

2, 2'-(Ethylenediimino)-di-1-butanol (EB) の抗結核作用並びに EB 附加による再化学療法強化に関する基礎的研究

〔第 2 篇〕 EB と各種抗結核薬との試験管内併用効果並びに
耐性上昇に及ぼす薬剤相互間の影響

京都大学結核研究所 内科学第 1 (教授 内藤 益一)

大学院学生 岩 井 嘉 一

第 1 章 緒 言

結核化学療法剤は、1944 年 Waksman による SM の発見以来、PAS, TBI, INH, PZA と相ついで登場し、現在、10 種以上を数えるに至っている。

これら抗結核薬を単独で肺結核患者に投与した場合、喀痰中に耐性菌の出現が早期にみられ、十分な化学療法の効果が期待出来ない場合が多い。特に、INH, SM, 及び KM が今日の抗結核薬中最も優れたものである反面、結核菌がこれらの薬剤に対して速かに耐性化する点を慎重に留意しなければならない。

いかにすれば、抗結核薬の治療効果をたかめ、且つ、菌の耐性獲得を防止出来るか。これは今日の結核化学療法に於ける最も大きな課題の 1 つである。

1945 年 Smith ら¹⁾が SM と promin との併用効果を認め、更に翌年には、Middlebrook ら²⁾の SM と sulfonamide との併用による SM の耐性上昇阻止の検討以来、抗結核薬の併用について多くの報告があるが、抗結核薬を併用することにより著明な協力作用が認められ、結核菌の薬剤耐性の獲得が防止もしくは遅延せられる場合のあることが明らかとなり、今日では、併用療法が結核化学療法の常識となっているのは周知の事実である。

従って、新しい抗結核薬が発見された場合、その臨床的応用にあたって、それと既存のいかなる薬剤とを併用するかということは、特に肝要な問題であろう。

第 1 篇に於て、著者は EB 単独の抗結核作用を基礎的に検討した結果、EB が INH に及ばないにしても、KM, TH と並んで再化学療法剤として、十分役立つのではないかと思われる、その臨床的成果を期待したのであるが、本篇に於ては、EB と各種抗結核薬との併用制菌効果及び殺菌効果を検討すると共に、EB に対する結核菌の耐性上昇形式、これに及ぼす各種抗結核薬の影響を検索し、更に各種抗結核薬に対する結核菌の耐性獲得が EB 併用により防止もしくは遅延せられるかどうかを試験管内実験により検討した次第である。

第 2 章 実 験 材 料

1. 培 地

10% 牛血清加 キルヒナー 液体培地 及び Tween-albumin 培地を用いた。

2. 菌 株

供試株は、Tween-albumin 培地、及び 1% 小川培地に継代培養した H37Rv 感受性株を使用した。

3. 使用薬剤

EB, SM, PAS, INH, KM, CS, TH, VM, TBI, TC, SI, PZA, 及び SOM を実験に用いた。第 1 篇に於て述べたと同様の方法により、これら各検体の溶

解液を作成し実験に供した。なお、EB は、本篇に於ては、D-体 (D-EB) のみを使用した。

4. シリコン被覆スライド

東の方法³⁾ によって作成した。

第3章 実験方法並びに実験成績

実験1 各種濃度組合せによる EB と他抗結核薬との併用制菌効果及び併用殺菌効果の検討

1. 実験方法

ガラスキャップ付コルベン10個を併列し、10%牛血清加キルヒナー液体培地で第1番のコルベンが EB $10^2\gamma/\text{ml}$ となる倍数希釈列を作成し、第10番のコルベンはEBを含まない対照培地とした。同様に第1番のコルベン濃度が SM $2 \times 10^2\gamma/\text{ml}$, PAS $20\gamma/\text{ml}$, INH $2\gamma/\text{ml}$, KM $20\gamma/\text{ml}$, CS $2 \times 10^2\gamma/\text{ml}$, TH $10^2\gamma/\text{ml}$, VM $2 \times 10^2\gamma/\text{ml}$, TBI $2 \times 10^2\gamma/\text{ml}$, TC $2 \times 10^2\gamma/\text{ml}$, SI $2 \times 10^3\gamma/\text{ml}$, PZA $2 \times 10^3\gamma/\text{ml}$, 及び SOM $2 \times 10^2\gamma/\text{ml}$ の倍数希釈列を作成した。次に、小試験管を縦横10本宛、計100本を並べ、小試験管の縦の第1列10本には、EBの第1番のコルベン中の培地1.5ml宛を加え、第2列には、第2番のコルベン中の培地を1.5mlずつ分注し、第10列に迄及んだ。横の列には、同様の方法で、SM以下の各薬剤の倍数希釈列から培地1.5mlずつを分注した。かくして、EBと他種抗結核薬との各種濃度組合せによる10%牛血清加キルヒナー液体培地群を作成した。各試験管の培地量は3mlである。

これらの培地群に、1%小川培地に約3週間培養した H37Rv 株より作成した約1mg/mlの石油ベンジン菌液を用いて結核菌を吸着させたシリコン被覆スライド³⁾を1枚宛投入し、37°Cにてシリコン被覆スライド培養法^{3,4)}を行なった。4週間培養後、スライド上の結核菌の発育を肉眼的に観察し、制菌効果を判定し、ついで各スライドを生理的食塩水で2回洗滌後、薬液を含まない10%牛血清加キルヒナー液体培地に移しかえ、再び37°C4週間培養後殺菌効果を判定した。

接種菌量は1スライド当たり約 10^6 生菌単位で、判定基準は、菌集落がシリコン被覆スライド表面の2/3以上を覆う時(卅)、2/3~1/3の時(十)、1/3以下の時(+)とし、集落数が100以下の場合はその数を記録した。

2. 実験成績

表1~4に示した。菌集落数(+)までは、制

菌及び殺菌効果あり、(十)、(卅)は制菌及び殺菌効果なしとして、制菌及び殺菌効果の認められなかった部分を太線でかこんだ。

1) EB と他抗結核薬との併用制菌効果

(1) EB-SM EB, SM それぞれ単独の制菌最低濃度 (MIC) は併用薬剤を含まぬ系列の MIC で示され、共に、 $6.25\gamma/\text{ml}$ である。所が、EB 及び SM の濃度が MIC の1/2の $3.13\gamma/\text{ml}$ では、併用制菌効果が示された。

