

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 1 篇〕 EB 単 独 の 抗 結 核 作 用

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

結核化学療法の発展により、肺結核症の治療が飛躍的な進歩をとげた様の一応は見えるけれども、現実の問題として、化学療法だけで完全に治癒したと断言出来る症例は必ずしも多くはないし、それどころか治癒に到る第 1 段階としての喀痰中結核菌の培養陰性化にすら達し得ない場合も存在する。その原因の一つは菌の薬剤耐性獲得という宿命的な現象にあると言える。

現に、長期の化学療法にもかかわらず喀痰中結核菌の培養陰性化に達し得なかった患者の多くは、それらの薬剤に対する耐性菌を喀出するに至っている。それらの患者のなかで、外科的療法の対象となり得ないものや外科的治療の失敗例は既使用薬剤を如何なる方法で使用しようとも無効である。のみならず、一次抗結核薬耐性菌による感染患者が、年毎に、増加の傾向にあるという憂うべき現象¹⁻³⁾が見られている。これら耐性患者が激増し、深刻な社会問題化するのを防ぐ為の対策の樹立は目下の急務であり、結核研究者の義務でもある。

この対策を化学療法の面にしぼって考えるならば、第一は初回化学療法の強化にあり、第二は再化学療法の強化にあると思考する。

第一の問題は著者の研究室に於て、数年来、推進されて来た研究主題であるが⁴⁻⁶⁾、ここには第二の問題のみをとりあげる。

今日、我々の手持の主要な二次抗結核薬とし

ては、kanamycin (KM), cycloserine (CS), 及び ethionamide (TH) が数えられるが、KM は streptomycin (SM) に近い性能を持つものであり、CS は PAS に劣り、TH は INH と比肩すべくもない。然も、対象となる患者は、SM, PAS, 及び INH の長期治療によっても、成功し得なかった難治肺結核患者が大部分であるから、再化学療法の劣勢はおおうべくもない。その上、再化学療法の失敗例に対しては、現在の所、殆んど方法がなく、特に、外科的療法の対象ともなり得ない患者については、手をこまぬいて傍観するほかないというのが実情である。

この現実を前にして、まず第一に望まれるのは、強力な新抗結核薬の発見であり、第二には、其者を加える事によって再化学療法を強化する事である。

さて、アメリカの Lederle Laboratories に於て、1961年 Wilkinson⁷⁾ らによって合成された 2,2'-(Ethylenediimino)-di-1-butanol は、Thomas⁸⁾らの報告、並びに Karlson,⁹⁾¹⁰⁾ Lutz,¹¹⁾ 及び Lal¹²⁾ らの優秀な追試成績によって注目をあびるに至り、結核再化学療法の一翼をになうものとして、本邦に於ても、多大の期待がかけられている。

そこで、著者も本薬剤について、若干の基礎実験を行なうと共に、二次抗結核薬 KM, CS, TH, 及び著者の研究室で開発したオルトアミノフェノール・メタンスルホン酸ソーダ (SOM)

¹³⁾¹⁴⁾ に本薬剤を加えた5剤併用による再化学療法強化の可能性を基礎的に検討した次第である。

まず本篇に於ては、2,2'-(Ethylenediimino)-di-1-butanol (以下、EB と略記し、d 体、dl 体を区別する必要があるときは、D-EB, DL-EB と記した) 単独の抗結核作用について、各種培地における制菌最低濃度、これに及ぼす培地 pH、接種菌量、培地血清濃度の影響、in vitro における EB の安定性、他剤との交叉耐性、自然耐性菌の頻度、EB の試験管内殺菌効果、生体投与時の血清制菌力の消長、結核マウスの生存日数を指標とせる EB 単独の治療効果、並びに同一投与量での他抗結核薬との治療効果の比較を検索した。

第2章 実験材料

1. 培地

本実験に於て使用した10%牛血清加キルヒナー液体培地、Tween-albumin 培地、10%牛血清加キルヒナー寒天培地、及び1%小川培地は、いずれも成書の記載の方法に従って作成した。

2. 菌株並びに菌液

本研究室保存の H37Rv 感受性株、本株より試験管内で作成した SM, PAS, INH, KM, CS, TH, viomycin (VM), 及び EB 各耐性株、人型結核菌黒野株、並びに京都大学結核研究所及び関係諸施設に入院中の肺結核患者喀痰中より分離された人型結核菌50株を用いた。

菌液は、次の方法で作成した。

(1) Tween-albumin 培養菌液：約2週間々隔で Tween-albumin 培地に継代培養し、菌液としては、10日前後の培養液を用い、同培地で10倍に希釈したものを 0.5mg/ml の菌液として使用した。

(2) ガラス玉磨砕菌液：10%牛血清加キルヒナー液体培地に約2週間表面培養して得られた菌膜をガラス玉入り肉厚コルベンに採って磨砕、Tween-albumin 培地で懸濁液を作成した。菌液濃度は比濁法によって判定した。

(3) 石油ベンジン菌液：1%小川培地で2～3週間培養、この斜面に約 5ml の石油ベンジンを注入、駒込ピペットで充分攪拌して斜面上の菌集落をベンジン中へ分散させ、大菌塊の落下をまってから、石油ベンジンで所要濃度迄希釈して用いた。菌液濃度の判定は

比濁法による。本菌液使用時には、生菌数の減少を避けるために、結核菌と石油ベンジンとの接触を30分以内にとどめるよう留意した。

(4) メノウ乳鉢磨砕菌液：グリセリンブイヨンに約3週間表面培養して得られた菌膜を滅菌濾紙上にとり、湿菌量を秤量、メノウ乳鉢にて生理的食塩水を懸濁媒として、所要濃度の菌液を作成した。

