P. の MIC は第 9 管即ち 0.39 µg/ml 以下であり、週 1 日 4 週間作用では第 7 管即ち 1.56 µg/ml 以下となり、その差は 4 倍以上であった。注目すべきことは、SM との差である。週 2 日 4 週間作用では 3 管即ち 8 倍以上 R.P. の方が優れ、週 1 日 4 週間作用では 7 管即ち 2⁷ 倍以上 R.P. の方が優れていることを示した。

また図 2 の如く（但し、RFP の deta は裏辻⁶⁾

表1 27753 RP の間歇作用時及び連続作用時の結核菌発育阻止効果

薬剤濃度 連続作用群 第1管 R.P. 50 $\mu\text{g/ml}$ SM 50 $\mu\text{g/ml}$
 間歇作用群 第1管 R.P. 100 $\mu\text{g/ml}$ SM 100 $\mu\text{g/ml}$
 以後倍数希釈法による

薬剤名	試験管番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
連続	RP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
	SM	—	—	—	—	—	—	—	+	+++	+++
週2日	RP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
	SM	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++
週1日	RP	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++
	SM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

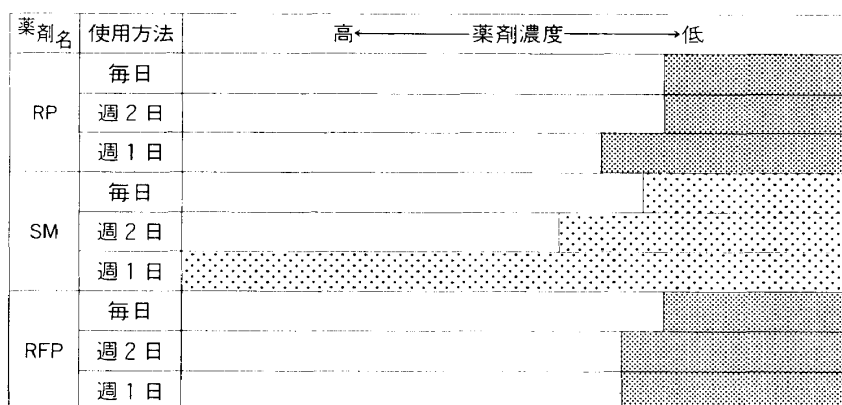


図2 薬剤間歇作用時の MIC (模式図)

による), R.P. は RFP に似て, 間歇作用時の抗菌力が連続作用時の抗菌力に近い成績を示した。

②殺菌効果について

判定成績は表2に示す。(—)~(+)を殺菌効果ありとすると, R.P. の MBC は週2日4週間作用では第8管即ち 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であり, 週1日4週間作用では第6管即ち 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり, その差は4倍以上であった。これをコントロール薬である SM と比較すると, 週2日4週間作用の場合, 3管即ち8倍, 週1日4週間作用の場合, 6管即ち64倍, R.P. の方が優れた殺菌効果を示した。

(2) 短期間作用群

判定成績は表3に示す。(—)~(+)を殺菌効果ありとする。R.P. の連続1週間作用の MBC は第2管即ち 25 $\mu\text{g/ml}$ であり, 連続2週間作用では第4管即ち 6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。

これを SM と比較すると, 連続1週間作用では SM は全く殺菌効果を示さず, 2管即ち4倍以上 R.P. の方が優れ, 連続2週間作用でも SM は全く殺菌効果を示さず, 4管即ち16倍以上 R.P. の方が優れていた。

また RFP と比較すると, R.P. の殺菌効果は連続1週間作用では RFP の1/20, 連続2週間作用では RFP の1/40であった。

尚, 短期間作用時の MIC は, SSC 法の判定には2週間以上の薬剤作用期間を必要とするため, 判定できず, 比較もできなかった。

(3) 連続作用群

結核菌発育阻止効果について: R.P. の MIC は第9管即ち 0.195 $\mu\text{g/ml}$ であった。

殺菌効果について: R.P. の MBC は 0.195 $\mu\text{g/ml}$ 以下となった。

SM と比較すると, R.P. の殺菌効果は2管即ち4倍以上の SM より優れていた。

表2 27753RP の間歇作用時の殺菌力 (MBC)