(2) EB-PAS EB, PAS 単独の MIC は、 $6.25\gamma/\text{ml}$, $0.313\gamma/\text{ml}$ であるが、PAS を $0.156\gamma/\text{ml}$ 含む培地では、EB の MIC は $0.78\gamma/\text{ml}$ となり、制菌力が8倍迄増強された。同様に、EB を $3.13\gamma/\text{ml}$ 含む培地では、PAS の制菌力は単独に比べて4倍迄増強された。

(3) EB-INH EB, INH 単独の MIC はそれぞれ $6.25\gamma/\text{ml}$, $0.125\gamma/\text{ml}$ で、併用制菌効果は、単独の MIC の1/2の組合わせである EB が $3.13\gamma/\text{ml}$, INH が $0.0625\gamma/\text{ml}$ の場合のみに認められた。

(4) EB-KM EB 及び KM 単独の MIC の1/2の組合わせのみで、併用制菌効果が示された。

(5) EB-CS EB 及び CS 単独の MIC の1/2の組合わせのみで、併用制菌効果が示された。

(6) EB-TH EB 及び TH 単独の MIC は、共に、 $3.13\gamma/\text{ml}$ で、併用により EB 及び TH の制菌力がそれぞれ4倍迄増強された。

(7) EB-VM EB 及び VM 単独の MIC の1/2の組合わせのみで、併用制菌効果が示された。

(8) EB-TBI EB の制菌力は4倍迄増強したが、TBI は $0.39\gamma/\text{ml}$ より低い濃度がないので正確に把握し難い。

(9) EB-TC EB は4倍迄、TC は8倍迄制菌力が強化された。

(10) EB-SI EB は2倍迄、SI は4倍迄制菌力が増強された。

(11) EB-PZA EB 及び PZA 単独の MIC の1/2の組合わせのみで、併用制菌効果が示された。

表 1 各種濃度組合わせによる EB と他抗結核薬との併用制菌効果 (I)

EB-SM										
EB \ SM	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
1.56	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.78	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.39	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++

EB-PAS										
EB \ PAS	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.313	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.156	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
0.078	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
0.039	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++

EB-INH										
EB \ INH	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.125	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.0625	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
0.0313	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.0156	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.0078	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.0039	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++

EB-KM										
EB \ KM	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.625	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
0.313	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.156	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.078	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.039	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++

EB-CS										
EB \ CS	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
3.13	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
1.56	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.78	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.39	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++

EB-TH										
EB \ TH	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
0.78	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
0.39	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
0.20	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++

培 養 法：シリコン被覆スライド法，培養4週後判定
 接種菌量：1スライドあたり H37Rv 株約 10⁶ 生菌単位

薬剤濃度：γ/ml

表 2 各種濃度組合せによる EB と他抗結核薬との併用制菌効果 (II)

EB-VM										
VM	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	++	++	+	++	++
3.13	-	-	-	-	++	##	##	##	##	##
1.56	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##
0.78	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##
0.39	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##
K	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##

EB-TBI										
TBI	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.39	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
K	-	-	-	-	+	##	##	##	##	##

EB-TC										
TC	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6.25	-	-	-	-	-	-	+	++	##	##
3.13	-	-	-	-	-	++	##	##	##	##
1.56	-	-	-	-	-	++	##	##	##	##
0.78	-	-	-	-	++	##	##	##	##	##
0.39	-	-	-	-	++	##	##	##	##	##
K	-	-	-	-	++	##	##	##	##	##

EB-SI										
SI	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31.3	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
15.6	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
7.8	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##
3.9	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##
K	-	-	-	-	##	##	##	##	##	##

EB-PZA										
PZA	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
125	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##
62.5	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##
31.3	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##
15.6	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##
7.8	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##
3.9	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##
K	-	-	-	-	-	##	##	##	##	##

EB-SOM										
SOM	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	+	##	##	##	##	##
0.78	-	-	-	-	+	##	##	##	##	##
0.39	-	-	-	-	+	##	##	##	##	##
K	-	-	-	-	+	##	##	##	##	##

培 養 法：シリコン被覆スライド法，培養4週後判定
 接種菌量：1スライドあたり H37Rv 株約 10^6 生菌単位

薬剤濃度：7/ml

表 3 各種濃度組合わせによる EB と他抗結核薬との併用殺菌効果 (I)

EB-SM										
EB \ SM	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	80	15	7	13	17	14	S	10	4	10
50	65	16	16	25	18	50	60	50	60	+
25	+	15	15	25	40	20	25	+	+	+
12.5	80	30	40	40	+	+	+	+	+	+
6.25	80	S	30	70	+	+	+	S	+	+
3.13	S	80	30	+	++	++	++	++	++	++
1.56	+	50	50	+	++	++	++	++	++	++
0.78	+	40	90	+	++	++	++	++	++	++
0.39	+	60	90	+	++	++	++	++	++	++
K	+	70	80	+	++	++	++	++	++	++

EB-PAS										
EB \ PAS	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
10	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
5	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
2.5	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
1.25	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
0.625	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
0.313	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.156	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.078	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.039	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
K	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++

EB-INH										
EB \ INH	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
1	-	-	-	-	2	20	10	20	20	40
0.5	4	3	7	12	8	+	+	+	+	20
0.25	5	5	6	15	40	+	+	+	S	50
0.125	20	27	23	30	+	+	+	+	+	+
0.0625	26	50	40	60	+	++	++	++	++	++
0.0313	30	+	30	+	++	++	++	++	++	++
0.0156	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.0078	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.0039	+	+	+	S	++	++	++	++	++	++
K	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++

EB-KM										
EB \ KM	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
10	-	25	50	40	15	50	6	30	8	20
5	+	65	10	30	30	40	70	60	60	60
2.5	+	+	+	50	50	+	+	+	+	+
1.25	+	40	50	70	+	+	+	+	+	+
0.625	S	+	+	+	+	++	++	++	++	++
0.313	40	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.156	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.078	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.039	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
K	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++