3. 使用薬剤

EB, SM, PAS, INH, KM, CS, TH, VM, tetracycline (TC), pyrazinamide (PZA), sulfisoxazole (SI), TBI, 及び SOM の13検体を実験に用いた。

この中で、EB, PAS, TC, PZA, SOM は粉末を秤量後、試験管内実験の際には、適当量の70%エチル・アルコールで溶解滅菌したものを、血清制菌力及び結核マウスの治療実験に於ては、滅菌蒸溜水で溶解して用いた。TH 及び TBI は秤量の上、試験管内実験の際には、propylene glycol に溶解し、100°C 30分間滅菌したものを、結核マウスの治療実験の際には、アラビヤゴム懸濁液を使用した。SM, KM, 及び VM は 1g 力価入り vial を、CS は実験用アンプル入り粉末を滅菌蒸溜水で溶解して用いた。INH, SI は注射用アンプル入りのものを使用した。

4. 被検体

健常成人、体重 3kg 前後の健常家兎、及び体重 20g 前後の均一系 dd 雌性マウスを実験に供した。

5. シリコン被覆スライド

東の方法¹⁵⁾により作成した。

第3章 実験方法並びに実験成績

実験1 各種培地における D-EB の制菌最低濃度 (MIC) の検討

1. 実験方法

10%牛血清加キルヒナー液体培地、シリコン被覆スライド培養法 (SSC)¹⁵⁾¹⁶⁾、Tween-albumin 培地、10%牛血清加キルヒナー寒天培地、及び1%小川培地の5種類の培地を用いて、D-EB の MIC を検討した。常法の通滅倍数希釈法によって D-EB 希釈列を作り、H37Rv 感受性株 Tween-albumin 培養菌液 (0.5mg/ml) を駒込ピペットで1滴ずつ接種、37°C 4週間培養後判定した。培地量は、液体培地は 2ml、固形培地は 5ml で、薬剤の添加希釈は、寒天培地では冷却凝固前、小川培地では加熱凝固前に行なった。従って、接種菌量は1培地当たり約 0.02mg で、液体培地では培地 1ml 当たり約 0.01mg となる。なお、SSC ではH37-

Rv 株石油ベンジン菌液 (1mg/ml) に瞬時浸漬し結核菌を附着させたシリコン被覆スライドを倍数希釈列に1枚ずつ投入培養した。1スライド当りの附着生菌単位数は、およそ 10^6 である。

表1 各種培地における D-EB の制菌最低濃度

培地	第1回実験	第2回実験 (γ /ml)
10%牛血清加 キルヒナー液体培地	3.13	6.25
シリコン被覆 スライド培養法	3.13	3.13
Tween-albumin 培地	1.56	0.78
10%牛血清加 キルヒナー寒天培地	3.13	3.13
1%小川培地	3.13	3.13

4週判定

表2 EB の制菌最低濃度に及ぼす培地 pH 及び接種菌量の影響

菌量 (mg/ml)	D-EB			DL-EB		
	0.1	0.01	0.001	0.1	0.01	0.001
pH						
5.5	12.5	6.25	6.25	25	25	12.5
6.5	6.25	3.13	1.56	12.5	6.25	6.25
7.5	3.13	1.56	0.78	6.25	3.13	1.56

使用培地：10%牛血清加キルヒナー液体培地

2. 実験成績

表2に示した。まず培地 pH についてみると、D-EB 及び DL-EB 両者共、pH が5.5から7.5へと酸性からアルカリ性になるに従って MIC が低下し、pH 5.5 と7.5の比較では、後者は前者の1/4～1/8の値を示した。

次に D-EB, 及び DL-EB の接種菌量と MIC の関係についてみると、菌量 0.001mg/ml と 0.1 mg/ml との比較では、後方で2～4倍の MIC の上昇が認められた。なお、DL-EB は D-EB の2倍の MIC を示す傾向が窺れた。

実験3 EBの制菌最低濃度 (MIC) に及ぼす牛血清加キルヒナー培地中の血清濃度の影響について

1. 実験方法

恒村の方法¹⁸⁾に準じて行なった。即ち、キルヒナー原液組成中、水分量を1/10とした10倍濃厚キルヒナー

2. 実験成績

表1に示す如く、D-EB の MIC は、Tween-albumin 培地で 0.78～1.56 γ /ml とやや低く出たほか、各培地で 3.13 γ /ml 程度の値を示した。

実験2 EB の制菌最低濃度 (MIC) に及ぼす培地 pH 及び接種菌量の影響について

1. 実験方法

伊藤の方法¹⁷⁾により、1 N-HCl 又は 1 N-NaOH を用いて培地 pH を5.5, 6.5, 及び7.5に修正した10%牛血清加キルヒナー液体培地を用いて、D-EB, 及び DL-EB の倍数希釈列を作成し、H37Rv 感性株 Tween-albumin 培養菌液 (5mg/ml, 0.5mg/ml, 及び 0.05mg/ml) を接種、37°C 4週間培養後、MIC を判定した。接種菌量は培地 1ml 当り約 0.1, 0.01, 及び 0.001mg の3種である。

原液、及び牛血清を用いて、10, 30, 50, 70, 及び90%牛血清加キルヒナー液体培地を作成した。次に各培地を用いて D-EB, 及び DL-EB の倍数希釈列を作り、H37Rv 感性株 Tween-albumin 培養菌液 (0.5mg/ml) を培地 1ml 当り約 0.01mg 接種し、37°C 4週間培養後に判定した。

