

抗結核剤の気道内注入療法に関する実験的並びに臨床的研究, 特に放射性同位元素 P^{32} 及び C^{14} 標識 IHMS を追跡子とする検討

〔第2篇〕 抗結核剤の気道内注入療法に関する実験的研究, 特に C^{14} 標識 IHMS を追跡子とする検討

京都大学結核研究所外科療法部 (主任 教授 長石 忠 三)

京都厚生園 (園長 簗和田益二博士・副園長 長沢直幸博士)

岩 瀬 敬 治

(受付 昭和33年 9月29日)

【目 次】

緒 言

第1章 実験材料及び実験方法

第1節 家兎に於ける肺結核病巣の作成方法

第2節 採血方法及び病巣の採取方法

第3節 IHMS の血中濃度及び病巣内濃度の測定方法

第4節 C^{14} 標識 IHMS を追跡子とする IHMS の病巣部及びその周辺部に於ける分布状態の観察方法

緒 言

抗結核剤の気道内注入療法に就いては既に第1篇に於いて述べたように, 多くの研究者によつてその臨床的研究が報告されているが, 基礎的研究は極めて少ないようである。

著者は第1篇に於いて, 気道内に注入された液体は容易に血中へ吸収され, その吸収速度はその液体の滲透圧, 溶質の種類あるいは生体側の種々の条件によつて影響されるものであり, 抗結核剤の溶液に就いても同様であることを述べた。そこで, 第2篇に於いては, 肺結核家兎の気道内に注入された抗結核剤, 特にイソニコチン酸ヒドラゼット・メタンズルホン酸ナトリウム (以下 IHMS と略記) に就いて, 主としてその分布状態を検討し, 抗結核剤の気道内注入療法が全身投与に比較してどのような利点を持つかということに就いて検討した。

第2章 実験成績

第1節 気道内に注入された IHMS の血中濃度及び病巣内濃度

第1項 実験的に作成した家兎の結核肺の場合

第2項 人の切除結核肺の場合

第2節 病巣部及びその周辺部に於ける C^{14} 標識 IHMS の分布状態

第3章 総括並びに考按

結 論

文 献

即ち, 肺結核家兎の気道内に IHMS を注入して, その血中濃度及び病巣内濃度を測定すると共に, 臨床例に就いても同様の検討を行つた。更に, 検索を詳細にするために, 放射性同位元素 C^{14} によつて標識された IHMS を肺結核家兎の気道内に注入して, 従来明らかにされていなかった肺結核病巣部及びその周辺部に於ける IHMS の分布状態を形態学的に検討した。

第1章 実験材料及び実験方法

第1節 家兎に於ける肺結核病巣の作成方法

使用した家兎は凡て体重 2 kg 内外の健常な成熟家兎である。家兎の感作は, 牛型結核菌三輪株約 5mg を流動パラフィン 1cc とよく混和して 100°C 30 分間加熱し, この加熱死菌を大腿筋肉内に注射して行つた。そして Römer 反

応が陽性になったことを確かめた後、牛型三輪株約 1mg を 1cc の生理的食塩水に浮遊せしめて、経皮的に両側の肺内に注入し、病巣を作成した。

第2節 採血方法及び病巣の採取方法

病巣の形成された家兎を仰臥位に固定し、ヘパリン2500単位を静注して血液の凝固を防止した後、経口的に気道内に挿入した Nélaton のカテーテルを介して、50mg/cc の IHMS 溶液 1.0cc を注入した。そして IHMS の血中濃度は股動脈から時間を追って採血した血液に就いて測定した。更に、この家兎を IHMS 注入後 2 時間30分に失血死せしめ、肺に形成された大きな塊状の乾酪巣や、小病巣の撒布融合している部分、即ち、集合乾酪巣を取り出し、それ等に就いて病巣の IHMS の濃度を測定した。

又、臨床例に於ける検討は、肺葉切除時に於いて、血管結紮に先立ち気管支を切断し、切除される肺葉の気管支内に 1g の IHMS を 10cc の蒸留水に溶解して注入した。その後家兎の場合と同様に時間を追って肘静脈中の血中濃度を測定すると共に、IHMS を注入して 2 時間30分後切除肺より乾酪物質を取り出し、病巣内濃度を測定した。