EB-CS										
EB \ CS	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	5	1	2	1	-	1	-	30	-	-
50	+	40	20	18	9	8	25	9	3	10
25	55	60	40	40	10	15	11	20	45	35
12.5	+	60	36	28	19	25	+	+	+	+
6.25	+	62	23	50	30	++	++	++	++	++
3.13	+	60	40	40	+	++	++	++	++	++
1.56	+	30	20	30	60	++	++	++	++	++
0.78	+	55	30	35	55	++	++	++	++	++
0.39	+	70	23	30	50	++	++	++	++	++
K	80	70	50	30	15	++	++	++	++	++

EB-TH										
EB \ TH	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	+	28	42	+	25	40	17	50	31	52
6.25	+	+	+	65	55	65	+	+	+	50
3.13	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
1.56	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
0.78	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
0.39	+	+	80	70	+	++	++	++	++	++
0.20	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
K	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++

判定：薬剤作用終了後，更に培養4週後（表中の数字は集落数，Sは雑菌汚染）
 薬剤濃度： γ /ml

表 4 各種濃度組合わせによる EB と他抗結核薬との併用殺菌効果 (II)

EB-VM										
VM	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	16	2	—	9	5	4	8	19	6	6
50	17	1	2	5	16	20	25	15	30	22
25	33	4	16	25	52	+	+	+	+	+
12.5	30	10	8	+	+	+	+	+	+	+
6.25	13	45	40	+	++	++	++	++	++	++
3.13	60	13	63	+	++	++	++	++	++	++
1.56	+	35	60	+	++	++	++	++	++	++
0.78	+	70	60	+	++	++	++	++	++	++
0.39	50	+	30	+	++	++	++	++	++	++
K	50	80	25	+	++	++	++	++	++	++

EB-TBI										
TBI	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	—	12	+	+	+	40	60	S	25	60
50	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
25	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
12.5	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
6.25	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
3.13	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
1.56	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.78	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
0.39	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
K	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++

EB-TC										
TC	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	5	1	2	1	—	1	—	30	—	—
50	+	40	20	18	9	8	25	9	3	10
25	55	60	40	40	10	15	11	20	45	35
12.5	+	60	36	28	19	25	+	+	+	+
6.25	+	62	23	50	30	++	++	++	++	++
3.13	+	60	40	40	+	++	++	++	++	++
1.56	+	30	20	30	60	++	++	++	++	++
0.78	+	55	30	35	55	++	++	++	++	++
0.39	+	70	23	30	50	++	++	++	++	++
K	80	70	50	30	15	++	++	++	++	++

EB-SI										
SI	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
1000	—	5	24	35	—	15	S	+	30	4
500	21	+	+	+	50	50	15	30	18	6
250	3	25	70	+	+	+	10	+	3	15
125	+	42	35	6	30	+	+	+	+	40
62.5	30	30	15	+	+	++	++	++	++	++
31.3	65	15	27	+	++	++	++	++	++	++
15.6	+	32	40	+	++	++	++	++	++	++
7.8	60	21	39	+	++	++	++	++	++	++
3.9	+	25	35	+	++	++	++	++	++	++
K	90	2	20	+	++	++	++	++	++	++

EB-PZA										
PZA	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
1000	—	2	+	+	+	+	+	+	+	+
500	40	+	+	+	++	++	++	++	++	++
250	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
125	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
62.5	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
31.3	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
15.6	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
7.8	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
3.9	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
K	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++

EB-SOM										
SOM	EB									
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	K
100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	28	18	9	12	18	14	16	9	11	5
12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.25	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
3.13	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
1.56	55	+	35	+	++	++	++	++	++	++
0.78	S	S	15	+	++	++	++	++	++	++
0.39	85	75	20	+	++	++	++	++	++	++
K	55	45	25	+	++	++	++	++	++	++

判定：薬剤作用終了後，更に培養4週後（表中の数字は集落数，Sは雑菌汚染）
 薬剤濃度： γ /ml

(12) EB-SOM 併用効果はまったく認めなかった。

2) EB と他抗結核薬との併用殺菌効果

(1) EB-SM 単独の殺菌最低濃度(MSC)は共に 6.25 γ /ml で、併用殺菌効果は認められなかった。

(2) EB-PAS PAS の 10 γ /ml 以上の濃度がないので正確に把握し難いが、EB の殺菌力は4倍以上、PAS は32倍以上の増強がみられた。

(3) EB-INH EB 及び INH 単独の MSC の 1/2 の濃度の組合わせのみで、併用殺菌効果が認められた。

(4) EB-KM EB 及び KM 単独の MSC の 1/2 の濃度の組合わせのみで併用殺菌効果を示した。

(5) EB-CS 併用効果はまったく認められなかった。

(6) EB-TH EB 及び TH 単独の MSC の 1/2 の濃度の組合わせのみで併用殺菌効果が認められた。

(7) EB-VM 併用殺菌効果はまったく認められなかった。

(8) EB-TBI EB, TBI それぞれ単独の MSC の 1/2 の濃度の組合わせのみで併用殺菌効果が認められた。

(9) EB-TC 併用殺菌効果はまったく認められなかった。

(10) EB-SI EB 及び SI 単独の MSC の 1/2 の濃度の組合わせのみで併用殺菌効果が示された。

(11) EB-PZA, 及び, (12) EB-SOM 共に、併用殺菌効果はまったく認められなかった。

実験2 制菌最低濃度(MIC)比併用によるEBと各種抗結核薬の耐性上昇阻止に関する検討

1. 実験方法

本実験は増量的継代法によった。この実験に先立ち、EB と SM, PAS, INH, KM, CS 及び TH 各単独の MIC を耐性実験と同様の実験条件、即ち、Tween-albumin 培地に於て、接種菌量約 0.1mg/ml

表5 EB と各種抗結核薬の併用比

薬 剤 名	MIC*(γ /ml)	他薬剤 : EB
SM	0.313	2 : 5
PAS	0.625	4 : 5
INH	0.0313	1 : 25
KM	0.078	1 : 10
CS	1.56	2 : 1
TH	0.625	4 : 5
EB	0.78	—