2. 実験成績

表3 EB の制菌最低濃度に及ぼす牛血清加キルヒナー培地中の血清濃度の影響

血清濃度	D-EB	DL-EB (γ /ml)
10%	3.13	6.25
30%	3.13	6.25
50%	3.13	6.25
70%	3.13	6.25
90%	3.13	6.25

接種菌量：0.01mg/ml

表3に示す如く、D-EB、及びDL-EBのMICは血清濃度の影響を受けず、各濃度共、それぞれ3.13 γ /ml、及び6.25 γ /mlであった。また、DL-EBはD-EBの2倍のMICを示した。

実験4 培地置換培養法によるEBの制菌最低濃度(MIC)の検討

1. 実験方法

神田の方法¹⁹⁾に準じて行なった。即ち、10%牛血清加キルヒナー液体培地を用いて、D-EB、及びDL-EBの倍数希釈列のおおの2系列を作り、これらに約1mg/mlの石油ベンジン菌液に瞬時浸漬して結核菌を吸着させたシリコン被覆スライドを1枚宛投入し、37°Cの孵卵器で培養し、各薬剤の1系列は、週2回、新たに作成した同様の倍数希釈列へスライドを置換培養し、他の1系列は、対照として、そのまま培養を続け、4週目にMICを判定した。

2. 実験成績

表4 培地置換培養法によるEBの制菌最低濃度

	培養法	D-EB	DL-EB (γ /ml)
第1回	培地置換法	6.25	12.5
	非置換法	6.25	12.5
第2回	培地置換法	3.13	6.25
	非置換法	3.13	6.25

培養法：シリコン被覆スライド培養法

表4に示した。D-EB、及びDL-EBの培地置換培養法と非置換法のMICは同値で、EBはin vitroで比較的安定した薬剤効果を示す事を認めた。なお、本実験に於ても、DL-EBはD-EBの2倍のMICを示した。

実験5 各種抗結核薬耐性菌に対するEBの制菌最低濃度(MIC)の検討

1. 実験方法

H37Rv感受性株及び本株のSM, PAS, INH, KM, VM, TH、及びCS各耐性株のガラス玉磨砕菌液(0.5mg/ml)を用いて、D-EB、及びDL-EBの10%牛血清加キルヒナー液体培地に於けるMICを試験管倍数希釈法により検討した。接種菌量は、培地1ml当り約0.01mgで、37°C 4週間培養後判定した。

2. 実験成績

表5 各種抗結核薬耐性菌に対するEBの制菌最低濃度

菌株	耐性度	D-EB	DL-EB (γ /ml)
H37RvS		3.13	6.25
H37RvR-SM	10 ⁴ <	3.13	6.25
H37RvR-PAS	15.6	3.13	6.25
H37RvR-INH	25	3.13	6.25
H37RvR-KM	10 ⁴ <	3.13	6.25
H37RvR-VM	50	3.13	6.25
H37RvR-TH	25	3.13	6.25
H37RvR-CS	25	3.13	6.25

接種菌量：0.01mg/ml

使用培地：10%牛血清加キルヒナー液体培地

表5の如き成績を得た。D-EB、及びDL-EBのMICはいずれの菌株に対しても、3.13 γ /ml、及び6.25 γ /mlで、EBはSM, PAS, INH, KM, VM, TH及びCS各耐性株に対しても感受性株と同様の制菌作用を示した。

実験6 D-EB耐性菌に対する各種抗結核薬の制菌最低濃度(MIC)の検討

1. 実験方法

前項と同様な方法でD-EB耐性株に対するSM, PAS, INH, KM, VM, PZA, SI, TC, TH, CS, TBI, SOM、及びD-EBのMICを検討した。接種菌量は培地1ml当り約0.01mgで、37°C 4週間培養後に判定した。

2. 実験成績

表6より明らかな如く、D-EB耐性株は、SMを除き、各薬剤に対して感受性株と同程度の感受性を示した。なお、SMがD-EB耐性株に対して、2回中2回共、感受性株の2倍の制菌力を示したが、試験管1本程度の差で誤差範囲かとも思われる。

実験7 患者分離株に対するD-EBの制菌最低濃度(MIC)の検討

1. 実験方法

EB未使用患者分離株50株を1%小川培地で約3週間増菌後、その集落からガラス玉磨砕菌液(0.5mg/ml)を作成した。これらの菌液を用いて10%牛血清加キルヒナー液体培地に於けるD-EBのMICを検討した。接種菌量は培地1ml当り約0.01mg、判定は培養開始後4週である。

2. 実験成績

表6 D-EB 耐性菌に対する各種抗結核薬の制菌最低濃度

薬 剤	第 1 回		第 2 回	
	H37RvS	H37RvR-EB	H37RvS	H37RvR-EB
D-EB	3.13	25	3.13	25 (γ/ml)
SM	2.5	1.25	2.5	1.25
PAS	0.156	0.156	0.156	0.156
INH	0.125	0.0625	0.125	0.125
KM	1.25	0.625	1.25	1.25
VM	6.25	6.25	12.5	12.5
PZA	250	250	125	125
SI	31.3	31.3	62.5	62.5
TC	6.25	3.13	6.25	6.25
TH	1.25	1.25	0.625	0.625
CS	6.25	6.25	6.25	6.25
TBI	25	25	12.5	12.5
SOM	3.13	3.13	1.56	1.56

接種菌量：0.01mg/ml

使用培地：10%牛血清加キルヒナー液体培地

表7 患者分離株に対する D-EB の制菌最低濃度

制 菌 最 低 濃 度	患 者 分 離 株 数
1.56 (γ/ml)	30
3.13	19
6.25	1

合計 50

接種菌量：0.01mg/ml

使用培地：10%牛血清加キルヒナー液体培地

表7に示す如く、検査した50株のうち、D-EB 1.56γ/ml で30株、3.13γ/ml で19株、6.25γ/ml で阻止せられたもの1株で、H37Rv保存株と同程度のMICを示した。