第3節 IHMS の血中濃度及び病巣内濃度の測定方法

イソニコチン酸ヒドラゼット（以下 INH と略記）の定量法には数多くの方法が報告されているが、著者は Willard Johnson & George Corte¹¹⁾ (1956) が用いた Scott の変法に従った。即ち、Scott⁹⁾ (1952) が INH の定量にデニトロクロロベンゼンを用いる方法を見出し、Johnson & Corte はこの方法が芳香族アミンの存在下に於いても游離の INH を定量することが出来ることに着目して、種々の物質の INH アセチル化に及ぼす影響を検討するために用いた方法である。著者は、病巣を乳鉢あるいはホモダナイザーを用いて均等にして、これを血漿と同様に取扱うことによつて、芳香族アミンの存在が予想される結核病巣、特に乾酪巣内の

IHMS を定量するのに用いた。著者の行つた方法の概略は以下の通りである。

1) 採血した血液より分離した血漿又は血清 0.5cc、或いは十分に均等化した新鮮な病巣 0.5g を正確に計量して、それと無水アルコール 7cc とを遠沈管の中でよく混和する。

2) 約20分間蓋をして放置した後遠沈してその上澄 5cc をとり、予め 200mg の硼砂を入れておいた 30mm×170mm の試験管に移す。

3) これに 5% のデニトロクロロベンゼン無水アルコール溶液 5cc を加え、沸騰水中につけてアルコールを十分に蒸発乾燥せしめる。（約 10分間）

4) これを沸騰水からとり出し、流水で冷却した後、メタノールを加えて 10cc とし、硼砂の沈澱を除いた上澄を 530m μ の波長で比色定量する。著者はエルマⅣ型分光光度計を用いて比色を行つた。

5) 盲検液。血中濃度の測定には、IHMS 注入前の血漿から同様の操作によつて得た液を以てこれにあてた。病巣内濃度測定の盲検液は最初は IHMS を注入していない家兎の病巣を以てこれにあてたが、前記の血漿を以てしても大差がなかつたので後にはそれを盲検液とした。

第4節 C¹⁴ 標識 IHMS を追跡子とする IHMS の病巣部及びその周辺部に於ける分布状態の観察方法

組織切片中の IHMS を検出する適当な組織化学的方法がないので、放射性同位元素 C¹⁴ によつて標識された IHMS を用いて、マイクロオートラジオグラフィーによる観察を試みた。

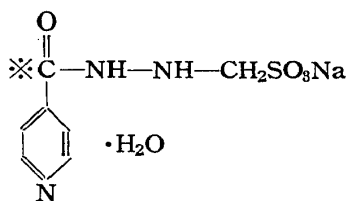
その方法の概略は以下の通りである。

1) C¹⁴ の位置及び放射能

用いた IHMS は第1図のように※の位置の C を C¹⁴ で置きかえたもので、その比放射能は 800mc/Mol である。

2) 注入液の作製と気道内注入

前記の C¹⁴ 標識 IHMS 0.05 mc (50 μ c) に放射能のない普通の IHMS を加えて総量を 0.2g とし、これを 1.0cc の蒸留水に溶解して、



第1図 IHMS の C¹⁴ 標識位置

予め肺に結核病巣を作成してある家兎の気道内に注入した。そして2時間30分後に出血死せしめ、その肺病巣をとり出した。

3) 凍結切片の作成

摘出した組織を 1.5cm³ 内外の大きさに切りこれをドライアイスとアセトンを含めた金属製容器の壁に附着せしめると、組織は短時間内に凍結する。この標本を -20°C 内外に保たれた部屋に移し、No. 2 橙色安全燈のもとで5乃至8μの厚さの組織切片とし、富士フィルム株式会社発売のオートラジオグラフ用コンタクト型乾板に貼布した。