* Tween-albumin 培地における MICを示す(接種菌量培地 1ml 当り約 0.1mg. 3週判定、但し INH のみ2週判定)

で検討した。その成績は表5の如くで、これにより併用比を定めた。

まず、Tween-albumin 培地を用いて、各薬剤単独及び MIC 比併用の倍数稀釈列を作成し、各稀釈列に Tween-albumin 培地に10日間培養の H37Rv 感受性株約 0.1mg/ml を接種し、37°C 3週間培養後(INH は2週間)、肉眼的に旺盛な結核菌発育を示す最高の薬剤濃度を第1代の耐性値と定めた。ついて、各薬剤単独及び MIC 比併用薬剤稀釈列を第1代と同様に作成し、第1代の耐性値とした薬剤濃度に発育した菌液を各系列毎に約 0.1mg/ml を接種した。かくして5代にわたって継代培養を実施した。なお、併用群については、各代毎に耐性値を示した薬剤濃度に発育した菌液で個々の薬剤に対する耐性値を試験管倍数稀釈法によって、別に Tween-albumin 培地で検討した。この場合の接種菌量は約 0.1mg/ml で3週培養後(INH は2週)判定した。

2. 実験成績

各代毎の各薬剤単独並びに併用時の発育許容最高薬剤濃度、EB と他剤併用時に旺盛な発育を示した最高濃度の試験管に発育した菌の EB 単独に対する耐性値、及び併用剤に対する耐性値をそれぞれ別個に3項目に分けて記載した。

1) EB, 各種抗結核薬, 並びに相互併用時の発育許容最高濃度の推移

表6及び図1に示した。本項で発育許容最高濃度という言葉を用いたのは、単独薬剤の時は、これと耐性値とは一致するが、薬剤相互併用時には、第2, 3項にみられるように必ずしも一致しないからである。

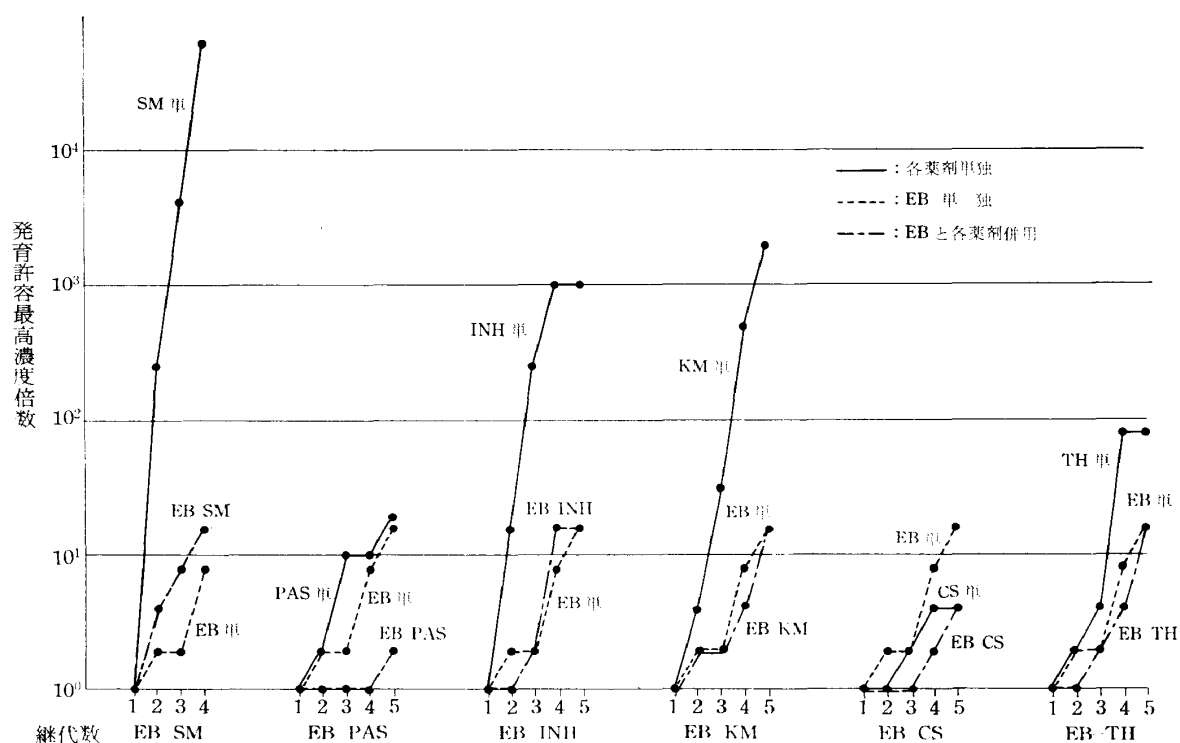
表6の一番上がEB単独、次が各抗結核薬単

表 6 EB と各種抗結核薬との MIC 比併用時における発育許容最高濃度の推移

継代 薬 剤	1	2	3	4	5
EB	0.78(1)	1.56(2)	1.56(2)	6.25(8)	12.5(16) (7/ml)
SM	0.156(1)	39(250)	625(4000)	10 ⁴ (64000)	
EB—SM	0.20-0.078(1)	0.78-0.313(4)	1.56-0.625(8)	3.13-1.25(16)	
EB	0.78(1)	1.56(2)	1.56(2)	6.25(8)	12.5(16)
PAS	0.625(1)	1.25(2)	6.25(10)	6.25(10)	12.5(20)
EB—PAS	0.78-0.625(1)	0.78-0.625(1)	0.78-0.625(1)	0.78-0.625(1)	1.56-1.25(2)
EB	0.78(1)	1.56(2)	1.56(2)	6.25(8)	12.5(16)
INH	0.0313(1)	0.5(16)	7.8(250)	31.3(1000)	31.3(1000)
EB—INH	0.39-0.0156(1)	0.39-0.0156(1)	0.78-0.0313(2)	6.25-0.25(16)	6.25-0.25(16)
EB	0.78(1)	1.56(2)	1.56(2)	6.25(8)	12.5(16)
KM	0.039(1)	0.156(4)	1.25(32)	20(512)	78(2000)
EB—KM	0.39-0.039(1)	0.78-0.078(2)	0.78-0.078(2)	1.56-0.156(4)	6.25-0.625(16)
EB	0.78(1)	1.56(2)	1.56(2)	6.25(8)	12.5(16)
CS	3.13(1)	3.13(1)	6.25(2)	12.5(4)	12.5(4)
EB—CS	0.78-1.56(1)	0.78-1.56(1)	0.78-1.56(1)	1.56-3.13(2)	3.13-6.25(4)
EB	0.78(1)	1.56(2)	1.56(2)	6.25(8)	12.5(16)
TH	0.313(1)	0.625(2)	1.25(4)	25(80)	25(80)
EB—TH	0.20-0.156(1)	0.20-0.156(1)	0.39-0.313(2)	0.78-0.625(4)	3.13-2.5(16)