実験8 D-EBの単独殺菌最低濃度(MSC)の検討

1. 実験方法

シリコン被覆スライド培養法(SSC)¹⁵⁾¹⁶⁾によった。即ち、10%牛血清加キルヒナー液体培地を用い、D-EB、及び対照薬剤としてのINHの倍数希釈列を4系列宛作成し、これにH37Rv株の約1mg/ml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を投入し、37°Cの孵卵器で培養した。培養後1週、2週、3週、及び4週毎に各1系列をとり出し、各スライドを生理的食塩水で2回洗滌し、薬液を含め10%牛血清加キルヒナー液体培地に移しかえ、更に37°C 4週間培養後肉眼的に判定した。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(+)、1/3以下の時(+)とした。尚、集落数が100以下の場合(+)とせずその数を記録した。

2. 実験成績

表8 D-EBの単独殺菌最低濃度

作 用 時 間			D-EB	INH
1	週	間	500<	1000 (γ/ml)
2	週	間	500	0.125
3	週	間	7.8	0.0625
4	週	間	3.9	0.0313

培養法：シリコン被覆スライド培養法

表8は菌集落数100以下及び(+)は殺菌効果あり、(++)、(卅)は殺菌効果なしとした場合のMSCである。なお、対照は凡て(卅)に発育した。

D-EBのMSCは、作用時間が1週間の場合、500γ/ml以上であるが、作用時間の延長と共に殺菌効果は著明に増加し、4週間の場合には、3.9γ/mlとMICと同程度の濃度で殺菌効果を認めた。これは、対照薬剤のINHの約100倍の濃度で、D-EBはINHの1/100程度の殺菌効果を示したのである。

実験9 D-EB投与後の家兎血清制菌力持続時間の検討

1. 実験方法

恒村の方法¹⁸⁾に準じて行なった。一群5匹の家兎を対象として、実験量の D-EB を全量、早朝空腹時に1回に投与し、投与前及び投与1, 3, 及び5時間後に耳静脈より約5ml採血し、24時間静置後遠沈、血清を分離し、この血清を用いて、90, 50, 及び10%血清加キルヒナー液体培地を各1ml作成した。ついで、これらの培地に H37Rv 株 Tween-albumin 培養菌液 (0.5mg/ml) を用いて約0.02mg宛接種、37°C 4週間培養後判定した。判定基準は菌発育を全く認めないものを「完全発育阻止」とし、僅かに発育を認めたものを「不完全発育阻止」とした。EB は水溶液として、経口 (4~5号ネラトンカテーテルにより胃内注入)、

皮下注射(大腿皮下)及び耳静脈注射により投与した。

2. 実験成績

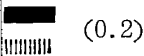
個々の家兎の成績は表9に、各血清濃度の平均血清制菌力持続時間は図1に示した。表9に示す如く、D-EB の経口投与では、50mg/kg でも血清制菌力はまったく認められなかった。皮下注並びに静注時に於ける平均血清制菌力持続時間は皮下注も静注も同じ値を示し、25mg/kg では、90%血清加培地で0.8時間、50%血清加培地で0.2時間を示し、50mg/kg 投与時は、90%血清加培地で1.4時間、50%血清加培地で0.4時間となり、10%血清加培地では50mg/kg 投

表9 D-EB 投与後の家兎血清制菌力持続時間

家兎 番号	血清濃度 投与量	経 口			皮 下 注			静 注		
		90%	50%	10%	90%	50%	10%	90%	50%	10%
1	25mg/kg	0	0	0	1	0(1)	0	0(1)	0	0
2		0	0	0	0(1)	0	0	1	1	0
3		0	0	0	1	0(1)	0	1	0	0
4		0	0	0	1	1	0	1	0(1)	0
5		0	0	0	1	0(1)	0	1	0	0
1	50mg/kg	0	0	0	1	0(1)	0	1	0(1)	0
2		0	0	0	1(3)	1	0	1(3)	1	0
3		0	0	0	1	0(1)	0	1	0(1)	0
4		0	0	0	1	0(1)	0	3	1	0
5		0	0	0	3	1	0	1	0(1)	0

注：表中の数字は完全発育阻止時間を、()内の数字は不完全発育阻止時間を表わす

図1 平均血清制菌力持続時間

投 与 量	血清濃度	持続時間		
		1	2	3
D-EB 25mg/kg	90%	 (0.8)		
	50%	 (0.2)		
	10%	(0)		
D-EB 50mg/kg	90%	 (1.4)		
	50%	 (0.4)		
	10%	(0)		

 : 皮下注
 : 静 注

() 内は平均血清制菌力持続時間

与時でも制菌力を認めなかった。

実験10 人体に対する D-EB 単独経口投与時の血清制菌力持続時間の検討

1. 実験方法

体重 45~60kg の健康成人を対象として、早朝空腹時に体重に関係なく D-EB 1000mg を経口投与し、投与前、投与1.5、及び3時間後に肘静脈より採血、前項と同様な方法で血清制菌力の持続時間を検討した。

2. 実験成績

図2に示す如く、完全発育阻止は投与1.5時間後に90%血清加キルヒナー液体培地で4例中僅か1症例に認められたのみであった。

図2 D-EB 単独 1000mg 経口投与時の人血清制菌力持続時間

薬剤投与後の時間	培地中の血清濃度	検査症例			
		管 ○	東 ○	岩 ○	木 ○
1.5	90%			■	
	50%				
	10%				
3	90%				
	50%				
	10%				

