

δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-Norvaline (HON) の 抗結核菌作用に関する研究

〔第3篇〕 HON と諸種抗結核薬との試験管内併用効果並びに 相互薬剤間の耐性上昇形式

京都大学結核胸部疾患研究所内科学第1部（主任 教授 内藤益一）

蒲 田 迪 子

第1章 緒 言

生体内結核菌の滅菌が可能で且つ副作用の少ない薬剤の出現こそ、化学療法の理想であり終局目的でもある。

顧みると1944年¹⁾ 来、結核化学療法は著るしく進歩したものの、その何れの薬剤の効果にも尚、限界があり検討されねばならぬ諸点が残されている。例えば既存の薬剤の抗結核菌作用は、概ね菌の代謝を長期にわたり障害し菌の増殖能を奪うが、すべての菌体に対して殺菌的に作用するとは言えないので、これらの単独使用によっては必然的に菌の耐性化を来たしやうい。この傾向は特に菌の増殖期に強く顕われることが知られている。この菌と薬剤との相互関係を考慮し、病巣内結核菌の発育を停止させ、或は菌の耐性化を防止して、治療効果を挙げる為の研究に努力を払わなければならない。

1945年、単独療法の強化策として SM-promin 併用を Smith & McClosky²⁾ が実験的に報告し、翌年 SM-sulfonamide 併用による耐性上昇遅延を Middlebrook & Yegian³⁾ が実験的に報告し、1948年には Demerec⁴⁾ が細菌の耐性発現防止策として同一病原菌に効果のある2種以上の作用機序の異なる薬剤を併用する事が理論

的に有利であると述べた。その後も併用療法の利点について種々の報告⁵⁻⁹⁾ がなされ、当研究室においても諸種結核化学療法剤の併用方式についての研究がなされた結果、薬剤併用による抗菌作用の強化及び耐性化の遅延について、多くの業績¹⁰⁻¹⁵⁾ が発表された。

著者は第1篇¹⁶⁾ に於いて HON 単独の試験管内静菌作用、殺菌作用及び耐性上昇形式について、第2篇¹⁷⁾ に於いては HON 単独の毒性、投与後の血中静菌力の推移、動物治療実験並びに少数例ではあるが臨床試験の成績等を記載した。これらの検討から、HON の抗結核作用は化療方式の主剤となり得る程強力なものでなく、その利用価値は主として他剤との併用効果に期待されるという結論を得た。

本篇に於いては、HON と併用効果を示す薬剤を探究する目的で SM, PAS, INH, KM, CS, TH, VM, PZA, EB, SOM, SI, DAT^{18,19)}, TC (薬剤略号は第1篇¹⁶⁾ に記載した) 及び 8-Oxyquinoline (以下 OQ と略称する) の14検体について試験管内実験を行なった成績について報告する。著者はもとより、この *in vitro* の併用成績及び耐検成績がそのまま臨床にあてはまるものと考えてはいないが、本剤の臨床的価値を論ずる上に基礎的な資料の一部となり得るものと思われる。

第2章 HON と諸種抗結核薬との 試験管内併用効果

第1節 実験材料

第1項 使用薬剤；本実験における供試抗結核薬は SM, PAS, INH, KM, CS, TH, VM, PZA, EB, SOM, SI, DAT, TC 及び OQ の14検体である。OQ は秤量後、0.1% の濃度に N,N-dimethylformamide (D.F.A.) に溶解し滅菌蒸留水で所要濃度に希釈した。HON 及び他の13検体は第1篇¹⁶⁾に記載した方法で、各検体の所定濃度の溶液を作成した。

第2項 使用培地；0.5% Albumin 加硫安培地を使用した。

第3項 使用菌液；本実験に於ける供試菌株は、1%小川培地に継代培養した H37Rv 感性株である。菌液作成法は第1篇¹⁶⁾と同様である。

第2節 実験方法並びに実験成績

第1項 併用静菌効果

実験方法

先づ硝子キャップ付 コルベンを10個宛2系列準備し、0.5% albumin 加硫安培地を第1コルベンに36.0 ml, 第2コルベン以下第10コルベン迄20.0 ml 宛分注した。予かじめ第1管の薬剤濃度の20倍高濃度に調製した併用薬剤 (HON 溶液) の4.0 ml を第1コルベンに加え攪拌の後、その20.0 ml を第2コルベンに移し、以下第9コルベン迄同様の操作を反覆し第10コルベンは薬剤を含みぬ対照培地とした。主剤についても同様の方法でコルベンによる倍数希釈列を作成した。

次いで縦列10管、横列10管宛合計100本の硝子キャップ付滅菌小試験管を併列し、併用薬剤 HON を最高濃度に含有する第1コルベンの培地を第1横列の10管に1.5 ml 宛分注し、同様に第2コルベンの培地を第2横列に、以下同様にして希釈順に従って第10横列迄分注した。一方、各主剤の倍数希釈列の中、最高濃度を含有する第1コルベンの内容は第1縦列の10管に1.5 ml 宛分注し、次に第2コルベンの溶液を第2縦列に、以下順次同様にして1.5 ml 宛第10縦列迄分注した。従って各試験管の培地量は3.0 ml であり、第