4) 露出

標本を貼布した乾板を、乾燥剤を含めた標本箱に入れて、5°Cに保存し、貼布後3日目、7日目、10日目というように日を追って現像して適度に感光したものを観察に供した。現像は富士レントール現像液の原液で20°C 3分間とした。尚観察に当つては標本をアルコール固定した後一般の組織標本と同様に染色を行つた。

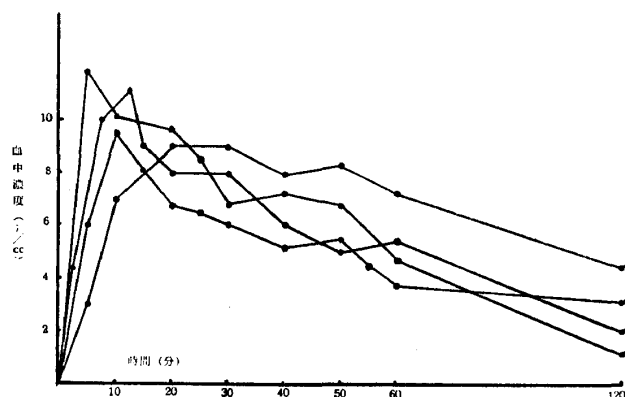
第2章 実験成績

第1節 気道内に注入された IHMS の血中濃度及び病巣内濃度

第1項 実験的に作成した家兎結核肺の場合

50mg/cc の IHMS 溶液 1.0 cc を肺結核家兎の気道内に注入した場合、その股動脈に於ける血中濃度の時間的推移は第2図に示す通りである。即ち、注入後5乃至10分内外でその血中濃度は最高に達し、その後比較的緩やかに下降する。これを健常家兎に於ける場合に比べると、最高値に達する時間は少々遅延し、その最高値も少々低く 10γ/cc 内外であり、その後の下降も少々緩やかな傾向にある。IHMS 注入後

2時間30分に於ける病巣内の IHMS の濃度は第1表に示す通りである。即ち、比較的大きな塊状の乾酪巣から得られた乾酪物質中の IHMS の濃度は1g 当り 1γ 内外であり、小病巣が撒布融合している部分、即ち、集合乾酪巣に於いては1g 当り3乃至7γであつた。後者の場合には若干の健常肺が含有されているために、病巣内のみの濃度を示すものではないが、注入後2時間30分に於いても局所には尙かなり高濃度の IHMS が存在していることを示している。



第2図 IHMS (50mg) 1.0cc 気道内注入 (肺結核家兎)

兎No.	集合乾酪巣	塊状の乾酪巣
1	3.2γ	痕跡
2	5.6γ	1.1γ
3	6.3γ	1.3γ
4	3 γ	—
5	7 γ	1.0γ
6	2 γ	—
7	6.8γ	1.2γ

第1表 IHMS の病巣内濃度
肺結核家兎の場合 (濃度 γ/g)

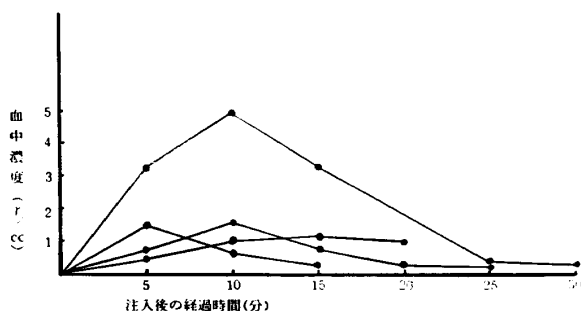
第2項 人の切除結核肺の場合

右上葉の肺切除術を行う場合に、上葉管気支を切断すると共に、10cc の蒸留水に溶解した IHMS 1g を上葉気管支内に注入し、その後肺動脈、肺静脈の順に結紮切断して切除肺に於ける乾酪巣内の IHMS の濃度を測定した。この場合の肘静脈に於ける血中濃度は第3図の通りであり、多くの場合極めて微量に過ぎない。併しながら、乾酪物質内の IHMS の濃度は第2表の通りであり、痕跡程度に過ぎないものから