■ : 完全発育阻止
 ||||| : 不完全発育阻止
 : 発育阻止を認めない

実験11 結核マウスの生存日数を指標とした D-EB の治療効果の検討

1. 実験方法

体重 18~20g の dd 系マウス10匹を1群とし、4群に人型結核菌黒野株 メノウ 乳鉢磨砕菌液 (5mg/ml) 0.1ml を尾静脈より静注、感染翌日より各群に INH 1γ/g, D-EB 100γ/g, 及び 10γ/g の割合に、水溶液として1日1回経口投与した。第4群には生理的食塩水を与えた。薬剤投与量は 0.2~0.4ml, 投与期間は17日間とした。

2. 実験成績

表10 D-EB 単独投与による結核マウスの平均生存日数

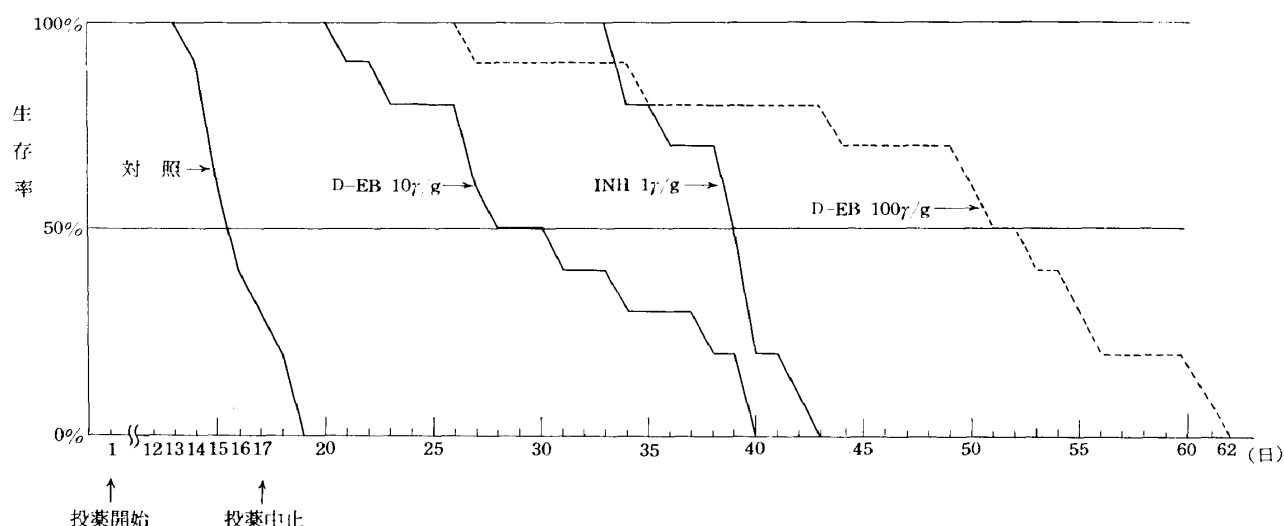
実験群	薬剤投与量	平均生存日数
1	D-EB 10γ/g	30.4
2	D-EB 100γ/g	48.9
3	INH 1γ/g	38.2
4	対 照	15.9

薬剤投与方法：経口投与

平均生存日数は表10に、生存率曲線は図3に示したが、D-EB 10γ/g 投与は INH 1γ/g に明らかに劣るが、100γ/g 投与では INH 1γ/g よりも優れた成績を得た。即ち、D-EB の効果は INH の1/10~1/100の間にある事が示された。

D-EB 10γ/g 投与の平均生存日数は対照と比べて14.5日の差があり、かなりの治療効果を認めた。

図3 結核マウスの生存日数による D-EB の治療効果



実験12 結核マウスの生存日数を指標とした各種抗結核薬同一量投与時の治療効果の比較検討

1. 実験方法

前項と同様にして、各群の結核菌感染マウスに各種抗結核薬を凡て 10 γ /g の割合に14日間投与し治療効果を比較した。

投与法は、SM, KM, 及び VM は背部に皮下注射し、その他の薬剤は水溶液又はアラビヤゴム懸濁液としてマウス用ゾンデで経口投与した。なお、1匹当りの投与薬液量は 0.2~0.4ml とした。

2. 実験成績

表11 各種抗結核薬 10 γ /g 投与時の結核マウスの平均生存日数

薬 剤	投 与 法	平均生存日数
一次薬	INH 経 口	>26.0
	SM 皮 下 注	19.0
	PAS 経 口	13.8
二次薬	KM 皮 下 注	18.9
	VM 〃	17.9
	D-EB 経 口	16.8
	TH 〃	15.4
	SOM 〃	15.1
	TBI 〃	14.9
	CS 〃	14.5
	PZA 〃	14.3
	対 照	12.9

平均生存日数を表11に、生存率曲線を図4に示した。

それによると、INH が格段の差で効果を発揮し、その平均生存日数は26日以上で、これに続く SM, KM, 及び VM の平均生存日数はおおよそ 18~19日程度で、D-EB は16.8日とやや治療効果がおちた。然しながら、D-EB は TH, SOM, TBI, CS, PZA, 及び PAS よりは優れた成績を示した。

