

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2編 他剤併用時の抗結核作用

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

既知の抗結核薬の長期かつ大量の使用にもかかわらず臨床的治癒に至らない肺結核患者が今日も尙少なくない。これらの患者からは現在の抗結核薬に対する耐性菌が認められることが多い。この対策として、既知の抗結核薬の効果的使用法の研究とともに、既知の抗結核薬と交叉耐性のない強力な新抗結核薬の開発が必要である。

第1編ではSSC法を用いてR.P.のH₃₇Rv株に対する試験管内抗菌を薬剤作用方法(間歇か連続か、及び1週間、2週間、4週間作用)の面から検討した結果、R.P.はrifampicin(RFP)に似て間歇作用時並びに短期間作用時共に結核菌発育阻止効果及び殺菌効果に優れ、今後期待される抗結核薬の1つと考えられた。

一方、作用機序を異にする抗結核薬を2剤、3剤と併用することによって効果を高めることは、既に古くから知られている。当初は結核の最も強力な化学療法として、streptomycin(SM), para-aminosalicylic acid(PAS), isoniazid(INH)の3者併用が行なわれたが、今日ではSM, INHにその後開発されたRFP, ethambutol(EB)等を加えた併用療法に発展している。

同時併用療法が単独療法にくらべて優れた抗菌力を示すことは、既に伊庭¹⁾、池田²⁾、田中³⁾、

中井⁴⁾、裏辻⁵⁾らの研究によっても明らかである。

そこで著者はR.P.とSM, INH, EB, RFP, kanamycin(KM), ethionamide(TH), cycloserine(CS), pyrazinamide(PZA)との各併用時のH₃₇Rv株に対する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。

第2章 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(S.S), 菌株, 菌液, 菌接種方法。培地などは前編と同様である。

被検薬剤及びその濃度: R.P.はプロピレングリコールで溶解し第1管を5 μ g/mlとした。SM, KMは蒸留水で溶解し第1管を各々10 μ g/mlとした。EB, PZAは70%アルコールで溶解し各々100 μ g/ml, 1000 μ g/mlとした。INHは蒸留水で溶解し第1管を1 μ g/mlとした。CSは蒸留水で溶解し第1管を100 μ g/mlとした。RFPはジメチルホルムアルデヒド(DFA)で溶解し第1管を1 μ g/mlとした。以後培地を用いて、各々倍数希釈をして第9管までとした。第10管は対照として10%血清加キルヒナー液のみとした。

第2部 実験条件及び実験方法

薬剤作用温度: 37°Cとした。

実験操作: R.P.と併用薬を含有した培地の

作製は倍数希釈法によるクロス法を用いた。即ち、R.P. の第1系列では併用薬の第1管濃度の薬剤含有培地を使用し倍数希釈していく。次に第2系列では併用薬の第2管濃度の薬剤含有培地を使用し倍数希釈を行なう。以後同様に第9系列まで行なう。第10系列では10%血清加キルヒナー培地で倍数希釈を行なう。

例えば R.P.-SM の場合、あらかじめ SM 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の薬剤含有培地を約 40 ml 作製しておく。以後これを倍数希釈した薬剤含有培地を順次約 40 ml 作製する。そして、第1系列とし

て R.P. 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$ の10倍濃度の薬液 0.6 ml を第1管に入れ、SM 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の薬剤含有培地 5.4 ml を加え、以後 SM 含有培地 3 ml で R.P. を倍数希釈していく。これを第2系列以下同様の操作を行なう。これを各併用薬についても各々行なう。

このように作製された薬剤含有培地を入れた試験管に、石油ベンジン菌液を用い池田⁶⁾の方法により結核菌を付着させた SS を耳鼻科用ピンセットで投入した。

判定方法：発育阻止効果の判定時期は薬剤作

第1表 PR+SM (MIC)

試験管番号		RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
SM 第1管 10 $\mu\text{g/ml}$	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	K										

第2表 RP+INH (MIC)

試験管番号		RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
INH 第1管 1 $\mu\text{g/ml}$	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	K										

第3表 RP+EB (MIC)

試験管番号		RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
EB 第1管 100 $\mu\text{g/ml}$	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	K										

第4表 RP+RFP (MIC)

試験管番号		RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
RFP 第1管 1 $\mu\text{g/ml}$	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	K										



数字・コロニー数

用3週間後に行なった。薬剤作用4週間後、耳鼻科用ピンセットで各小試験管からSSを取り出し、あらかじめ準備しておいた生理的食塩水4mlの入った小試験管にSSを入れ、その後新しい生理的食塩水の入った小試験管に移してゆく方法で、各3回ずつ洗浄した後、薬剤非含有培地に移した。そして4週間培養後に殺菌効果の判定を行なった。

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のベンジン菌液付着部分)の2/3以上を覆う時(卅), 2/3~1/3の時(卅),