1g 当り 8.5 γ に達するものまでである。IHMS の肺内に於ける分布は肺切除の手術操作によつて若干変動すると思われるが、一般に病巣が軟らかいもの、即ち、軟化融解の傾向が強い程 IHMS の濃度は高い傾向にある。

氏 名	病 巣 の 性 状	病巣内濃度
木○ 定○	1×1cm 空洞 軟らかい乾酪物質	7.0 γ
上○美○子	0.7×1.0cm 空洞 流動状の乾酪物質	8.5 γ
寺○ 武○	2×2cm 乾酪巣 固い乾酪物質充満	痕跡
藤 ○ 馨	1.5×0.8cm 空洞 軟らかい乾酪物質	5.0 γ
小○美○子	3.0×2.2cm 乾酪巣 固い乾酪物質充満	痕跡

第2表 IHMS の病巣内濃度
人の切除肺の場合 (濃度 γ /g)



第3図 肺葉切除術時に於ける IHMS の血中濃度

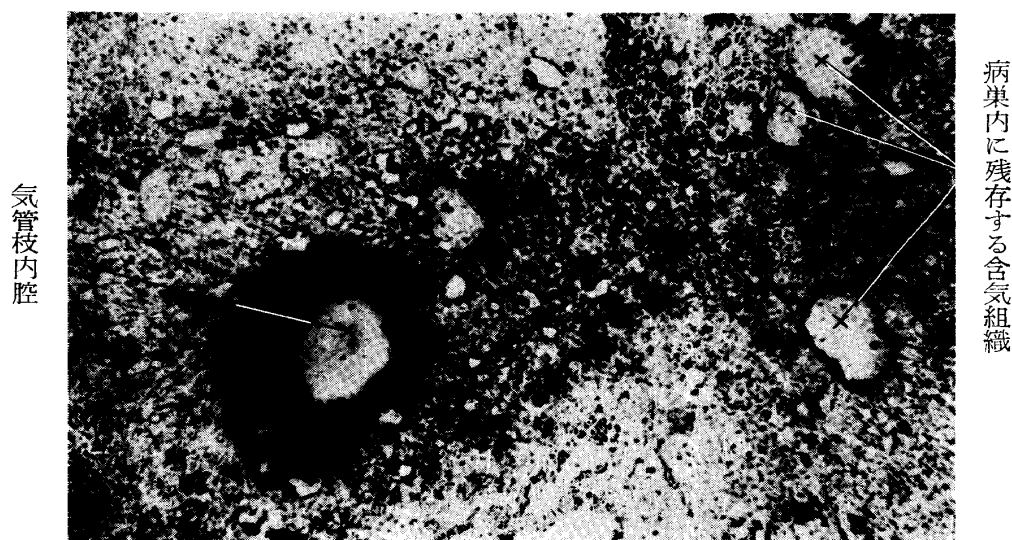
第2節 病巣部及びその周辺部に於ける C¹⁴ 標識 IHMS の分布状態

実験的に作成された家兎の肺結核病巣の附近に放射性同位元素 C¹⁴ によつて標識された

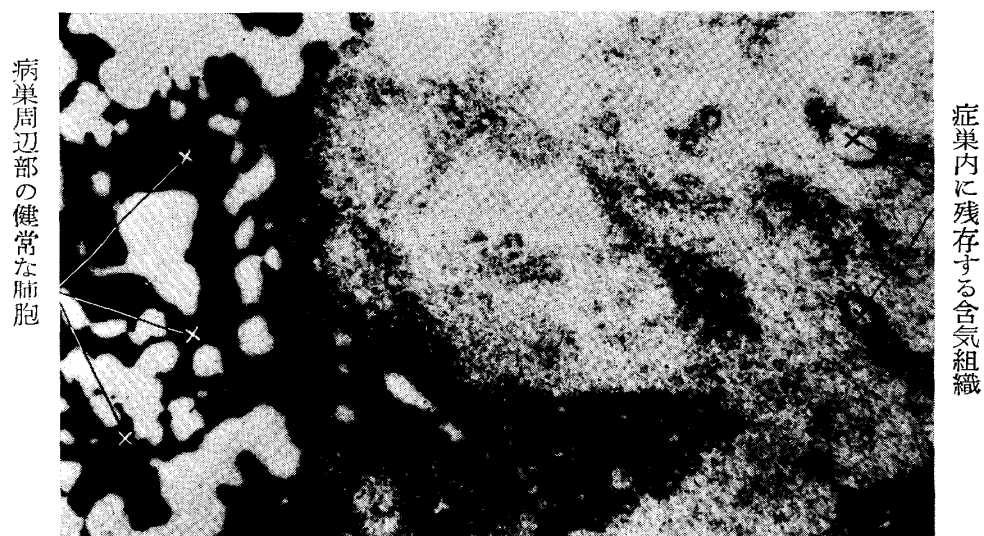
IHMS を気道より Nélaton のカテーテルを介して注入し、その分布状態をマイクロオートラジオグラフによつて形態学的に観察した。

