

実験的結核におけるストレプトマイシンと

クロロマイセチン併用に関する研究

東京大学伝染病研究所臨床研究部 (部長 東大教授 北本 治)

高尾 泰・北本 治

(受付 昭和30年2月14日)

緒 言

Streptomycin (SM) 耐性菌に対しても効力を有する抗生物質として Neomycin (NM), Viomycin (VM), Terramycin (TM) 等が検討され、すでにところにより臨床的に実際に使用され、ある程度の効果も認められているが Chloromycetin (CN) で抗結核作用に関しては僅かに Youmans 等の報告を見るのみでその SM との併用効果に関しては未だ詳細が明らかにされていない。

Streptomyces venezuelae から取出された CM が多種のグラム陽性ならびに陰性菌、リケッチア、一部のウィールス等に対し広い抗菌スペクトルを持つていることは衆知のことであるが、カビ類、原虫類には無効、結核菌に対しては比較的弱い (only moderately bacteriostatic) と報告されている。

私どもは CM の抗結核作用を再検討し、さらに SM 等との併用効果の有無につき in vitro および in vivo の基礎的実験を施行し臨床的使用の可能性の有無を検討した。

実験方法ならびに実験成績

I CM 単独の結核菌阻止作用

結核菌標準株 H₃₇Rv, H₂, F, BCG および患者から分離した SM (小沢株), PAS (吉田株), INAH (内山株) 各耐性株につきその 0.01 mg を Youmans 培地 (馬血清加) に移植し、その増殖を阻止した CM の最低濃度を主動菌、中間菌、別動菌に分類して記載すると第1表の如くである。

すなわち、10.0 γ /cc の CM の濃度でほとんどの菌株がその発育を阻止されており、又、SM 耐性 (1×10^4 γ /cc 主動) 株についても主動菌が 5.0 γ /cc で阻止されており、2.5 γ /cc で増殖を示している。

II In vitro における SM および IHMS との併用実験

Youmans 培地内における終濃度が SM は 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 γ /cc, CM は 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 γ /cc の2系列をつくり、第2表の如く各濃度における併用の組合せをつくり、H₃₇Rv 0.01 mg

第1表 CM 単独の結核菌発育阻止作用 (M. I. C. γ /cc)

	主動菌	中間菌	別動菌
H ₃₇ Rv	10		20
BCG	5	10	
H ₂	10		
F	5		
SM-R (Ozawa)	5		10
PAS-R (Yosida)	10		20
INAH-R (Uchiyama)	10		

培地: Youmans 培地 接種菌量: 0.01 mg

を移植して観察した。

第2表の如く in vitro における SM と CM の併用効果は認められず、むしろ CM 1.0 ないし 5.0 γ /cc の濃度含有系列では CM を混入せざる系列すなわち SM 単独の系列よりも強い増殖を示しており、SM の結核菌増殖抑制作用が CM を 1.0 ないし 5.0 γ /cc 混入させることにより減弱する如き傾向が見られる。

第2表 in vitro における SM との併用

CM γ /cc	SM γ /cc						
	0	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0
0	8+	8+	8+	8+	7+	0	0
1	8+	8+	7+	7+	7+	2+	0
2.5	8+	8+	8+	7+	7+	7-	2+
5.0	8+	8+	8+	7+	8+	8+	6+
10.0	3+	3+	+	2+	2+	+	0
20.0	0	0	0	0	0	0	0

(+ を附記した数字は菌増殖度を示す)

この CM と SM のむしろ拮抗的作用は全血培養 (Slide cell culture) における併用実験でも認められた。

すなわち「ツ」陽性健康人の血液につき東大沖中内科本間の法にしたがいがい人型結核菌 Frankfurt 株を用いて施行した全血培養における併用の成績は第3表の如くで、F 株は SM 0.5 γ /cc 以上の濃度でその増殖は抑制されているがこの SM の系列に CM を 1.0 ないし 5.0 γ /cc の濃度に加えると SM の結核菌阻止力の減弱が見られ

る。なお、この全血培養における CM 単独の効果について見るとその 10.0 r/cc の濃度では菌の増殖力弱く、25.0 r/cc では全く増殖を認めない。

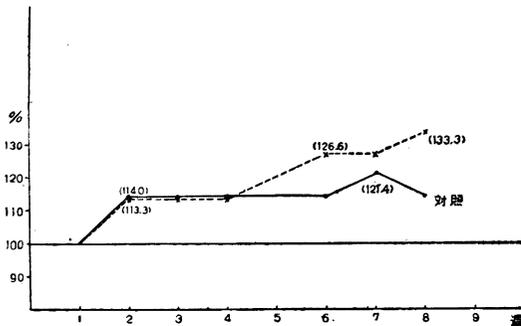
第 3 表 S.C.C.による SM との併用

SM r/cc \ CM r/cc	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1.5
0	+++	++	+++	±	-	-
1.0	++	++	+++	+++	+	±
2.5	+++	++	+++	+	+	-
5.0	+	+	++	+	±	±
10.0	±	-	-	-	±	-
25.0	-	-	-	-	-	-
50.0	-	-	-	-	-	-