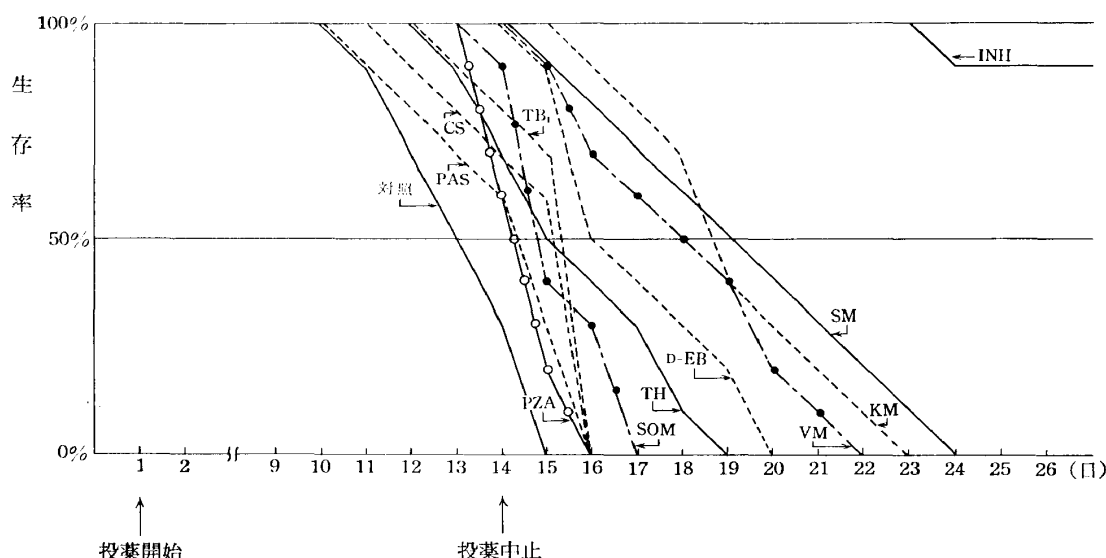
第4章 総括並びに考按

抗結核薬の制菌作用が培地の種類^{20) 30) 43)}や接種菌量²¹⁾、培地の pH²¹⁾、キルヒナー培地の血清濃度の変化等^{22~25)}により、かなりの変動を示し、殺菌作用もキルヒナー培地の pH や血清濃度により相当の影響をうけるもののある²⁵⁾事は、つとに著者の研究室、その他多くの研究者により注目されている所である。

一方、結核病巣、即ち生体内で結核菌が抗結核薬の作用を受ける環境は物理化学的性状等の諸因子によって複雑に修飾されているであろう。従って、新しい抗結核薬の性能を検討するにあたって、様々の条件の下に於て、その性能がいかに表現せられるかは当然検索する必要がある。

まづ、EB の MIC と使用培地との関係についてみると、Thomas⁸⁾ らは Sauton 培地で、1~4 γ /ml、森山²⁶⁾は 1%小川培地、Dubos 液体培地、及び Kirchner 半流動寒天培地で 2.5~10 γ /ml とし、山本²⁷⁾らは 1%小川培地で 2.5 γ /ml

図4 結核マウスの生存日数による各種抗結核薬の同一量(10 γ /g)投与時の治療効果の比較



であったという。DL-EB については、伊藤²⁸⁾らは、1%小川培地、Kirchner 及び Dubos 半流動寒天培地並びに液体培地に於ては、2.5~5 γ /ml とし、岡²⁹⁾らは、Dubos 液体培地で3~5 γ /ml であるとしている。著者の成績でも、D-EB は Tween-albumin 培地で MIC がやや低く出たのを除き、各培地で 3.13 γ /ml 程度を示し、諸家と同様の成績を得た。いずれにしろ、EB の培地による MIC の差は KM, TH 等の主要二次抗結核薬に比して極めて小さい²⁰⁾³⁰⁾⁴³⁾。更に、EB は培地内で安定した力価を保つ事が培地置換培養法による検討で明らかになった。これらの事は EB に対する耐性検査を使用培地成分及び耐性培地保存による力価低下を顧慮せずに行ないうる事を示唆している。

一方、EB の制菌作用は DHSM, TBI, VM, 及び KM と同様にアルカリ性で増強され、PZA, PAS, 及び SI が酸性で増強されるのと反対の傾向を示した²¹⁾。又、EB の MIC は接種菌量を 0.001mg/ml から 0.1mg/ml へ増加させると 2~4 倍増加したが、研究室河田の報告²¹⁾の如く、接種菌量の増加による制菌力の低下は殆んど、どの抗結核薬にもみられる性質であって、EB はむしろ比較的影響の少ないものに属している。

更に注目すべき事は、研究室山下²³⁾、井本²⁴⁾、田中²⁵⁾の成績の示す如く、各種抗結核薬の制菌作用や殺菌作用は培地内の血清濃度の増加と共に多少共減弱するのに反して、EB の制菌力は培地中の血清濃度を10%から90%にあけても全く影響を受けなかった事である。この事は、EB が生体内に於ても試験管内と変らぬ制菌力を発揮出来る可能性を示すものであろう。

新しい抗結核薬が具備すべき重要な条件の1つに既存の薬剤と交叉耐性を持たないという事がある。

この点に関して、Thomas⁸⁾らは INH 及び SM 耐性菌、Lutz¹¹⁾らの SM, PAS, 及び INH 耐性菌、伊藤²⁸⁾らの SM, KM, INH, TH 及び TBI 耐性菌を対象に検討し、著者も亦、SM, PAS, INH, KM, VM, TH, 及び CS 各耐性菌に対して検討し、EB がこれらの耐性菌に対して