10縦列は併用薬剤 HON のみの、第10横列は各主剤のみの倍数希釈列となり、第10横列第10管目は薬剤を全く含まない培地である。かくして HON と他抗結核薬との各種濃度の併用培地群を作成した。

さて、1%小川培地斜面の発育旺盛な菌集落から、1.0 mg/ml 石油ベンジン H37Rv 株浮游液を作成し、これにシリコン被覆スライド^{20~24)}を瞬時浸漬して菌を附着させ、此のスライド1枚宛を手早く交叉希釈列の全ての試験管内に投入し、37°C で4週間培養後、菌発育状態を肉眼的に観察し結核菌に対する静菌効果を判定した。尚、接種菌量は1スライド当たり約 10^6 生菌単位である。

実験成績

表1に示した。表中(卅)は菌がスライド全表面積を蔽い密集せる状態、(卅)はスライド面積の2/3を占める程度の発育、(+)は菌がスライド面積の1/3に発育している場合、(-)は菌発育を全く認めぬ場合であり、100個に満たぬ集落を認めた場合はその数を記録した。

著者は(+)以下を静菌効果あり、(卅)以上の菌発育を認めた場合を静菌効果なしと見做し、ここに判定の基準をおいて併用成績表1を検討し、静菌効果の認められなかった部分を太線で囲んだ。

HON-SM 併用実験に於いては HON, SM 夫々単独の静菌最低濃度 (MIC) は主剤、併用薬剤を含みぬ第10縦列及び第10横列の MIC で示され夫々 5.0 γ /ml, 0.625 γ /ml である。併用効果については、SM の MIC は HON を 2.5 γ /ml に含有する培地では単独 MIC の 1/2 である 0.313 γ /ml であり、SM の静菌力は単独の場合に比し静菌濃度以下の濃度の HON 併用により2倍増強されている。逆に、HON の MIC は SM を 0.313 γ /ml に含有する培地では単独 MIC の 1/2 である 2.5 γ /ml となり、HON の静菌力は単独の場合に比し静菌濃度以下の濃度の SM 併用により2倍に増強された。同様の方式で HON と他剤との併用効果をみると、HON-TH, HON-SOM の組合せに於いては併用により主剤 TH, SOM 及び併用剤 HON の双方の静菌力が何れも2倍増強され、HON-INH, HON-TC,

表 1-1 HON と他抗結核薬との併用静菌効果

HON	SM									
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡
1.25	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡	≡
0.625	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡	≡
0.313	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡
0.156	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡
0.078	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡
0.039	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡
K	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡

HON	PAS									
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.625	-	-	-	-	-	-	+	+	+	≡
0.313	-	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡
0.156	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡	≡
0.078	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡	≡
0.039	-	-	-	-	±	±	≡	≡	≡	≡
K	-	-	-	-	±	±	≡	≡	≡	≡

HON	KM									
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.78	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.39	-	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡
K	-	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡

HON	INH									
	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007	0.003	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.625	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.313	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.156	-	-	-	-	-	-	-	+	≡	≡
0.078	-	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡
0.039	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡	≡
K	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	≡	≡

HON	VM									
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
0.78	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
0.39	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡
K	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡	≡

HON	CS									
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	10	+	+	+	+	+
0.78	-	-	-	-	10	+	+	+	+	+
0.39	-	-	-	-	30	≡	≡	≡	≡	≡
K	-	-	-	-	50	≡	≡	≡	≡	≡

表 1-2 HON と他抗結核薬との併用静菌効果

HON \ TH	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.25	1	1	1	1	1	1	1	+	+	+
0.625	1	1	1	1	1	1	1	+	+	+
0.313	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+
0.156	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+
0.078	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+
0.039	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+
K	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+

HON \ PZA	1000	500	250	125	62.5	3.13	15.6	7.8	3.9	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0.625	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
0.313	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
0.156	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++
0.078	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
0.039	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++

[illegible]

	DAT									
HON	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.25	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
0.625	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++
0,313	—	—	—	—	—	+	+	++	++	++
0.156	—	—	—	—	+	+	++	++	++	++
0.078	—	—	—	+	++	++	++	++	++	++
0.039	—	—	—	+	++	++	++	++	++	++
K	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++

EB										
HON	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.19	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	90	+	++	++	++
0.78	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
0.39	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
K	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++

HON	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007	0.003	K
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0.625	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
0.313	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
0.156	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++
0.078	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++
0.039	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++
K	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++

表 1-3 HON と他抗結核薬との併用静菌効果

TC HON	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
0.78	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
0.39	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
K	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++

SI HON	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	K
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1.56	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
0.78	-	-	-	-	-	5	++	++	++	++
0.39	-	-	-	-	-	10	++	++	++	++
K	-	-	-	-	-	10	++	++	++	++