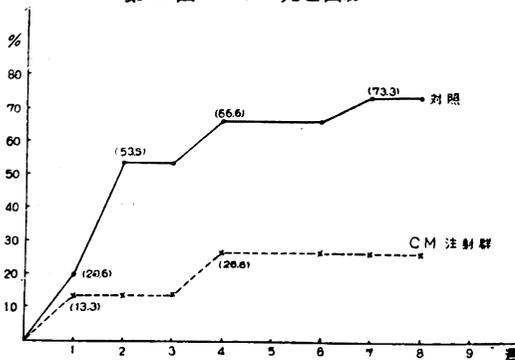
第 4 表 in vitro における INMS との併用

MS r/cc \ CM r/cc	0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5
0	9+	9+	9+	9+	9+	0
1	8+	8+	8+	8+	8+	0
2.5	8+	8+	8+	8+	8+	0
5	6+	7+	7+	6+	6+	0
10	0(2+)	+	+	2+	+	0
20	0	0	0	0	0	0

第 1 図 マウス体重曲線



第 2 図 マウス死亡曲線



なお、さきに私共が報告した INAH のメタンサルホン酸誘導体 Isonicotinyl hydrazide methansulfonate (IHMS) との in vitro の併用成績を第 4 表に示したが、CM と IHMS との間には協同効果も拮抗作用も認められない。

III マウス実験的結核における併用実験

体重 15g 前後のマウスを SM, IHMS, CM, SM+CM, IHMS+CM の各群 15 匹宛とし、Dubos 培地に 10 日間均等培養した H₃₇Rv 0.1 mg を尾静脈より接種し、感染 2 週後より SM, IHMS 各 100 mg/kg, CM 20 mg/kg を毎日皮下注射し 4 カ月間治療を継続、途中 3 週および 3 カ月目に一部を剖検に付した。

(a) CM の毒性: CM は予め 1 mg/cc の水溶液を作製しておきマウスの体重に応じその 0.2 cc ないし 0.3 cc (約 20 mg/kg) を大腿部皮下に注射したが、この投与量においては特に認むべき毒性なく第 1 図の体重曲線(治療前のマウスの平均体重を 100% とし治療各週における体重の変動を % であらわした)に見る如く対照に比し体重増加の傾向を示し、又、第 2 図の死亡曲線(各週における死亡マウス数の累計を % であらわした)から見ても対照に比し死亡マウス数著明にすくなく、この死亡曲線からみると CM のこの濃度の単独投与においてもある程度の治療効果が認められる。

なお、死亡曲線からは併用群と単独使用群の間には有意な差は認められなかつた。

(b) 臓器肉眼的病変: 治療 3 週, 3 カ月, 4 カ月で一部を剖検に付し各臓器の肉眼的所見を第 5 表に示した。各段中上段が腫脹その他の肉眼的病変、下段は結節の有無、数字は重量 (mg) であるが、対照につき CM 群が最も病変高度で SM, IHMS 単独群および CM 併用群の間には特に差を認めなかつた。

(c) 臓器乳剤蛍光顕微鏡所見: 各臓器の定量培養を施行する際その臓器乳剤の一部を載物硝子にとり型の如く処理して蛍光顕微鏡下にその菌数を計算した。

私どもは動物実験においてもことに長期治療を施行した場合、臓器定量培養成績と並行してその臓器乳剤中の結核菌を蛍光顕微鏡下に観察することは大いに参考になることを昭和 29 年 10 月、日本化学療法学会東日本支部会において発表した。この CM の実験においては第 6 表に示す如く、4 カ月治療群においても蛍光顕微鏡所見からは併用群と単独使用群の間に差を認めなかつた。

(d) 臓器定量培養成績: 各臓器を 1% NaOH にて処理し 3 週治療群は 1000 倍に、3 ないし 4 カ月治療群は 10 倍に稀釈したものを 0.1 cc 小川培地に移植して培養し、その発現集落数を第 7 表に示した。