感受性菌に対すると同様の制菌作用を示す事を認めた。逆に、EB 耐性菌に対する他の抗結核薬の制菌力については、山本²⁷⁾らの SM, PAS, INH, KM, CS, TH 等に感受性との報告がある。著者も既知抗結核薬12種の検討で、山本²⁷⁾らと概ね同様の成績を得た。いずれにしろ、EB が既知主要抗結核薬と交叉耐性のないことは異論のないところではあるが、著者^{30~32)}らがかかる実験をかなり詳細に行なう今一つの理由がある。それは、耐性菌がある薬剤に対して感受性が低下する(交叉耐性)場合の他に、かえって増強する場合がありますはしないかを検討することである。著者の実験では、SMの制菌作用は、D-EB 耐性菌に対して増強される如き成績を得た。然し、2回の実験とも同じ成績を示したとはいえず、試験管1本の差であり、実験誤差かも知れないが、もし差のある事が真実とすれば、臨床上、EB と SM の併用は有意義ではあるまいかと思われる。

次に、患者分離株に対する EB の MIC の検討は、Karlson¹⁰⁾を始めとして、Lutz¹¹⁾ら、山本²⁷⁾ら、小川³³⁾らによる報告があるが、いずれも、H37Rv 株とほぼ同様の感受性を認めている。著者の50株についての検討でも耐性株を認めなかった。これらの事から、EB に対する自然耐性菌は、もし存在するとしても、極めて稀ではないかと考えられ、TH 自然耐性菌が少なからずある³⁰⁾³⁴⁾³⁵⁾ことを考えると興味深いものがある。

又、D-EB は結核菌との接触期間の延長と共に殺菌効果を著明に増加し、4週間の場合には、MIC とほぼ同濃度で殺菌効果を認め、INH の 1/100程度の殺菌力を示した。このようにEBのMSCがMICに近いということは、かかる性質の薬剤の併用によって化学療法の理想である生体内殺菌の実現に希望を与えるものであろう。

以上、EB は in vitro では 1~5 γ /ml の MIC を示し、然も、その制菌力は血清の影響を受けない等、多くの優れた抗菌作用を持つことが分かった。然るに、EB を投与した生体の血清中結核菌制菌作用が意外に弱いことは注目に値する。即ち、著者の実験によると、家兎に50mg/

kg, 人体に約 20mg/kg を経口投与しても血清の制菌作用は殆んど認められず, 家兎に 50mg/kg の皮下注及び静注時に, 平均 1 時間程度の血清制菌力持続を認めたに過ぎなかった。この点に関して, Place³⁶⁾らは, 人体に D-EB を経口投与し, 2 時間後に最高濃度に達することを記載し, Thomas⁸⁾らは, マウス血清中濃度の検討で, 45mg/kg を投与した場合でさえ, 最高濃度は, 経口で 3 γ /ml, 皮下注射で 7 γ /ml であったと報告している。我国では, 伊藤²⁸⁾らは, DL-EB 40mg/kg 家兎筋注時, 30分～2 時間後に 5 γ /ml, 40mg/kg 経口投与時, 1 時間後に於てのみ 4 γ /ml を証明し, 小川³³⁾らは, D-EB 1g を人体経口投与時, 投与 2 時間後で平均 6 γ , 4 時間で 3～4 γ , 6 時間後には 2 γ 以下であったと報告し, 山本³⁷⁾らは, D-EB 25mg/kg 人体投与 2 時間後に 4～8 γ /ml を証明し, 岡²⁹⁾らは, 家兎に D-EB 40mg/kg を皮下注射し, SSAAT³⁸⁾の値は, SM, KM, 及び INH に比べて低かったが, TH, Disoxyl に比較し高かったと報告し, 下村³⁹⁾も同様の成績を述べており, 概ね著者の成績と同様に弱い血清制菌力が示されている。

所で, Thomas⁸⁾らがマウスの実験的結核症について efficacy index を比較し, D-EB が, 経口投与では, INH に匹敵し, 非経口的には, SM より優れていると報告して以来, 実験結核症に対して諸家の成績がみられる。即ち, Lal¹²⁾らは, マウス角膜結核症を指標として, EB は, 経口投与よりも皮下注射が優れ, D-EB 500mg/kg の経口投与は INH 15mg/kg 経口投与と同様の効果を示したという。又, 結核マウスの延命効果の検討で, 伊藤²⁸⁾らは, D-EB 50 γ /g の皮下注射がほぼ INH 1 γ /g の皮下注射の効果に匹敵し, 山本²⁷⁾らは, 経口投与で, D-EB 20 γ /g がほぼ INH 1 γ /g に相当するとしている。森山²⁶⁾は, 結核マウスの臓器内生菌数より治療効果を比較し, D-EB 1mg/mouse/day が INH 0.02mg/mouse/day に匹敵したと報告し, 金井⁴⁰⁾らは, D-EB はかなり優れているが, SM より劣るとしている。著者のマウス延命効果の実験では, 10～100倍量の D-EB が INH の治療効果に匹敵するという成績を示した。即ち, D-

EB の効果は INH に比ぶべくもないが, 結核マウスに各種抗結核薬を同一量投与し, その生存日数を指標として, 各薬剤の効果を比較検討した実験では, SM, KM, 及び VM には僅かに劣るが, TH, SOM, TBI, CS, PZA, 及び PAS より優れた治療効果を示し, これは, EB が KM, TH 等と共に, 結核再化学療法剤として, かなり期待の持てる薬剤である事を示唆するものであろう。

以上の如く, EB は試験管内に於ける制菌力並びに殺菌力, 実験的マウス結核症に対する治療効果から, 一次薬の INH に比肩すべくもないが, 比較的優秀な薬剤で, 他剤との併用により, かなりの治療効果が期待出来, KM, TH, VM 等と共に二次抗結核薬の中では, 主剤となりうる優れた薬剤である事が示されたのである。然るに, 血清制菌力のみが, 意外に弱いのはどのような機序によるものであろうか。この問題に関連して, Kuck⁴¹⁾らの, 菌の EB 摂取はその濃度に関係するが, 制菌作用の発現は, 必ずしも MIC 以上の高濃度が存在しても早期に観察される事はないという報告や, Peets⁴²⁾らの, EB が赤血球中に速やかに入り, 血漿中濃度より高くなるという報告などが興味を持たれるが, 治療効果と血清濃度との食違いは今後の検討に俟たねばならない。