5°C の温度で30日間露出し、現像、定着処理を施こした後へマトキシリン・エオジン染色を行つて得た顕微鏡所見は第4, 5, 6, 7 及び第8図に示した通りである。

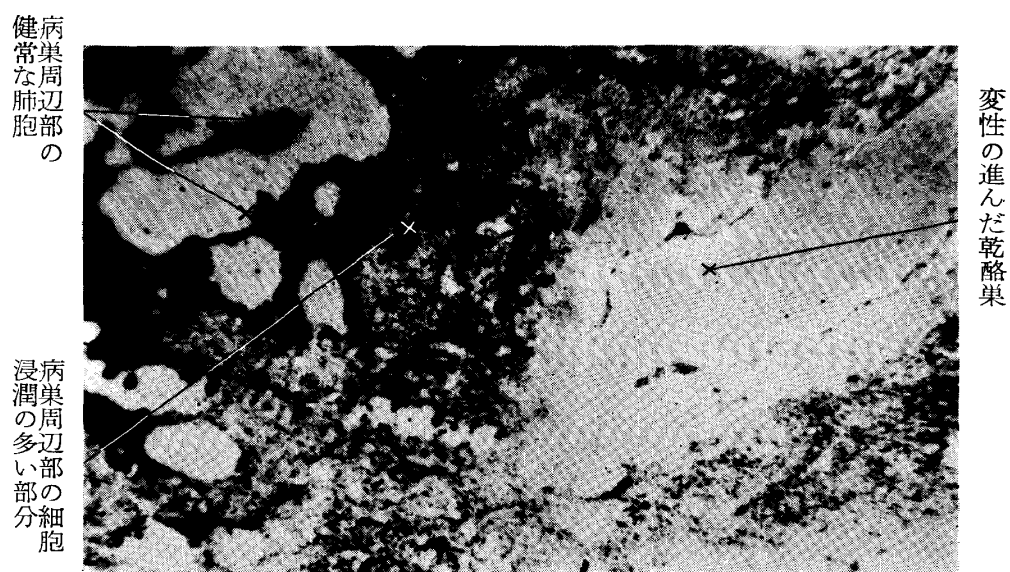
IHMS の存在している部位は C¹⁴ の放射能によるフィルム膜の黒化によつて示されている。これ等を病理組織標本と対比して観察すると、黒化が最も強い部分、即ち、IHMS の濃度が最も高い部分は IHMS を注入した末梢気管枝及びその末梢部の健常な肺胞腔内である。それ等の IHMS は気道壁に接して分布しており上皮細胞や肺胞中隔にも浸透している。次いで IHMS の濃度が比較的高いのは、病巣内に残存している気管枝や肺胞等の含気組織及び血管壁である。そして、これ等の部位から乾酪変性の比較的軽度な部分、即ち、細胞浸潤の強い部分に IHMS が浸透している所見が認められる。第7図及び第8図は気管枝壁及び肺胞腔より乾酪巣内に IHMS が浸透しつつある状態を示すものである。併しながら、第6図のように細胞核の染色されないような部分、或いは被膜が形成されているような部位に於いては、フィルム膜の黒化は殆んど認められない。そして、被膜を通して IHMS が浸透しているような所見も又見出すことが出来なかつた。