薬剤濃度 第1管 RP 100 $\mu\text{g/ml}$ SM 100 $\mu\text{g/ml}$
以後倍数希釈法による

作用 方法	試験管 番号 薬 剤 名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
週2日 4W	RP	—	—	—	—	—	—	6	7	++	+++
	SM	11	5	S	50	+	++	+++	+++	+++	+++
週1日 4W	RP	—	—	—	1	30	+	+++	+++	+++	+++
	SM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
連 続 4W	RP	—	—	2	17	25	13	2	+	1	+++
	SM	13	21	7	30	30	7	—	+++	+++	+++

表3 27753 RP の短期間作用時及び連続作用時の殺菌効果

薬剤濃度 第1管 RP 50 $\mu\text{g/ml}$ SM 50 $\mu\text{g/ml}$ RFP 5 $\mu\text{g/ml}$
以後倍数希釈法による

作用 方法	試験管 番号 薬 剤 名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
連続 1週間	RP	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	SM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	RFP	50	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
連続 2週間	RP	—	15	30	+	++	++	++	++	++	+++
	SM	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	RFP	1	11	25	20	+	+	+++	+++	+++	+++
連続 4週間	RP	—	—	2	17	25	13	2	+	1	+++
	SM	13	21	7	30	30	7	—	+++	+++	+++
	RFP	—	—	—	1	2	+	+++	+++	+++	+++

また RFP と比較すると、RFP の MBC は 0.156 $\mu\text{g/ml}$ であり、RFP に近い殺菌効果を示した。

第4章 考 按

抗結核薬のうち数種のもので間歇投与が行われている。SM は主に聴力及び平衡障害などの副作用防止のためであるが、治療効果も連続投与に比べ劣らないという報告⁶⁾もある。しかし、その後実験的に毎日投与が間歇投与より優れているという報告^{5,8,9,20)}があらわれ、臨床的にも初期化学療法では2～3ヶ月毎日投与法が行われるようになった。

また INH は“週2日単独投与法は毎日単独投与法と比較して、臨床効果においては大差ないが、耐性菌の発現に関しては有利である”という療研の報告¹⁰⁾を根拠として間歇投与が行われるようになった。しかし、INH についても効果の上では毎日投与法が間歇投与法に優れていることは多くの報告^{5,11-19)}が示すところである。

少なくとも動物実験においては、河野¹¹⁾及び蓑谷¹²⁻¹⁴⁾、Bartmann¹⁵⁻¹⁸⁾らが INH 連続投与法が間歇投与より優れていることを指摘している。

一方、in vitro においては、Armstrong¹⁹⁾が

Millipore Chambar 装置を用いた INH 単独作用の実験では、発育阻止効果、殺菌効果とも連続作用法が間歇作用法より優れているという。

池田⁵⁾ は本研究室で考案された、薬剤の間歇作用実験に極めて便利なシリコン被覆スライド培養法を用いて、抗結核薬の試験管内間歇投与の実験を行なった。それによれば、薬剤の種類、併用数に関係なく連続作用方式が間歇作用方式に劣ることはなく、単独薬剤の場合は、間歇作用方式が明らかに連続作用方式より劣るが、併用薬剤数が多くなるにつれ、次第にこの差は小さくなる傾向にあると報告している。

また、太田²⁰⁾ は kanamycin (KM), cycloserine (CS), ethambutol (EB), ethionamide (TH) について、裏辻⁶⁾ は RFP について、シリコン被覆スライド培養法を用いて連続作用法と間歇作用法の比較検討を行ない、いずれも連続作用法が間歇作用法より優れていることを報告している。

著者は SSC 法を用いた実験から、R.P. も間歇作用時より連続作用時の方が結核菌発育阻止効果及び殺菌効果ともに優れていることを認めた。しかも間歇作用時の抗菌力の低下は SM に比し、極めて少なく、連続 4 週間作用時の抗菌力は SM より優れ、RFP に近いものであった。

今日までの私共の研究室の成績^{6, 21)} からして、MIC と MBC が近いほどその薬剤は殺菌効果の面から、より強力である。また一方、MIC 及び MBC のいずれにおいても、間歇作用時と連続作用時の差が小さいほどその薬剤は抗菌力に優れているという結果を得ている。この経験からすれば、R.P. も SM 以上に強い抗菌力を臨床においても発揮する可能性を持つといえよう。

第 5 章 結 語

シリコン被覆スライド培養法 (SSC 法) を用いて、新抗結核薬 27753 R.P. (R.P.) の H₃₇Rv 株に対する試験管内抗菌力について、イ) 間歇作用時、ロ) 短期間作用時、ハ) 連続作用時、の効果を比較検討した。