HON-EB 及び HON-OQ に於ける場合は併用により主剤，併用剤の双方の静菌力が夫々4倍増強された。又，HON-PAS に於いては併用により PAS は8倍以上，HON は4倍迄増強され，HON-PZA の組合せでは PZA は16倍以上，HON は16倍迄，HON-DAT の併用に於いては DAT は64倍以上，HON は32倍以上静菌力が増強されたが，HON-SI, HON-KM, HON-CS 及び HON-VM に於いては併用静菌効果が両者の間に認められなかった。

第2項 併用殺菌効果

実験方法

併用静菌効果と一連の実験ではあるが，HON 単独の殺菌力が第1篇¹⁶⁾に示した如く非常に弱い為に併用静菌効果をみた実験に比し，本実験に於いては第1試験管の薬剤含有量を高濃度に調製した。同様に，これと組合せる主剤の第1管濃度についても検討し，強い殺菌力を有する INH は10 γ /ml に，比較的強い KM は500 γ /ml に，次ぐ SM は2000 γ /ml に，弱い PZA は10⁴ γ /ml になる様に夫々の薬剤濃度を調製した。表2に示す如くである。

静菌効果の判定後，各々のスライドを1枚宛，生理的食塩水を入れた試験管に移して，30分間宛2回洗滌し薬剤を可及的除去した後，薬剤を含みぬ0.5%albumin 加硫安培地に移し，更に37°C で4週間培養後，発育してくる菌集落を観察し殺菌効果を判定した。

実験成績

表2に示した。判定基準は併用静菌効果の場合と全く同様である。尚，表中，殺菌効果の認められなかった部分を太線で囲んだ。

HON-SM 併用実験に於いては HON, SM 夫々単独の殺菌最低濃度 (MSC) は主剤，併用薬剤を含みぬ第10縦列及び第10横列の MSC で示され，夫々250 γ /ml, 31.3 γ /ml である。併用効果については SM の MSC は HON を125 γ /ml に含有する培地では単独 MSC の1/4である7.8 γ /ml であり，HON を31.3 γ /ml に含有する培地では単独 MSC の1/2である15.6 γ /ml であり，SM の殺菌力は単独の場合に比し，HON 併用により4倍増強された。逆に HON の MSC は SM を15.6 γ /ml に含有する培地では単独 MSC の1/8である3.13 γ /ml を示し，又，SM を7.8 γ /ml に含有する培地では単独 MSC の1/2である125 γ /ml を示し，HON の殺菌力は単独の場合に比し SM 併用により8倍迄増強された。同様の方式で HON と他剤との併用効果をみると，HON-KM 併用では KM は2倍迄，HON は4倍迄，HON-VM 併用では VM は4倍迄，HON は2倍迄殺菌力が増強され，HON-PAS 併用では PAS は16倍

表 2-1 HON と他抗結核薬との併用殺菌効果

SM HON	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	K
2000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1000	—	—	—	—	—	—	3	5	5	15	3
500	—	3	3	5	10	10	15	15	15	30	15
250	—	3	3	10	10	10	+	+	+	+	+
125	—	3	3	10	10	20	+	+	+	++	++
62.5	—	5	3	20	20	20	+	+	++	++	++
31.3	3	5	10	30	20	20	+	+	++	++	++
15.6	5	5	20	50	20	20	+	++	++	++	++
7.8	5	5	20	50	20	30	+	++	++	++	++
K	5	5	30	50	20	30	+	++	++	++	++

HON \ PAS										
	10000	5000	2500	1250	625	312.5	156.3	78.1	39.0	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	30	30	+	+	+	+
250	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
125	-	-	+	+	+	+	+	+	+	++
62.5	-	2	+	+	+	+	+	+	++	++
31.3	-	3	+	+	+	+	++	++	++	++
15.6	-	3	+	+	+	++	++	++	++	++
7.8	-	3	+	+	+	++	++	++	++	++
K	-	3	+	+	+	++	++	++	++	++

HON \ KM										
	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	1.95	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	5	10	20	10	10	20	30	+	+	+
250	5	30	+	+	+	+	+	++	++	++
125	10	30	+	+	+	+	+	++	++	++
62.5	20	30	+	+	+	+	++	++	++	++
31.3	20	30	+	+	+	+	++	++	++	++
15.6	20	30	+	+	+	+	++	++	++	++
7.8	30	30	+	+	+	+	++	++	++	++
K	30	30	+	+	+	+	++	++	++	++

HON \ INH										
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	5	5	10
250	-	-	-	-	-	-	30	30	50	+
125	-	-	-	-	-	5	30	+	++	++
62.5	-	-	-	-	3	5	50	+	++	++
31.3	-	-	-	-	3	5	50	+	++	++
15.6	-	-	-	-	3	5	50	+	++	++
7.8	-	-	-	-	3	5	50	+	++	++
K	-	-	-	-	3	5	80	+	++	++

HON \ VM										
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	3	10	10	20	+	+	+	+	+	+
250	5	+	+	+	+	+	+	+	++	++
125	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
62.5	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
31.3	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
15.6	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
7.8	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
K	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++