() 内は第1代の発育許容最高濃度を基として各代を倍数で示したもの

図 1 EB と各種抗結核薬との MIC 比併用時における発育許容最高濃度の推移



独, 3行目が併用時の発育許容最高濃度を示し, 図1は, 各代に於ける発育許容最高濃度が第1代のその何倍に相当するかを発育許容最高濃度倍数として縦軸半対数グラフに示したものである。

(1) EB-SM EB 単独の発育許容最高濃度の上昇は比較的緩徐で, 第1代で $0.78\gamma/\text{ml}$, 第2代, 第3代は $1.56\gamma/\text{ml}$ と2倍に上昇し, 第4代で8倍, 第5代では $12.5\gamma/\text{ml}$ と16倍の上昇をみた。SM 単独の発育許容最高濃度の上昇は, 第1代の $0.156\gamma/\text{ml}$ が, 第2代 $39\gamma/\text{ml}$, 第3代 $625\gamma/\text{ml}$, 第4代は $10^4\gamma/\text{ml}$ と64,000倍の上昇を示した。EB-SM 併用時の発育許容最高濃度は, 第1代は $0.20-0.078\gamma/\text{ml}$ と併用効果を示すが, 第2代以後は, EB 単独の値に近い推移を示した。図1で, EB-SM の発育許容最高濃度の上昇は, 第1代で併用効果が示されたので, EB 単独よりも急激であるという結果を得た。

(2) EB-PAS PAS 単独の発育許容最高濃度は, 第1代で $0.625\gamma/\text{ml}$, 第2代で $1.25\gamma/\text{ml}$, 第3代, 第4代で $6.25\gamma/\text{ml}$, 第5代 $12.5\gamma/\text{ml}$ と緩やかな上昇を示した。EB-PAS 併用時の

発育許容最高濃度は, 第5代で第1代の2倍に上昇したのみであった。

(3) EB-INH INH 単独の発育許容最高濃度は, 第1代の $0.0313\gamma/\text{ml}$ から, 第4代, 第5代の $31.3\gamma/\text{ml}$ と 10^3 倍に上昇した。EB-INH 併用時の発育許容最高濃度は, 第1代, 第2代で $0.39-0.0156\gamma/\text{ml}$ と EB, 及び INH 単独の値に比べて, 低い値をとったが, 第3代以後は EB 単独時の推移とほぼ同様の傾向を示した。

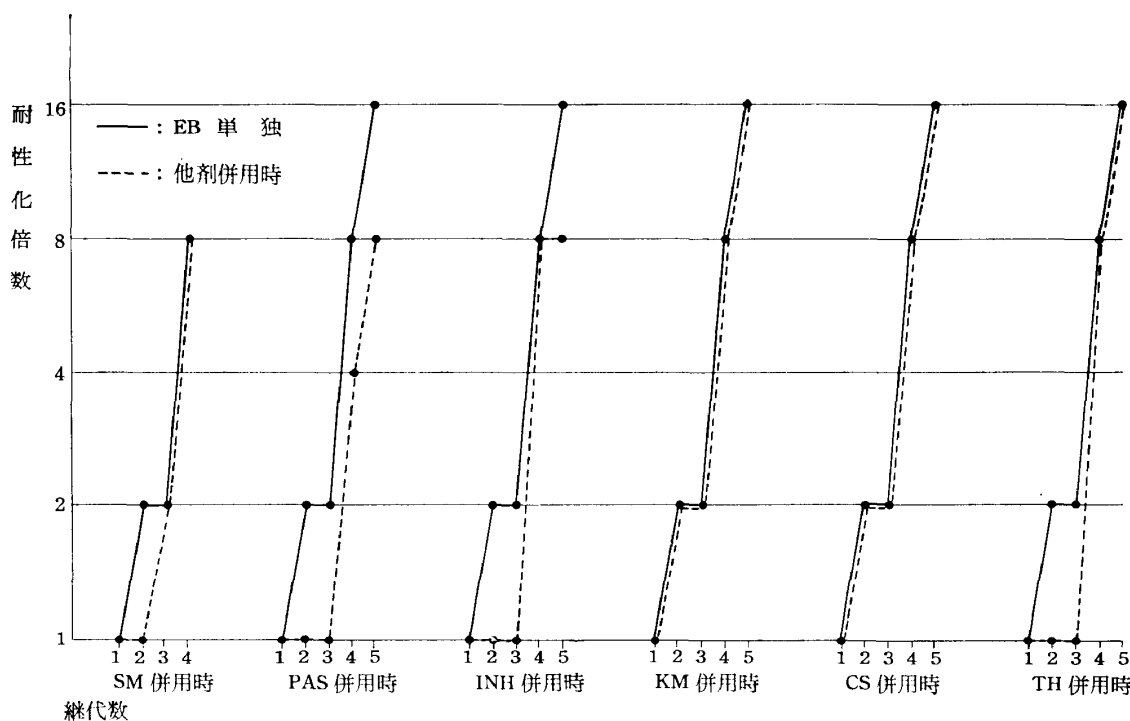
(4) EB-KM KM 単独の発育許容最高濃度は, 第1代の $0.039\gamma/\text{ml}$ から第5代の $78\gamma/\text{ml}$ と2,000倍の上昇を示した。EB-KM 併用時の発育許容最高濃度は, EB 単独より, やや遅