1/3以下の時(+), 集落数100以下の場合その数を記録した。

第3章 実験成績

1) 結核菌発育阻止効果について

第1表~第4表に示す如く、RP-SM, RP-INH, RP-EB, RP-RFPの各併用時ではR.P.のMICは第4管(0.625 $\mu\text{g/ml}$)であった。また第5表~第8表に示す如く、RP-KM, RP-TH, RP-CS, RP-PZAの各併用時ではR.P.のMICは第5管(0.313 $\mu\text{g/ml}$)であった。

第5表 RP+KM (MIC)

試験管 番号	RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
KM 第1管 100 $\mu\text{g/ml}$	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	K									

第6表 RP+TH (MIC)

試験管 番号	RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
TH 第1管 100 $\mu\text{g/ml}$	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	K									

第7表 RP+CS (MIC)

試験管 番号	RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
CS 第1管 100 $\mu\text{g/ml}$	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	K									

第8表 RP+PZA (MIC)

試験管 番号	RP 第1管 5 $\mu\text{g/ml}$									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
PZA 第1管 1000 $\mu\text{g/ml}$	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	K									



数字→コロニー数

これらの併用薬においても各薬剤濃度ともに R.P. の MIC は第4管～第5管 ($0.625 \mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $0.313 \mu\text{g}/\text{ml}$) であり、いずれも拮抗作用や相乗作用は認めなかった。

2) 殺菌効果について

(+)までを殺菌効果あるものとする、第9表の如く、RP-SM では R.P. の MBC は全て第4管 ($0.625 \mu\text{g}/\text{ml}$) となった。また第10表の如く、RP-INH ではやや相乗作用の傾向を認めた。第11表、第12表に示く如く、RP-EB, RP-RFP の各併用時では R.P. の MBC は第4管 (0.625

$\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。また第13表～第15表の如く、RP-KM, RP-TH, RP-CS の各併用時では R.P. の MBC は第5管 ($0.313 \mu\text{g}/\text{ml}$) となった。第16表の RP-PZA 併用時では R.P. の MBC は第2管～第4管 ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $0.625 \mu\text{g}/\text{ml}$) となった。この場合、R.P. の MBC はやや低下し拮抗作用の傾向を示した。

第4章 考 按

豊原⁷⁾によると、R.P. の $H_{37}R_v$ 株および SM, INH, KM, RFP, EVM の各薬剤耐生

第9表 RP+SM (MBC)

試験管 番号		RP 第1管 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
SM 第1管 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	3			3	6	3	8	6	14	3
	2		4	2	1	1	8		3	15	15
	3	1		5	6	6	18	15		11	17
	4	3	4	6	1	21	9	17	13	8	30
	5	7	10	11	13	17					
	6	4	10	14	15						
	7	7	21	16	25						
	8	7	13	16	S						
	9	10	13	25	20						
	K	7	16	44							

第10表 RP+INH (MBC)

試験管 番号		RP 第1管 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
INH 第1管 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	2	2	8	7	1	3	7	7	14	3
	2	7	5	6	2	14	11	6	16	3	2
	3	6	9	8	12	6	21	11	8	12	13
	4	17	7	8	14	22	50	40	50	50	50
	5	15	19	9	27	50					
	6	4	2	7	25						
	7	16	16	6	22						
	8	5	13	4	5						
	9	2	6	3	36						
	K	35	25	20	1						

第11表 RP+EB (MBC)

試験管 番号		RP 第1管 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
EB 第1管 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	18	35	40	50	50	50	50	50	50	50
	2	35	26	15	18	24	7	20	8	17	18
	3	34	31	40	35	34	40	25	35	27	35
	4	66	19	11	13	16	21	25	18	7	25
	5	11	8	19	25	18	8	11	24	16	7
	6	15	15	25	12	11	4	16	13	12	31
	7	17	16	7	21	25	18	50			
	8	22	24	25	27	30					
	9	16	26	25	16						
	K	35	11	23	40						

第12表 RP+RFP (MBC)

試験管 番号		RP 第1管 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
RFP 第1管 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1					2	9	21	11	12	11
	2				30						
	3	2	2	2	1	16					
	4	4	1	4	8						
	5	3	7	9	25						
	6	1	2	7	6						
	7	8	7	12	3						
	8	8	14	30	30						
	9	14	30	20							
	K	35	20	1	20						

数字 → コロニー数

第13表 RP+KM (MBC)

試験 番号 管		RP 第 1 管 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K	
KM 第 1 管 10 μg ml	1	24	11	20	40	18	S	40	18	100	S	
	2	15	16	24	40	100	100	50	5		12	
	3	12	30	50	50	45	45	5		100	8	
	4	30	7	9	50	50	100	100	100	100	100	
	5	45	28	40	50	50	100	100		100		
	6	40	40	31	45							
	7	4	4	21	19							
	8	9	11	21	40	35						
	9	8	2	7	24	50						
	K	14	15	17	16	18						