HON \ CS										
	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	5	5	2	1	1	1	1	1	20
500	-	10	+	+	+	+	+	+	+	+
250	-	10	+	+	+	+	+	++	++	++
125	-	10	+	+	++	++	++	++	++	++
62.5	-	15	+	+	++	++	++	++	++	++
31.3	-	15	+	+	++	++	++	++	++	++
15.6	-	20	+	+	++	++	++	++	++	++
7.8	-	20	+	+	++	++	++	++	++	++
K	-	30	+	+	++	++	++	++	++	++

表 2-2 HON と他抗結核薬との併用殺菌効果

TH HON	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	5	3	5	5	3	3	5	5
500	-	-	5	+	+	+	+	+	+	+
250	-	-	5	+	+	+	+	+	+	+
125	-	-	5	+	+	+	++	++	++	++
62.5	-	-	10	+	+	+	++	++	++	++
31.3	-	-	15	+	+	+	++	++	++	++
15.6	-	-	15	+	+	+	++	++	++	++
7.8	-	-	15	+	+	+	++	++	++	++
K	-	-	15	+	+	+	++	++	++	++

PZA HON	10000	5000	2500	1250	625	312.5	156.2	78.1	39.0	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
250	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
125	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
62.5	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
31.3	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
15.6	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
7.8	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
K	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++

SOM HON	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	5	5	5	3	5	5
500	-	-	5	10	+	+	+	+	+	+
250	-	-	10	+	++	++	++	++	++	++
125	-	-	15	+	++	++	++	++	++	++
62.5	-	-	10	+	++	++	++	++	++	++
31.3	-	-	10	+	++	++	++	++	++	++
15.6	-	-	10	+	++	++	++	++	++	++
7.8	-	-	15	++	++	++	++	++	++	++
K	-	-	10	++	++	++	++	++	++	++

DAT HON	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
250	-	-	-	-	+	+	+	+	+	++
125	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
62.5	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
31.3	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
15.6	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
7.8	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
K	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++

EB HON	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
250	-	-	-	-	-	-	-	-	10	+
125	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
62.5	-	-	-	-	10	+	+	++	++	++
31.3	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
15.6	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
7.8	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++
K	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++

OQ HON	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	30	30	30	50
500	-	-	-	-	-	5	50	50	+	+
250	-	-	-	-	-	5	+	+	+	+
125	-	-	-	-	-	15	+	+	++	++
62.5	-	-	-	-	-	3	+	++	++	++
31.3	-	-	-	-	-	5	++	++	++	++
15.6	-	-	-	-	5	10	++	++	++	++
7.8	-	-	-	-	5	10	++	++	++	++
K	-	-	-	-	10	15	++	++	++	++

表 2-3 HON と他抗結核薬との併用殺菌効果

HON \ TC	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
250	-	-	-	-	-	2	10	+	++	++
125	-	-	-	1	1	+	++	++	++	++
62.5	-	-	-	5	5	+	++	++	++	++
31.3	-	-	1	+	+	+	++	++	++	++
15.6	-	-	1	+	+	+	++	++	++	++
7.8	-	-	1	+	+	+	++	++	++	++
K	-	-	2	+	+	+	++	++	++	++

HON \ SI	10000	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	K
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
250	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
125	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
62.5	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++
31.3	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++
15.6	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++
7.8	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++
K	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++

以上、HON は8倍迄、HON-CS 併用ではCS は8倍迄、HON は2倍迄殺菌力が増強された。又、HON-PZA 併用ではPZA は8倍迄、HON は64倍以上殺菌力が強化され明らかに併用効果が存在するが、7.8 γ /ml 以下の HON 濃度についてはこの実験では検討出来ていない。HON-SOM 併用ではSOM は2倍迄、HON は64倍迄、HON-TC 併用ではTC は8倍迄、HON は32倍迄増強され、HON-SI の組合せでは双方の殺菌力が2倍増強され、HON-DAT 併用ではDAT は8倍以上、HON は2倍迄殺菌力が強化された。HON-EB の場合は併用により何れも2倍迄、HON-OQ の併用では何れも殺菌力が4倍迄増強されたが、HON-INH、HON-TH に於いては併用殺菌効果を示さなかった。

第3章 HON 併用による試験管内 他剤耐性上昇阻止効果

第1節 実験材料

第1項 使用薬剤；本実験における供試抗結核薬は SM、INH、KM 及び TH の4検体である。第1篇¹⁶⁾に於いて述べた如き方法により、各検体の所定濃度の溶解液 (SM $10^2 \gamma$ /ml, INH 10γ /ml, KM $10^2 \gamma$ /ml 及び TH $10^2 \gamma$ /ml) を作成した。

第2項 使用培地；常用の Tween-albumin 培地及び、HON 溶液を加えて作成した HON 0.1 γ /ml 含有 Tween-albumin 培地を使用した。

第3項 使用菌液；本実験における供試菌株は Tween-albumin 培地に7-10日間培養した H37Rv 感性株である。菌液作成法は第1篇¹⁶⁾と同様である。