表7 EB と各種抗結核薬との MIC 比併用時における EB の耐性値の推移

継代	EB 単独	SM 併用時	PAS 併用時	INH 併用時	KM 併用時	CS 併用時	TH 併用時
1	0.78	—	—	—	—	—	—
2	1.56	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	0.78
3	1.56	1.56	0.78	0.78	1.56	1.56	0.78
4	6.25	6.25	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25
5	12.5	—	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5

(単位 γ/ml)

図2 EB 耐性化に対する各種抗結核薬の MIC 比併用による阻止効果



れて上昇した。

(5) EB-CS CS単独の発育許容最高濃度の上昇は、第1代の $3.13\gamma/\text{ml}$ から第5代の $12.5\gamma/\text{ml}$ と緩徐であった。EB-CS 併用時の発育許容最高濃度はEB-KM 併用時とほぼ同様の傾向を示した。

(6) EB-TH TH単独の発育許容最高濃度の上昇は、第1代 $0.313\gamma/\text{ml}$ 、第2代 $0.625\gamma/\text{ml}$ 、第3代 $1.25\gamma/\text{ml}$ 、第4代、及び第5代は $25\gamma/\text{ml}$ と比較的緩徐であった。EB-TH 併用時の発育許容最高濃度はEB-KM 併用時と同様にEB単独よりやや遅れて上昇した。

2) EBの耐性値の推移

EBの耐性上昇はINH, PAS 併用時に僅かながら遅延されたが、その他の薬剤との併用では、EB単独と殆んど変りなく、明らかな遅延効果は認められなかった。

3) 各種抗結核薬の耐性値の推移

表8及び図3に示した。

(1) SM EB併用時には、各代共、単独に比して耐性上昇が遅延せられた。

(2) PAS EB併用による耐性上昇の遅延

は認められなかった。

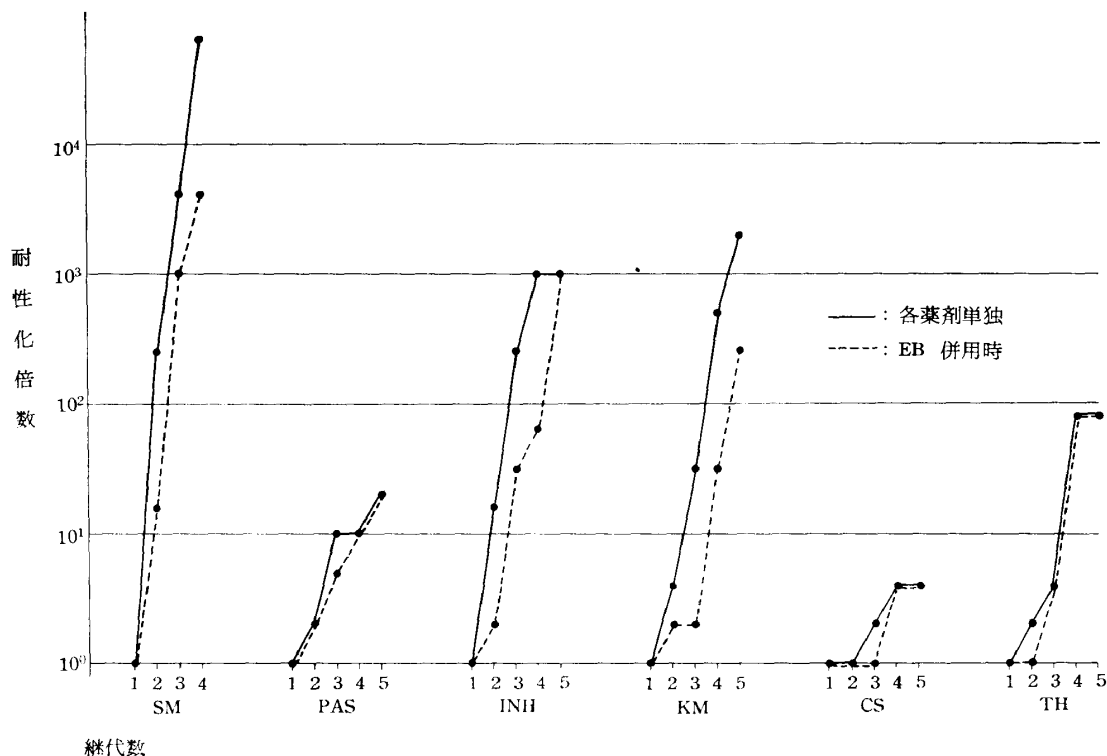
(3) INH 第4代迄は、EB併用により、INHの耐性が遅延せられたが、第5代では単独と同値を示した。

表8 EBと各種抗結核薬とのMIC比併用時における各種抗結核薬の耐性値の推移

継代	1	2	3	4	5
薬剤					
SM 単 独	0.156	39	625	10^4	
EB併用時	—	2.5	156	625	
PAS 単 独	0.625	1.25	6.25	6.25	12.5
EB併用時	—	1.25	3.13	6.25	12.5
INH 単 独	0.0313	0.5	7.8	31.3	31.3
EB併用時	—	0.0625	1.0	2.0	31.3
KM 単 独	0.039	0.156	1.25	20	78
EB併用時	—	0.078	0.078	1.25	10
CS 単 独	3.13	3.13	6.25	12.5	12.5
EB併用時	—	3.13	3.13	12.5	12.5
TH 単 独	0.313	0.625	1.25	25	25
EB併用時	—	0.313	1.25	25	25

(単位 γ/ml)

図 3 各種抗結核薬耐性化に対するEBのMIC比併用による阻止効果



(4) KM 各代共, EB 併用時には, KM の耐性上昇が多少共遅延せられた。

(5) CS 及び (6) TH 両者共, EB 併用による耐性上昇遅延は認められなかった。

実験3 一定濃度の EB 併用による各種抗結核薬の耐性上昇阻止に関する検討

1. 実験方法

増量的継代法によった。0.2γ/ml に EB を含有する Tween-albumin 培地, 及び EB を含め同培地の倍数希釈列を作成し, 実験2で述べたと同様の方法で耐性上昇阻止効果の検討を行なった。