イ) 間歇作用時

結核菌発育阻止効果について：R.P. の MIC は週 2 日 4 週間作用時には 0.39 μ g/ml 以下で

あり、週 1 日 4 週間作用時には 1.56 μ g/ml 以下であった。R.P. の MIC は連続作用時より間歇作用時の方が低下するが、SM の低下に比べると極めて少ないものであった。

殺菌効果について：R.P. の MBC は連続作用時より間歇作用時の方が低下するが、SM の低下に比べると (MIC と同様) 極めて少ないものであった。

ロ) 短期間作用時

R.P. の殺菌効果は明らかに SM より優れていたが、RFP より劣っていた。

ハ) 連続作用時

結核菌発育阻止効果について：R.P. の MIC は 0.195 μ g/ml 以下であった。

殺菌効果について：連続 4 週間作用時の R.P. の MBC は 0.195 μ g/ml 以下であり、RFP に近い殺菌効果を認めた。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜った川合満講師、池田宣昭講師に深甚なる謝意を表する。また終始御協力頂いた山鳥英世博士、研究室の西尾貞子、本間トキエの各氏に心から感謝する。そしてこの研究の機会を与えてくださった医療法人医仁会武田病院の武田隆男理事長と武田保秀院長に厚く御礼致します。

参 考 文 献

- 1) 前川暢夫：総合臨床，30：2117，1981.
- 2) 豊原希一：結核，55：473，昭55.
- 3) 東向一郎：京大結研紀要，7：461，1959.
- 4) 東向一郎：京大結研紀要，7：22，1959.
- 5) 池田宣昭：京大結研紀要，12：21，1963.
- 6) 裏辻康秀：京大胸研紀要，10：1，昭和52.
- 7) Veterans Administration Committee on Streptomycin: J. A. M. A, 147: 253, 1951.
- 8) 蓑谷健比古：胸部疾患，2：27，1957.
- 9) 岩崎竜郎：結核の化学療法：57，1953.
- 10) 厚生省結核療法研究協議会：日本医事新報1540：4218，昭28.
- 11) 河川博臣：京大結研紀要，7：437，昭34.
- 12) 蓑谷健比古：胸部疾患 2：260，昭33.
- 13) 蓑谷健比古：胸部疾患 2：363，昭33.
- 14) 蓑谷健比古：胸部疾患 2：417，昭33.
- 15) Bartmann, K. et al: Beitr. Klin. Tub. 121: 460, 1959.

- 16) Bartmann, K. et al: Beitr. Klin. Tub. 118: 297, 1958. 19) Armstrong, A. R.: Amer. Rev. Tub, 81: 498, 1960.
- 17) Bartmann, K. et al: Beitr. Klin. Tub. 121: 251, 1960. 20) 太田令子：京大胸研紀要 2 : 198, 昭44.
- 18) Bartmann, K. et al: Beitr. Klin. Tub. 115: 269, 1956. 21) 池田宣昭：第58回日本結核病学会総会シンポジウム, 昭和58年.

EXPERIMENTAL STUDIES IN VITRO ON THE ANTITUBERCULOUS
ACTIVITIES OF 27753RP (R.P), A SEMISYNTHETIC
DERIVATIVE OF GRISELIMYCINE

I. Antituberculous Activities of R.P Examined at Intermittent, Short Time
and Continuous Exposure in Vitro

Ataka SHIBATA

*The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan*

Using silicone-coated slide culture method (SSC method), the antituberculous activities of R.P against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain were evaluated at intermittent, short time and continuous exposure in vitro.

The results obtained are as follows:

1. The minimum inhibitory concentration (MIC) of R.P at continuous exposure was less than 1.56 mcg/ml.
2. The MIC of R.P, when the bacilli on the silicone-coated slide had contact with the test drug two days a week for four weeks, was less than 0.39 mcg/ml, and when one day a week for four weeks, was 1.56 mcg/ml, respectively. In case of R.P, the difference of the decrease of MIC between at intermittent and continuous exposure was less prominent in comparison with the results of SM.
3. The minimum bactericidal concentration (MBC) of R.P was fairly good and less than 0.195 mcg/ml in four week continuous exposure.
4. In case of two days or one day a week contact for four weeks, the decrease of MBC compared to the continuous exposure for four weeks was remarkably smaller than that of SM.
5. The bactericidal effects of R.P at short time exposure was obviously superior to those of SM. The bactericidal effect of R.P was less than one tenth of that of REP at one week or two weeks exposure. On the other hand, the bactericidal effect of R.P was similar to results of RFP in continuous exposure for four weeks.