第2節 実験方法並びに実験成績

実験方法

各検体毎に10管1系列の倍数希釈列を作成し、1代2週間の増量継代培養法を行なった。HON 0.1 γ /ml 含有 Tween-albumin 培地を使用した系列は各薬剤耐性進展に及ぼす HON の併用効果を検討する為であり、常用の Tween-albumin 培地を使用した系列は各薬剤単独の耐性上昇形式を観察し、前者の対照実験として比較検討する為である。尚、各系列の第10管は薬剤を含み対照培地とした。接種菌量 0.1 mg/ml 、2週間培養後判定し、対照と略々同程度の発育を示した薬剤濃度をもって第1代の耐性値とした。次いで2週目にこの試験管の薬剤含有濃度より更に高濃度で始まる倍数希釈列を新たに作成し、これに菌を移植、2週間培養後耐性値を判定し第2代とした。以下同様にして第4代迄行なった。各代の移植菌量は1試験管当り約 0.1 mg である。

実 験 成 績

表3, 図1の成績を得た。即ち SM 単独の場合4代の耐性値が 62.5 γ /ml で200倍上昇したが, HON 併用の場合は 15.6 γ /ml で100倍にとどまり, 耐性上昇は僅かながら遅延された。

INH 単独の場合は4代で400倍, 12.5 γ /ml 耐性に達したが, HON 併用時には100倍, 1.56 γ /ml であった。

KM に於いては単独, HON 併用いずれの場

合の耐性も4代で100倍上昇し, HON 併用による耐性上昇の遅延がみられなかった。

TH の場合は, 単独の耐性は4代で50倍, 31.3 γ /ml を示したが, HON を併用することにより20倍, 6.25 γ /ml にとどまった。

第4章 総括並びに考按

試験管内で薬剤の静菌力を検討する際に, その成績は主として使用培地の種類, pH 及び接

表 3 HON と他抗結核薬併用時に於ける他抗結核薬の耐性値の推移

薬 剤	継代数	I	II	III	IV
SM 単 独		0.313	6.25	12.5	62.5
HON 併 用 時		0.156	1.25	3.13	15.6
INH 単 独		0.0313	0.0625	1.25	12.5
HON 併 用 時		0.0156	0.0313	0.125	1.56
KM 単 独		0.156	0.313	12.5	15.6
HON 併 用 時		0.078	0.313	6.25	7.8
TH 単 独		0.625	1.25	12.5	31.3
HON 併 用 時		0.313	0.313	1.25	6.25

増量継体法 Tween-albumin 培地

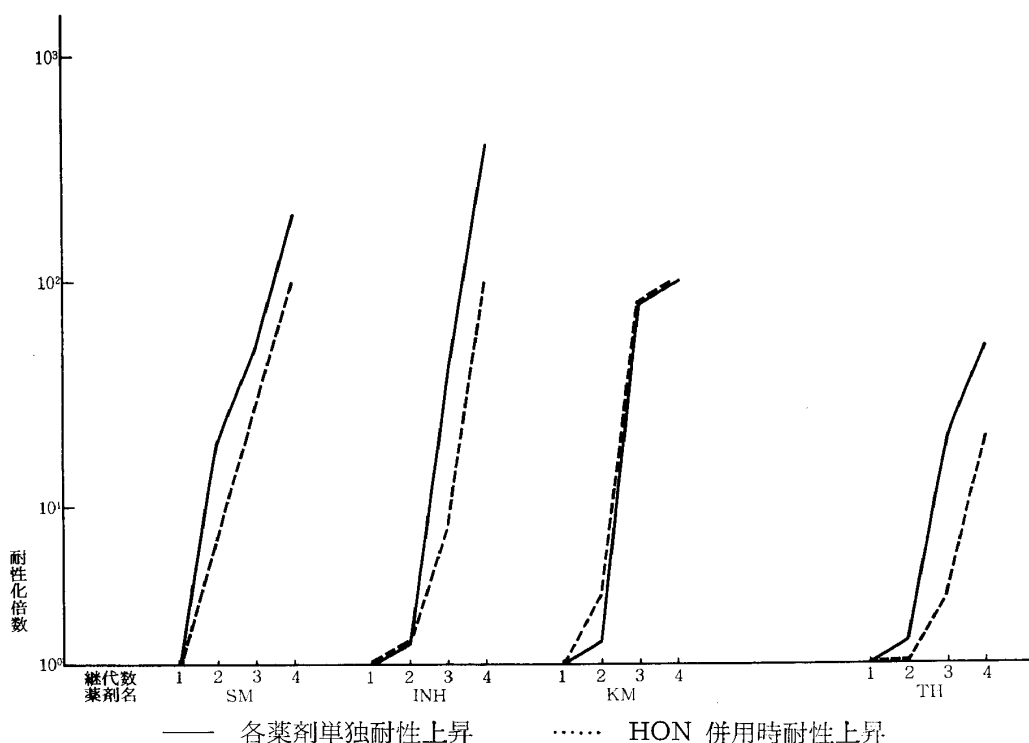


図 1 各種抗結核薬耐性化に対する HON の併用阻止効果

種菌量等の因子に大きく影響される事はよく知られている。例えば研究室久世²⁵⁾の実験成績によれば、シリコン被覆スライド培養法では、常用の深部培養法に比べて薬剤によっては静菌力が強く出る場合があるし、一つの薬剤の静菌力でも Kirchner 培地と硫安培地 とではかなり異なって表現される²⁶⁾。