2. 実験成績

表9及び図4に示した。

(1) SM EB 併用時には, SM 単独時に比べて, 各代共, SM の耐性値がかなり低いが, 耐性化倍数からみると, 耐性上昇遅延効果はさほど著明ではない。

(2) PAS EB 併用時の PAS の耐性値は, 各代共, 単独の 1/2 程度で, 僅かに耐性が遅延せられた。

(3) INH EB 併用による耐性上昇の遅延は認められなかった。

(4) KM EB 併用時には, 各代共, KM の耐性値が低いが, 耐性化倍数からみると,

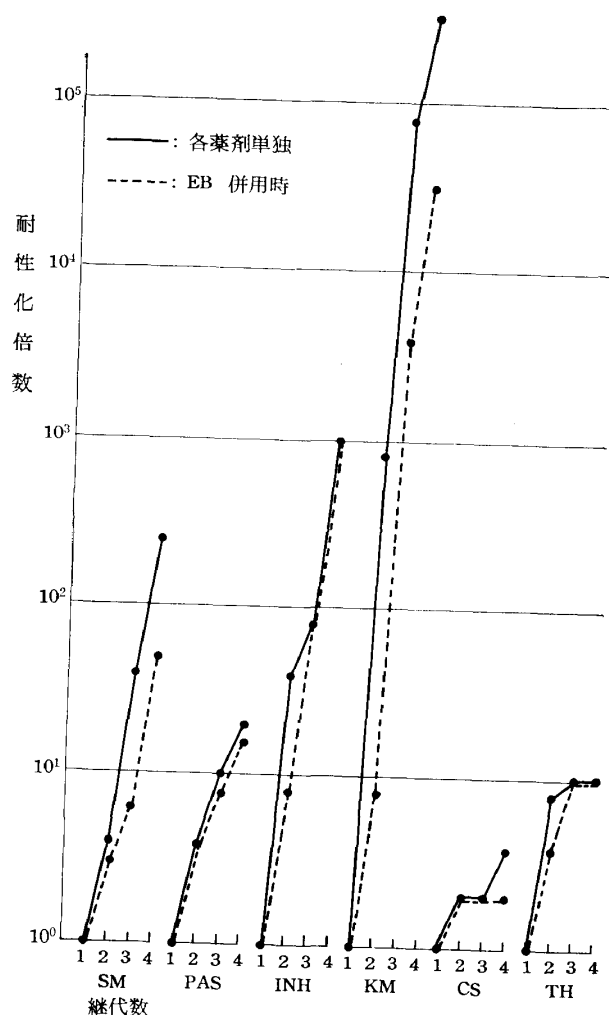
表9 一定濃度の EB 併用による各種抗結核薬の耐性値の推移

継代		1	2	3	4
薬剤	単独	0.156	0.625	6.25	39.0
	EB併用時	0.039	0.125	0.25	1.95
PAS	単独	0.313	1.25	3.13	6.25
	EB併用時	0.156	0.625	1.25	2.5
INH	単独	0.0156	0.625	1.25	15.6
	EB併用時	0.0156	0.125	1.25	15.6
KM	単独	0.0156	12.5	625	5000
	EB併用時	0.0078	0.0625	31.3	500
CS	単独	1.56	3.13	3.13	6.25
	EB併用時	1.56	3.13	3.13	3.13
TH	単独	0.313	2.5	3.13	3.13
	EB併用時	0.313	1.25	3.13	3.13

併用濃度: EB 0.2γ/ml

(単位 γ/ml)

図4 各種抗結核薬耐性化に対する EB の併用阻止効果



KM 単独時に比べて耐性上昇遅延効果はさほど著明ではない。

(5) CS 及び (6) TH EB 併用による耐性上昇遅延効果は認められなかった。

第4章 総括並びに考按

抗結核薬の試験管内併用効果を検討する場合, 薬剤濃度の組合わせについては, どちらか1剤の濃度を一定にする場合と, 相互の薬剤を臨床投与量の比, あるいは MIC の比に組合わせて併用効果を検討する方法がある。一方, 病巣内の薬剤濃度は種々様々なものであると思われる, 従って, 出来るだけ多くの併用濃度の組合わせを作り, それらの併用濃度に於ける菌の発育状態をみる方がより至当であるのはいうまでもない所である。

表 10 EB と他抗結核薬との併用制菌及び殺菌効果部分の比較

併 用 薬 剤	SM	PAS	INH	KM	CS	TH	VM	TBI	TC	SI	PZA	SOM
併用制菌効果部分	1	4	1	1	1	3	1	2 $\geq$	4	2	1	0
併用殺菌効果部分	0	7 $\geq$	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0

そこで、EB と各種抗結核薬の併用効果を試験管交叉希釈法ともいふべき各種濃度組合わせにより、制菌及び殺菌効果の両面より検討を行なった次第である。その検討方法はシリコン被覆スライド培養法³⁴⁾によったが、シリコン被覆スライド上の結核菌の発育集落面積が対照の約1/3以下の場合に制菌効果ありとし、このスライドを薬剤非含有培地に移して4週間培養後の集落の発生が対照の1/3以下の場合を殺菌効果ありと判定した。この判定基準に従って、制菌及び殺菌効果の認められなかった部分を表1～4に於て太線でかこんだ。まったく協力作用の認められぬ場合には、これが四角形となり、その囲みが大きい程、協力作用が著しいわけである。

所で、殺菌とは、不可逆的に発育増殖能を喪失させた場合に用いられるべき言葉であるが、著者の用いた実験方法及び判定基準が厳格にこの定義にあてはまるか否かは疑問がある。然し、殺菌効果の比較という観点より、便宜上、前記の如くに判定基準を定めた次第である。