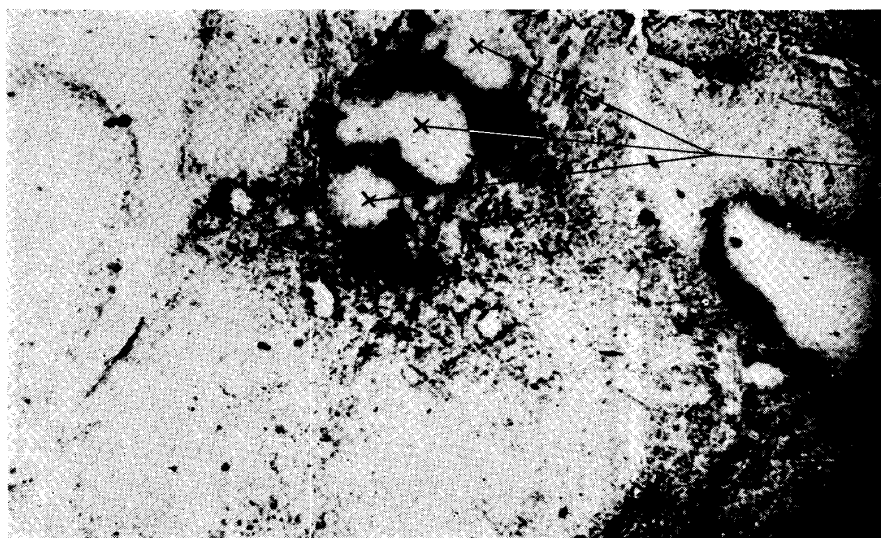
第4図 C¹⁴ 標識 IHMS によるマイクロオートラジオグラフ (気道内注入後2時間30分における家兎肺結核病巣) 黒化している部分は IHMS の存在を示す。気管枝周囲に最も多量に見出される



第5図 C^{14} 標識 IHMS によるマイクロラジオオートグラフ
気道内注入後2時間30分に於ける家兎の肺結核病巣
黒化している部分は IHMS の存在を示す。



第6図 C^{14} 標識 IHMS によるマイクロラジオオートグラフ
気道内注入後2時間30分の家兎の肺結核病巣
黒化している部分は IHMS の存在を示す。
変性の進んだ部分には見出されない。



病巣内に残存する肺胞

第7図 C¹⁴ 標識 IHMS によるマイクロラジオオートグラフ
気道内注入後2時間30分の家兎の肺結核病巣
病巣内に残存する肺胞から IHMS が病巣内に滲透し
ている所見を示す。



気管枝内腔

病巣

第8図 C¹⁴ 標識 IHMS によるマイクロラジオオートグラフ
気道内注入後2時間30分の家兎の肺結核病巣
病巣内に残存する気管枝より病巣内へ IHMS が滲透
しつつある所見を示す。

第3章 綜括並びに考按

SM の病巣内濃度を測定したものには、腎結核空洞（堀内⁴⁹）（1952）、骨関節結核（近藤⁶⁰）（1954）及び肺結核病巣（M. Turunen¹⁰⁰）（1957）等に関するものがあるが、PAS や INH の病巣内濃度を従来の化学的な方法で測定した報告は殆んどみられない。

ところが、L. J. Roth et al.⁸⁾ が C^{14} によつて標識された INH を健常マウスの皮下に注射して、各臓器内に分布する C^{14} の放射能を Geiger-Müller 管によつて測定して INH の濃度を定量的に測定した。その後、W.R. Barclay²⁾（1953）、Bonet Maury et al.³⁾（1954）、Alfred Heller et al.¹⁾（1957）等とは同じく C^{14} で標識された INH や PAS を用いて、種々の方法によつて投与された INH や PAS の人体及び動物体内に於ける分布や排泄などに就いて同様な検討を行つている。