又、ある薬剤と他剤との併用効果を試験管内で検討する場合には、薬剤相互の併用濃度²⁷⁾、併用方式及び接種菌量²⁸⁾が問題になる。併用薬剤濃度については、相互の薬剤を subeffective dose で併用する方法^{29,30)} や、併用剤の何れか一剤の濃度を一定にする方法等があり、併用方式については、臨床的立場から薬剤相互の試験管内併用比を1日の臨床投与量の割合で行なった報告²⁸⁾があり、又、細菌学的立場から、夫々の併用薬剤相互の MIC の割合で併用効果を検討する方法³¹⁾も用いられて来たが、いずれも一長一短がある。著者は幾通りもの薬剤濃度の組合せにより検討するのが適切ではなからうかと考え、所謂交叉稀釈法を本篇での実験に用いて、HON と各種抗結核薬を併用した際の静菌及び殺菌効果を検討した。

交叉稀釈法に於ける併用効果の有無の判定については、菌発育を認めた部分を模式図の如くに区画し、Aを併用効果なし、Bを併用効果あり、Cは拮抗作用のある場合とした。即ち併用効果の認められた時はB図の如く(一)部分が増加し、拮抗作用を示す時はC図の如く(一)部分が減少する事が考えられ、(一)部分の増減が縦

又は横軸の何れか1方向により著明に顕われる場合、夫々に意味があるものと考えられる。

—	—	—	—
—	+	+	+
—	+	+	+
—	+	+	+

模式A図

—	—	—	—
—	(一)	(一)	+
—	(一)	+	+
—	+	+	+

模式B図

—	—	—	—
—	+	+	+
—	(一)	+	+
—	(一)	+	+

模式C図

さて著者は、併用効果を検討する判定基準を前章に記した如くに決めたが、見地を変えて、集落の発育を全く認めない最低濃度に判定基準をおいて検討するのも一つの方法であろう。此の判定方法を第1判定法とし、著者の選んだ判定方法を第2判定法とすると、夫々の成績は表4、表5に掲げる如く両者間に多少差違が認められる。

即ち研究室の田中³²⁾が SOM と他剤との併用効果の検討に用いた方法に倣って、併用効果の大小を併用効果部分の多少によって考察すると、(併用効果部分とは、模式B図に於いて模式A図よりも増加した(一)部分の個数を意味するものとする) 先づ併用静菌効果の成績では、10個以上の併用効果部分を認めた薬剤は PZA,

表 4 HON と他種抗結核薬との併用静菌効果部分

併用薬剤	SM	PAS	INH	KM	TH	CS	VM	PZA	SI	TC	SOM	EB	DAT	OQ
併用部 効分														
第1判定法	4	14	8	0	7	0	2	≥17	3	2	4	2	12	5
第2判定法	1	4	3	0	1	0	0	15	0	3	1	3	15	3

表 5 HON と他種抗結核薬との併用殺菌効果部分

併用薬剤	SM	PAS	INH	KM	TH	CS	VM	PZA	SI	TC	SOM	EB	DAT	OQ
併用部 効分														
第1判定法	10	6	6	*0	0	0	*0	≥28	3	11	2	13	0	7
第2判定法	4	8	0	2	0	3	2	≥13	1	7	5	1	3	3

* 実験範囲内の濃度では併用効果部分を認めなかったもの

DAT 及び PAS の 3 剤で、特に PZA は第 1 判定法で 17 個以上、第 2 判定法で 15 個を示し著明な併用効果を認めた。DAT も第 1 判定法で 12 個、第 2 判定法は 15 個で略々 PZA に匹敵し、PAS も第 1 判定法で 14 個を示した。9 乃至 5 個の併用効果部分を認めたのは第 1 判定法で INH, TH 及び OQ であり、第 2 判定法では見当らなかった。4 個以下の併用効果部分を認めた SM, TC, SOM 及び EB は著者の試験管内実験成績から検討すると、併用による抗菌力の増強について大きな期待が持てないにしても極僅かに併用効果が存在する様に思われ、KM, CS, VM 及び SI の如く第 2 判定法で併用効果部分が 0 個の薬剤の場合は、併用効果が期待出来ないのではないかと考えられる。

同様に併用殺菌効果の成績を検討すると、10 個以上の併用効果部分を認めた薬剤は第 1 判定法に於ける PZA, EB, TC 及び SM の 4 剤で、特に PZA は第 1 判定法で 28 個以上、第 2 判定法でも 13 個以上を認め著明な併用殺菌効果を示した。EB, TC 及び SM では第 1 判定法による併用効果部分が大きく現われ、第 2 判定法によるそれとの差が大であった。次いで PAS は第 1 判定法で 6 個、第 2 判定法で 8 個、OQ は第 1 判定法で 7 個、第 2 判定法で 3 個、SOM は第 1 判定法で 2 個、第 2 判定法で 5 個の併用効果部分を示し、併用静菌効果の成績と同様に併用殺菌効果にも幾分の期待がもてる薬剤であるに反し、TH, CS, KM, VM, DAT, INH 及び SI は第 1, 第 2 判定法で併用効果部分 0 個又は 1 個乃至 2-3 個である点、併用殺菌効果は存在しても弱いと考えられる。