表10は、併用効果の比較という意味で、併用制菌及び併用殺菌効果部分の数を表にまとめたものである。

併用制菌効果部分の数は、EB と PAS、及び TC との併用で4箇所、TH とは3箇所、TBI とは2箇所以上、SI とは2箇所であった。その他の薬剤とは、1箇所ないし0であったので、実験誤差を考慮するならば、EB は PAS、TC、及び TH と僅かながら併用制菌効果を示し、その他の薬剤とは協力作用も拮抗作用も示さないと云えよう。

次に、併用殺菌効果についてみると、EB は PAS と7箇所以上の併用効果部分を示したのを除き、その他の薬剤とは協力作用も拮抗作用も示さなかった。なお、EB と PAS との併用殺

菌効果については、PAS単独の殺菌最低濃度は1250～2500 γ /ml⁵⁵⁾であるが、本実験では10 γ /ml より高濃度がなく、正確に把握し得なかった。

さて、EB と他抗結核薬との試験管内併用殺菌効果に関する報告は殆んどないようであるが、併用制菌効果については、諸家の成績がある。岡ら⁷⁾は、EB と SM、PAS、INH、TH、KM、及び SI とは相加作用も拮抗作用も示さなかったとし、伊藤ら⁸⁾は、INH、Isoxyl、TH、KM、PAS、SI、及び CS との検討で、著明な協力作用を認めていない。山本ら⁹⁾の成績では、EB と SM との併用効果を認め、森山¹⁰⁾は、PAS、TH、SM、及び KM との間に多少の協力作用を認めるが、著明なものでなかったという。いずれにしても、EB と著明な併用制菌効果を示す薬剤は見当たらないようである。

薬剤併用による耐性獲得防止についての試験管内実験方法として、増量的継代法、及び恒量的継代法があげられる。広く用いられているのは増量的継代法であり、本篇の実験は本法によった。

EB 単独の耐性上昇について、Thomas ら¹¹⁾は H37Rv 株を8代継代培養しても耐性上昇を殆んど認めなかったと述べ、わが国では、岡ら⁷⁾が、H37Rv-S、H37RvR-SM、及び H37RvR-INH の諸株を増量継代培養10代後に2～5倍の耐性上昇を認めた報告を始めとして、伊藤ら⁸⁾、山本ら¹²⁾、田中⁶⁾の成績があるが、いずれも耐性上昇が緩やかであるとしている。著者の成績でも、増量継代5代後に16倍の耐性上昇を認めたが、その耐性上昇は比較的緩やかであるといふべきであろう。

EB と各種抗結核薬とを MIC 比で併用した場合、各代の発育許容薬剤最高濃度の推移は、概ね、EB 単独の場合と同じ値を示した。併用

した他剤単独の耐性上昇は CS を除いて、いずれもこれより急な上昇を示すので、EB 併用時には、他剤の耐性上昇があたかも遅延される如き印象を与えた。この見掛け上の耐性上昇遅延は、薬剤併用時には、併用制菌効果があらわれることと、発育許容最高濃度が、同時に含まれる薬剤の中、耐性上昇の遅い薬剤の耐性値に引張られるからである。事実、薬剤併用時、発育許容最高濃度に発育した菌のそれぞれの薬剤単独に対する耐性値を調べた処、発育許容最高濃度と個々の薬剤に対する耐性値とは、かなりの相違が認められた。

この成績より判断すると、EB の耐性上昇は、PAS 又は INH との併用によって僅かながら遅延され、一方、逆に SM, INH 及び KM の耐性上昇は、EB の併用によって多少共遅延された。

この実験とは別に、EB を 0.2 γ /ml の濃度で併用し、各種抗結核薬の耐性上昇の推移を検索したが、SM, PAS 及び KM の耐性上昇が、EB の併用によって多少共遅延されることが分った。

EB の耐性上昇に対する他剤の併用阻止効果については、伊藤ら⁸⁾は、INH 及び PAS は EB の耐性上昇をある程度阻止するといひ、山本ら¹²⁾は、PAS 以外の抗結核薬、即ち INH, SM, KM, CS などは EB の耐性出現をある程度抑制する傾向を認めている。又、田中⁶⁾は SOM 併用により EB の耐性上昇は遅延せられなかったとしている。他の抗結核薬の耐性上昇に対する EB 併用の阻止効果については、余り報告がみられないようである。

第5章 結 論

EB と各種抗結核薬との試験管内併用効果並びに耐性上昇に及ぼす相互の影響を検討し、次の結論を得た。

1. EB は各種抗結核薬と制菌作用及び殺菌作用の面で拮抗作用を示さず、PAS, TC 及び TH と併用制菌効果を、PAS と併用殺菌効果を僅かながら示す。

2. EB の耐性上昇形式は一般に緩徐であり、耐性値は 5 代で 16 倍になる。

3. EB の耐性上昇は、PAS 及び INH により僅かではあるが遅延される傾向を示す。又、SM, INH, PAS 及び KM の耐性上昇は、EB の併用により、多少共遅延される。

(擱筆に際し、御指導を賜わった前川暢夫助教授、吉田敏郎博士、津久間俊次博士をはじめ当研究室の各位に深甚の謝意を捧げます。)

文 献

- 1) Smith, H. I., and McClosky, W. T.: Pub. Health. Rep., 60 : 1129, 1945
- 2) Middlebrook, G., and Yegian, D.: Am. Rev. Tuberc., 54 : 553, 1946
- 3) 東向一郎: 京結紀要, 7 (3) 増刊 1 号 : 461, 1959
- 4) 東向一郎: 京結紀要, 7 (3) 増刊 2 号 : 22, 1959
- 5) 池田宣昭: 京結紀要, 12 : 21, 1963
- 6) 田中健一: 京結紀要, 13 : 13, 1964
- 7) 岡捨己他: 日本胸部臨床, 23 : 30, 1964
- 8) 伊藤文雄他: 日本胸部臨床, 22 : 36, 1963
- 9) 山本和男: 胸部疾患, 8 : 1070, 1964
- 10) 森山英五郎: 結核, 39 : 155, 1964
- 11) Thomas, J. P., Baughn, C. O., et al: Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 891, 1961
- 12) 山本和男他: 日本胸部臨床, 22 : 797, 1963