第5章 結 論

新しい抗結核薬 2,2'-(Ethylenediimino)-di-1-butanol (EB) 単独の抗結核作用を検討し, 次の如き結論を得た。

1. D-EB の制菌最低濃度は Tween-albumin 培地でやや低く出るが, その他の培地では 3.13 γ /ml 程度で, DL-EB の 1/2 を示す。
2. EB の制菌力は培地の pH がアルカリ性で増強し, 接種菌量が大なる程低下する。
3. EB の制菌力は培地中の血清濃度の影響を受けない。
4. EB の制菌力は培地内で安定である。
5. EB は他の抗結核薬と交叉耐性をもたない。
6. 患者分離株に対する EB の制菌力は H37

Rv 株に対するとほぼ同程度である。

7. EB の殺菌最低濃度は、薬剤作用期間が4週間の場合には、制菌最低濃度と略等しく、INH の約100倍程度である。

8. D-EB 投与後の家兎血清制菌力は、経口投与では、50mg/kg でも認められないが、皮下注射及び静脈注射による投与では、25mg/kg で1時間弱、50mg/kg で1時間強の血清制菌力持続を認める。

9. 人体に D-EB 単独 1000mg を経口投与しても、ごく弱い血清制菌力を示すにとどまる。

10. 結核マウス 延命効果は、10～100 倍量の D-EB と INH とが匹敵し、INH には及ぶべくもないが、同一投与量では SM, KM, 及び VM に僅かに劣るのみで、TH, SOM, TBI, CS, PZA, 及び PAS よりは優れた治療効果を示す。

(攔筆に際し、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) 療研：日本医事新報, No. 2064 : 9 1963
- 2) 内藤益一他：京結紀要, 9 : 129, 1961
- 3) 内藤益一他：京結紀要, 11 : 38, 1962
- 4) 内藤益一：日本胸部臨床, 21 : 332, 1962
- 5) 内藤益一：臨床と研究, 40 : 1913, 1963
- 6) 内藤益一他：日本胸部臨床, 23 : 752, 1964
- 7) Wilkinson, R.G., et al : J.A.C.S., 83 : 2212, 1961
- 8) Thomas, J.P., Baughn, C.O., et al : Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 891, 1961
- 9) Karlson, A.G. : Am. Rev. Resp. Dis., 84 : 902, 1961
- 10) Karlson, A.G. : Am. Rev. Resp. Dis., 84 : 905, 1961
- 11) Lutz, A., and Berger, M.A. : Ann. Inst. Pasteur, 103 : 216, 1962
- 12) Lal, H.M., and Robson, J.M. : Am. Rev. Resp. Dis., 87 : 870, 1963
- 13) 田中健一：京結紀要, 13 : 13, 1964
- 14) 久世文幸：京結紀要, 13 : 60, 1964
- 15) 東向一郎：京結紀要, 7 (3) 増刊 1 号 : 461, 1959
- 16) 東向一郎：京結紀要, 7 (3) 増刊 2 号 : 22, 1959
- 17) 伊藤篤：京結紀要, 7 : 143, 1958
- 18) 恒村俊郎：京結紀要, 7 (3) 増刊 3 号 : 338, 1959
- 19) 神田瑞雄：京結紀要, 7 (3) 増刊 1 号 : 328, 1959
- 20) 津久間俊次他：胸部疾患, 2 : 522, 1958
- 21) 河田利延：京結紀要, 7 (3) 増刊 3 号 : 13, 1959
- 22) 志保田明：京結紀要, 1 : 135, 1953
- 23) 山下直二郎：京結紀要, 8 : 5, 1959
- 24) 井本伍平：京結紀要, 7 (3) 増刊 3 号 : 306, 1959
- 25) 田中健一：京結紀要, 13 : 45, 1964
- 26) 森山英五郎：結核, 39 : 155, 1964
- 27) 山本和男他：日本胸部臨床, 22 : 797, 1963
- 28) 伊藤文雄他：日本胸部臨床, 22 : 36, 1963
- 29) 岡捨己他：日本胸部臨床, 23 : 30, 1964
- 30) 川合満：京結紀要, 13 : 184, 1965
- 31) 津久間俊次他：京結紀要, 14 : 23, 1965
- 32) 神尾彰：京結紀要, 7 (2) 増刊号 : 274, 1959
- 33) 小川政敏他：日本胸部疾患学会雑誌, 2 : 18, 1964
- 34) Rist, N., et al : Am. Rev. Tuberc., 79 : 1, 1959
- 35) Brouet, G. : Bull. Internat. Union Tuberc., 28 : 216, 1958
- 36) Place, V.A., and Thomas, J.P. : Am. Rev. Resp. Dis., 87 : 901, 1963
- 37) 山本和男：胸部疾患, 8 : 1070, 1964
- 38) Dye, W.E., Kass, I., et al : Laboratory evaluation of the specific serum antimycobacterial activity test, Personal communication
- 39) 下村康夫：胸部疾患, 8 : 250, 1964
- 40) 金井興美他：結核, 36 : 69, 1964
- 41) Kuck, N.A., et al : Am. Rev. Resp. Dis., 87 : 905, 1963
- 42) Peets, E.A., et al : Am. Rev. Resp. Dis., 91 : 51, 1965
- 43) 内藤益一：学研報告, 1958