さて、本実験に於ける 1 スライド当りの附着生菌単位は 10^6 程度であり、(+) で表現した菌の発育は集落数にして約 1,000 個以下であるから、(+) 以下の発育を示した部分は、大部分の結核菌 (換言すると対照の 99.9% 以上) が静菌又は殺菌されたものと解釈出来る。この場合、接種された凡ての菌が静菌又は殺菌された濃度で、静菌又は殺菌効果を判定したのが第 1 判定法であり、大部分の菌が静菌又は殺菌された濃度で、静菌又は殺菌効果ありと判定したのが第

2 判定法である。

大部分の菌が静菌される濃度で尚、発育する少数の菌については、接種菌の薬剤感受性のばらつき、即ち耐性変異菌³³⁾の混在などが考えられ、又、大部分の菌が殺菌される濃度で尚、増殖能を失なわなかった少数の菌については Hobby³⁴⁾, Bigger³⁵⁾ 及び McDermott ら³⁶⁾が強調する bacterial persistence と密接な関係があるものと推測される。

ところで著者の実験の目的は ①試験管内での結核菌に対する HON の発育抑制効果と、②試験管内での一定の実験条件下で増殖能を失なうと云う意味での殺菌効果とを、他剤との併用成績から検討するにある。従って第 1 判定法では、接種菌量や、接種した菌が growing cell であったか、resting cell であったか等の因子が大いに関与し易い³³⁾³⁶⁾⁻⁴¹⁾ので、寧ろ第 2 判定法の方が、静菌又は殺菌効果の有無に関して比較的判断し易く且、個々の併用成績の特徴が大略把握出来ると考えられる。

そこで、第 2 判定法に注目して上述の成績を再検討し整理すると、

1) 静菌効果における併用効果部分の多い組合せは HON-PZA, HON-DAT, HON-PAS であった。

2) 殺菌効果における併用効果部分の多い組合せは HON-PZA, HON-PAS, HON-TC, HON-SOM であった。

HON と他剤との試験管内併用殺菌効果については、著者が渉猟した範囲では報告が見当たらないが、試験管内併用静菌効果については土屋ら^{42,43)}が、HON と SM, PAS, INH 夫々との組合せに於いて感受性菌、HON 耐性菌の何れでも僅かな併用効果を認め、PZA, VM, TC にも感受性菌で僅かな併用効果を、CS では更に低い程度の効果を認めたのみで、SI では認められなかったと述べている。又、KM との成績は動物実験で著明な効果を挙げるにも拘らず試験管内実験で併用効果を示さず、TH は in vitro 及び in vivo でも併用効果が示されたと報告した。著者の試験管内併用効果の成績は表 4 に示す如く土屋ら^{42,43)}と略々同様であった

が、CS のみは静菌、殺菌何れの面でも併用効果を示さなかった。HON の殺菌作用は第1篇¹⁶⁾に記載した如く単独では強力なものでなく MIC と MSC との開きは 37°C 4 週間作用の場合 PAS と同様に著明で、生体内における HON 単独の殺菌効果は先づ期待しがたい。然しながら HON が PZA 及び PAS のみならず現在迄汎く臨床的には使用されていない DAT 及び SOM 等と併用静菌、殺菌効果を示したことは今後の臨床的応用にあって期待し得る一つの利点であろう。化学療法の最終目標は生体内滅菌である事は言う迄もない。此の課題に少しでも近づく為に、我々は新しい抗結核薬の探求と共に、既存の薬剤の最も有効な投与術式の検索に努めなければならない。又、新しく抗結核物質が出現した際、その臨床的応用にあたり既存の如何なる薬剤と如何なる投与方式で併用するかが重要な問題の一つである。一次抗結核薬による治療を強力に行なって尚、排菌の続いている患者に対して、HON を第二、第三次抗結核薬の一員として利用する事は、全く無意味ではなかろうと考える次第である。

次に、HON と他の薬剤併用による耐性獲得防止についての試験管内実験成績は、さきに土屋ら⁴⁴⁾が報告した。即ち HON は INH に対する耐性上昇を明瞭に阻止し、SM, KM, VM に対しても耐性上昇を阻止したが、TH に対する耐性上昇には影響を与えなかったと言う事である。著者の実験成績では SM, INH, KM 及び TH の耐性上昇が或程度遅延された。従って耐性遅延の面からも、HON は或程度臨床的に試用する価値があるのではないかと考えられる。

第5章 結 論

HON と諸種抗結核薬との試験管内併用効果を静菌作用、殺菌作用の両面から検討し、又、諸種抗結核薬の耐性上昇に及ぼす HON 併用の影響を検討し次の結論を得た。検討された薬剤は SM, PAS, INH, KM, CS, TH, VM, PZA, EB, SOM, SI, DAT, TC 及び OQ の14検体である。