第14表 RP+TH (MBC)

試験 番号 管		RP 第 1 管 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
TH 第 1 管 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	14	23	45	22	21	40	40	35	26	25
	2	23	17	40	17	40	35	50	50	50	50
	3	15	20	25	30	25	50				
	4	17	23	30	30	50					
	5	30	23	30	50						
	6	30	29	18	50	50					
	7	32	33	35	40	35					
	8	40	18	50	36	50					
	9	16		35	33						
	K	12	26	35	50	50					

第15表 RP+CS (MBC)

試験 番号 管		RP 第1管 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
CS 第1管 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1				1	1	2	1	1		1
	2	7	2	7	5	7	6	18	20	16	25
	3	40	38	35	24	32	36	26	42	46	45
	4	35	40	35	40	50	50	50	35	45	50
	5	18	12	36	40	45	40	45	38	50	50
	6	25	40	20	50						
	7	19	30	40	40						
	8	40	50	45	30						
	9	50	50	30	50	50					
	K	30	27	28	29	40					

第16表 RP+PZA (MBC)

試験 番号 管	RP 第1管 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
PZA 第1管 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1			S						
	2			S						
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9	50								
	K	50	30	30	25	45				

 → 
 → 
 → 
 → 

数字→コロニー数

H₃₇Rv 株に対する MIC は10%血清加キルヒナー液体培地での 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であると報告している。

著者は第1編で R.P. が SM より優れ, RFP より劣るが, 間歇作用時並びに短期間作用時には RFP に近い抗結核作用を示したことを報告した。

今回, R.P. と既知の抗結核薬との併用で, どのような併用効果を認めるのかを検討した。

R.P. の MIC は 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0.313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, どの併用薬とも相乗作用もしくは拮抗

作用を認めなかった。また MBC は第10表に示すように INH 併用時でやや相乗作用の傾向を認めた。in vivo では生体免疫やその他の条件が加わるため, in vitro と同じような効果が得られるかどうか疑問だが, 新しい可能性を示すものと思われる。

一方, 第16表の如く, PZA 併用時でやや拮抗作用の傾向を認めた。我国では PZA は繁用されていないが, in vivo で同じような効果を示す可能性もあり, PZA 併用時には拮抗作用の可能性のあることを念頭に置く必要があろう。

第5章 結 語

新抗結核薬 27753 R.P. (R.P.) と SM, INH, EB, RFP, KM, TH, CS, PZA との各併用時における H₃₇Rv 株に対する結核菌発育阻止効果並びに殺菌効果について、シリコン被覆スライド培養法 (SSC 法) を用いて検討を行なった。

1) 結核菌発育阻止効果

R.P. の MIC は 0.625 μ g/ml $\sim$ 0.313 μ g/ml であり、どの併用薬においても相乗作用もしくは拮抗作用を認めなかった。

2) 殺菌効果

R.P. の MBC は 0.625 μ g/ml $\sim$ 0.313 μ g/ml であり、INH との併用でやや相乗作用の傾向を、また PZA との併用でやや拮抗作用の傾向を認めた。しかし、その他の薬剤併用においては相乗作用も拮抗作用も認めなかった。

3) R.P. は優れた抗結核性を示す薬剤で、臨床的に副作用がなければ、ぜひ実際に使用したい新しい抗結核薬の1つであると考える。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤を賜った川合満講師、池田宣昭講師に深甚な謝意を表する。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) 伊庭一男：京大結研紀要，6：18，昭32.
- 2) 池田宣昭：京大結研紀要，12：32，昭38.
- 3) 田中健一：京大結研紀要，13：45，昭39.
- 4) 中井 準：京大結研紀要，13：2，昭40.
- 5) 裏辻康秀：京大結研紀要，10：20，昭52.
- 6) 池田宣昭：京大結研紀要，12：21，昭38.
- 7) 豊原希一：結核，55：473，昭55.

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

II. Antibuberculous Activities of R.P. in Combination with other Antituberculous Agents

Ataka SHIBATA

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

The antituberculous activities of R.P in combination with SM, INH, EB, RFP, KM, TH, CS, and PZA were evaluated in vitro by using SSC method against Mycobacterium tuberculosis H37Rv strain.

1. Bacteriostatic effect

The MIC of R.P was from 0.625 to 0.313 mcg/ml. There was no synergic or antagonistic effect in combination with each antituberculous drug.

2. Bactericidal effect

The MBC of R.P was from 0.625 to 0.313 mcg/ml. The bactericidal activities of R.P, when combined with INH, showed a slight synergic effect and with PZA a slight antagonistic effect, but the other agents did show neither synergic nor antagonistic effects.