このように人体や動物の臓器や病巣に於ける INH の定量には主として C^{14} で標識された INH が用いられており、前述の Barclay は肺結核患者に C^{14} で標識された INH を投与して、肺結核病巣や頸部の結核性リンパ腺、或いは肋膜滲出液内における C^{14} の放射能を Windowless Gasflow Counter で測定することによつて INH の濃度を測定している。そしてその結果、肺結核病巣の被膜内では 1 g 当り 1.88 r、乾酪物質内では 1 g 当り 0.64~1.04 r であつたと報告している。

著者は Scott 氏の Johnson & Corte 氏変法に若干の改良を加えた方法によつて肺結核病巣内に於ける IHMS の濃度を測定し、気道内に注入された IHMS が病巣内に到達していることを認めた。そしてその濃度は大きな塊状の乾酪物質内では Barclay の報告と略々近似した値であり、さして高濃度ではないが、小病巣の撒布融合している部分、即ち、集合乾酪巣に於いてはかなり高濃度に IHMS が存在していることを認めた。又、人の切除結核肺に於いては、固い乾酪物質内には IHMS を証明することが出来なかつたが、軟化融解の傾向の強い乾酪物質内程高濃度に IHMS が存在しているこ

とを知つた。

そこで、気道内に注入された IHMS が病巣部及びその周辺部に於いてどのように分布しているかを検討するために、 C^{14} によつて標識された IHMS を用いてマイクロラジオオートグラフィ ーなる方法を応用した。

ラジオオートグラフィ ー⁶⁾ には種々の方法がある。即ち、Contact Method, Mounting Method, Coating Method, Stripping Method 及び Inverting Method 等である。これ等のうち Contact Method は組織切片をのせたスライドガラスと写真乾板とを密着さす方法であるから顕微鏡的観察には不利である。又、Coating Method は、これに用いる写真乳剤が我が国では発売されていない。Stripping Method 及び Inverting Method は何れも組織切片上に乳剤膜を貼布する操作を水中で行なわなければならないため、この操作によつて組織内に存在する IHMS が流出或いは移動する恐れがあるため不適当である。

又、INH の存在位置を組織化学的に観察するには村沢等⁷⁾（1955）の方法がある。彼等は INH が強い還元作用を有し、アンモニヤ性硝酸銀より銀を遊離することを利用して、INH の粉末を吸入せしめた健常家兎の肺に就いて組織化学的に検討している。そして、INH の粉末が主としてリンパ組織にとり入れられている所見を得ている。併しながら、この方法で見出される INH は比較的大量の場合であると思われる。その上アンモニヤ性硝酸銀液処理によつて組織内の INH が移動する恐れがあると思われる。

組織のどのような場所に IHMS が存在するかということを知るためには、標本作成の操作によつて IHMS が流出したり移動する恐れがあつてはならない。従つて著者は組織切片の作成には凍結法を用いると共に、ラジオオートグラフィ ーには Mounting Method を用いた。即ち、組織切片は -20°C の室内で直接乾板に貼布し、乾燥剤を入れた標本箱に入れて密閉した後室温にとり出した。このようにして温度の変化によつて切片や乾板に水滴の附着すること

を防止して 5°C の冷蔵庫に保存した。

このようにして得られたマイクロラジオオートグラフの所見は既に述べた通りである。即ち、気道内に注入された IHMS は病巣周辺の健常肺に最も多量に見出され、次いで病巣内に残存している気管枝壁や肺胞壁等に比較的大量に存在している。そして、これらの部分から主として細胞浸潤の著明な部分に IHMS が滲透している所見を形態学的に観察することが出来る。

以上のようなことから、抗結核剤特に IHMS の気道内注入療法は全身的な投与方法には見られない局所作用を期待出来るものであり、血中濃度も全身的投与に劣らないものであるため、臨床的に有意義な治療法であるということが出来る。

結 論

以上著者は肺結核に対する化学療法剤特に IHMS の気道内注入療法に就いて、これら薬剤の血中濃度、病巣内濃度、病巣部及びその周辺部に於ける IHMS の分布状態等の面から基礎的な実験的検討を行つた結果、以下のような結論を得た。