1) HON と併用静菌効果のみられた薬剤は PZA, DAT 及び PAS で、KM, CS, SI 及び VM は併用効果を示さなかった。

2) HON と併用殺菌効果のみられた薬剤は PZA, PAS 及び SOM で、INH 及び TH は併用効果を示さなかった。

3) 静菌、殺菌作用の何れの面でも HON はこれ等の結核化学療法剤と拮抗作用を示さなかった。

4) HON 併用により SM, INH 及び TH の耐性上昇は僅かに遅延されるが、KM に於いては耐性化抑制効果は認められない。

謝辞：稿を終るに臨み御指導を賜りました前川暢夫助教授、吉田敏郎博士、津久間俊次博士、中西通泰博士に深く感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) Schatz, A., Bugie, E. & Waksman, S.A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 55:66, 1944
- 2) Smith, H.I. & McClosky, W.T.: Pub. Health. Rep., 60:1129, 1945
- 3) Middlebrook, G. & Yegian, D.: Amer. Rev. Tuberc., 54:553, 1945
- 4) Demerec, M.: J. Bact., 56:63, 1948
- 5) Graessle O.F. & Petrowski, J.J.: J. Bact., 57:459, 1949
- 6) Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tuberc., 55:765, 1952
- 7) Schwartz, W.S. & Moyer, R.E.: Tr. 11th Conf. Chemo. Tuberc., Vet. Adm., 1:302, 1952
- 8) Schwartz, W.S. & Moyer, R.E.: Tr. 12th Conf. Chemo. Tuberc. Vet. Adm., 2:296, 1953
- 9) McDermott, W.: Amer. Rev. Tuberc., 60:319, 1954
- 10) 内藤益一, 他: 結核, 34増刊:160, 昭和34年
- 11) 内藤益一, 他: 結核, 35特別:60, 昭和35年
- 12) 内藤益一, 他: Chemotherapy, 8:457, 昭和35年
- 13) 内藤益一, 他: 京大結研紀要, 9:136, 昭和36年
- 14) Naito, M., *et al.*: Acta Tuberc. Jap., 12:1, 1962

- 15) 内藤益一, 他: 臨床と研究, 40: 182, 昭和38年
- 16) 蒲田迪子: 京大結研紀要, 15: 135, 昭和42年
- 17) 蒲田迪子: 京大結研紀要, 15: 146, 昭和42年
- 18) Buu-Hoï, N.P. et Dat-Xuong N.D.: Compt. Rend. Acad. Sci., 237: 498, 1953
- 19) Tacquet, A., Macquet, V., Buu-Hoï, N.P. et Dat-Xuong, N.D.: Ann. Inst. Pasteur, Lille, 10: 43, 1958~1959
- 20) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3 増刊 1: 461, 昭和34年
- 21) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3 増刊 1: 468, 昭和34年
- 22) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3 増刊 2: 22, 昭和34年
- 23) 内藤益一, 他: 京大結研紀要, 12: 112, 昭和39年
- 24) Higashi, K., *et al.*: Amer. Rev. Resp. Dis., 85: 392, 1962
- 25) 久世文幸: 京大結研紀要, 12: 97, 昭和39年
- 26) 蒲田迪子: 未発表
- 27) 東村道雄: 結核, 36: 733, 昭和36年
- 28) 河田利延: 京大結研紀要, 7-3 増刊 2: 31, 昭和34年
- 29) Karlson, A.G. & Feldman, W.H.: Amer. Rev. Tuberc., 68: 575, 1953
- 30) 立花暉夫: 結核, 32: 311, 昭和32年
- 31) 河田利延: 京大結研紀要, 7-3 増刊 2: 63, 昭和34年
- 32) 田中健一: 京大結研紀要, 13: 13, 昭和39年
- 33) Kanai, K.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 8: 63, 1955
- 34) Hobby, G.L., Meyer, K. and Chaffee, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 50: 281, 1942
- 35) Bigger, J.W.: Lancet (Lond.), 2: 497, 1944.
- 36) McDermott, W.: Yale J. Biol. Med., 30: 257, 1958
- 37) Wagner, W.H.: Beitr. Klin. Tuberc., 107: 453, 1952
- 38) Horai, Z., *et al.*: Med. J. Osaka Univ., 7: 795, 1957
- 39) Hobby, G.L. & Lenert, T.F.: Amer. Rev. Tuberc., 76: 1031, 1957
- 40) 稲津舜介: 鹿児島大学医学雑誌, 11: 2732, 昭和35年
- 41) Trnka, L., Vrbančik, R. & Havel, A.: Wien. Med. Wschr., 117: 146, 1967
- 42) 土屋皖司, 他: 武田研究所年報, 23: 164, 昭和39年
- 43) 土屋皖司, 他: 武田研究所年報, 22: 148, 昭和38年
- 44) 土屋皖司, 他: 武田研究所年報, 23: 149, 昭和39年