1. 実験的に作成された肺結核家兎の気道内に 50 mg/cc の IHMS 溶液 1 cc を注入すると、IHMS は迅速に血中へ吸収される。
2. この場合の血中濃度は注入後10分内外で最高に達し、その値は 10 γ /cc 内外である。
3. 同様に、IHMS 注入後2時間30分に於ける病巣内濃度は、集合乾酪巣では 3~7 γ /g、大きな塊状の乾酪巣では 1 γ /g 内外である。
4. 肺葉切除術時に於いて、血管の結紮に先立つて気管支を切断し、10 cc の蒸留水に溶解した IHMS 1g を切除される肺葉気管支内に注入すると、血中濃度は多くの場合極めて微量に過ぎない。併しながら、注入後2時間30分に於ける切除肺の乾酪物質内の IHMS の濃度は、痕跡程度に過ぎないものから 1 g 当り 8.5 γ を示すものまである。そして、乾酪巣乃至空洞内容の軟化融解の傾向が強い程 IHMS の濃度は高い傾向にある。

5. 放射性同位元素 C¹⁴ によつて標識された IHMS を用いてマイクロラジオオートグラフを作成し、気道内に注入された IHMS の分布状態及び病巣内に到達する経路を形態学的に観察すると、病巣周辺の健常肺及び病巣内に残存する気管枝壁、肺胞壁等に多量の IHMS が存在し、これ等の部分から病巣内に IHMS が滲透している所見が認められる。

6. 以上のようなことから、抗結核剤特に IHMS の気道内注入療法は全身的投与にはみられない局所作用を期待出来るわけであり、同時に全身的投与にも劣らない高い血中濃度が得られるものであるから、臨床的に応用する価値を有する治療法であるということが出来る。

(本論文の要旨は第7回国際気管食道科学会に於いて発表した。又、C¹⁴ 標識 IHMS は第一製薬学術部から提供されたものである。附記して謝意を表する。)

文 献

- 1) Alfred Heller et al. : Studies with C¹⁴ labeled para-aminosalicylic acid and isoniazid. Am. Rev. Tub., 75 : 1 (1957)
- 2) Barclay W. R. et al. : Distribution and excretion of radioactive isoniazid in tuberculous patients. J. Am. Med. Assoc., 151 : 16 (1953)
- 3) Bonet Maury et al. : Dosage dans le sang de la souris de l'isoniazide marquée par le C¹⁴. Acta. Phtisol., 3 : 14 (1954)
- 4) 堀内誠三他 1 : 剔除結核腎空洞内のストマイ濃度について., 日泌尿会誌 43 : 9 (1952)
- 5) 古関靖夫 : オートラジオグラフィ., 納谷書店 (1954)
- 6) 近藤茂 : 骨関節結核の病巣内ストレプトマイシン濃度について特に病巣廓清術と関連したストレプトマイシンの作用機転について. 京大結研紀要., 第2巻 第2号 (1954)
- 7) 村沢健介・今市邦太郎 : 結核化学療法の基礎的研究 第54報 Isonicotinic acid Hydrazide 吸入後の肺内分布に関する組織化学的研究., 金沢結研 結核研究所年報., 第13巻上 (1955)
- 8) Roth. L.J. et al. : The distribution of C¹⁴

- labeled Isonicotinic Acid Hydrazine in normal mice., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 81 : 566 (1952)
- 9) Scott. P. G. W. : The detection and determination of isonicotinyI hydrazide., J. Pharm. & Pharmacol., 4 : 681 (1952)
- 10) Turunen, M. : Determination of SM in various Parts of the resected tuberculous lung., Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae., 35 : 1 (1957)
- 11) Willard Johnson & George Corte : Inhibition of isoniazid acetylation in vitro in vivo., Proc. Soc. Exp. Biol., 92 : 2 (1956)
- 12) 本多徳児 : ストマイ筋注各臓器中「ス」分布特に実験的肺結核に於ける病巣各部の「ス」濃度について., 抗酸菌病研究雑誌 7 : 3 (1951)