すなわち治療群においては CM 単独群が最も菌数が多いが、SM, IHMS 単独群と CM 併用群の間には顕

第5表 動物実験：臓器肉眼的病変

薬 剤	K			MS.			SM			CM			MS+CM			SM+CM		
	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M
Lu	±	±		-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	250	250		200	200	200	200	200	250	200	580	250	200	150	200	200	180	200
	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+300			250	250	200	300	220	150	200	220	200	250	180	300	250	180	250
Le	+	±		-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1750	750		1300	1400	1200	700	1100	1850	1150	1250	1100	800	1350	1450	1150	1300	1000
	+			-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1300			1400	1250	1400	2050	1800	1550	1200	1550	950	900	1500	1900	1300	1700	1000
M	##	-		-	±	-	-	-	-	##	-	-	-	-	-	-	-	-
	+450	50		200	180	100	150	100	200	200	400	250	150	150	150	150	200	200
	##			-	-	-	##	+	-	+	-	-	-	-	-	-	±	-
	650			250	150	150	650	200	200	200	100	200	200	200	100	250	200	100
				+	-			-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
						150			150			150			100			150
												+		##				
									150			300			350			100
																		200

著な差は認められない。

(e) 上記臓器定量培養において3および4カ月治療群より得た菌につきそのSMに対する感受性をYoumans培地を用いて間接法により検査した。

各菌のSM感受性をSM単独群とCM併用群につき比較した成績を第8表に掲げたが、SM単独群、CM併用群共主動菌においては感受性の低下は認められないが、SM単独群には1ないし5r/ccの別動菌の出現を見るに反しCM併用群には見られない。すなわちCMの併用がSM耐性獲得を多少抑制する如き傾向が認められた。

総括ならびに考案

I CMのin vitroの抗結核菌作用はYoumans等により研究されその一部はEhrlich等¹⁾(1947)により報告されている。それによるとH₃₇Rv, H₃₇RvR(SM耐性)株に対しYoumans培地で血清添加の有無にかかわらずCMの最小阻止濃度は12.5r/ccである。

第6表 動物実験：臓器乳剤螢光顕微鏡所見

薬 剤	K			MS			SM			CM			MS+CM			SM+CM		
	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M
Lu	-	-		-	-	-	-	+	-	##	>##	-	-	+	-	-		-
	##			##	##	-	##	+	+	+	+	-	-	##	-	+		+
Le	##	-		##	##	+	##	+	-	##	##	##	##	+	+	##	+	-
	##			##	##	##	##	+	##	##	##	##	##	-	##	##	##	##
M	-	-		##	+	+	##	##	-	+	+	##	-	+	+	+	+	+
	-			##	+	+	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##

+.....全視野中菌数 10 以下

##.....每視野中菌数 1~10

##..... " 10~50

##..... " 11~50

##..... " 51以上

>##..... " 51以上

第7表 動物実験：臓器定量培養成績

薬剂 臓器	K			MS			SM			CM			MS+CM			SM+CM		
	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M	3 W	3 M	4 M
Lu	0 C	0		0 0	1	+?	0 1	0	0	5 42	∞	1(+)	0 0	1	0	0 0	2	C
	1 0			0 0	0	+?	0 0	0	0	0 0	5		0 0	0	C	0 2	0	C
Le	20 C	100		1 3	0	0	32 27	18	0	25 12	24	9	4 21	14	2	4 7	2	0
	29 8			24 29	1	0	2 26	1	2	3 7	30	0	4 4	13	0	16 15	1	2
M	4 6	C		0 0	4	0	2 5	3	0	2 6	15	0	1 1	1	0	0 2	1	0
	1 6			4 0	0	2	0 1	6	0	6 6	29	0	0 1	3	0	1 0	2	4

第8表 化学療法を施せる動物より分離せる菌のSM感受性

r/cc	SM 単独			CM 併用		
	主 動	中間	別動	主 動	中間	別動
0.1	○			○		
0.25	○○○○○			○○○○○	○	
0.5		○○○	○○		○	○
0.75					○	○○
1			○○			
2.5			○			
5			○			
10						

第9表

Bacteriostatic Action of CM in Combination with PAS and SM (Youmans et al)

	Conc. in $\mu\text{g. per cc}$ which completely inhibited growth
CM	12.5
PAS	0.78
SM	0.78
CM+PAS	1.56
CM+SM	1.56
CM+PAS+SM	1.56

すなわち SM の抗菌力と比較すると SM 感受性菌に対しては SM の約 1/10 の効力を有するという。

その後 Youmans 等²⁾(1948) は他の有毒人型結核菌 19 株 (そのうち 7 株は 1000 r/cc 以上の SM 耐性株) および牛型結核菌について CM の阻止力を見、大部分 (19 株中 12 株) が 6.25~12.5 r/cc で完全阻止され他の菌株も 25 r/cc で阻止されたことを報告している。

私どもの Youmans 培地における実験においても、検査された H₃₇Rv, H₂, F, BCG および SM, PAS, INAH 各耐性菌はほとんど全部 10.0 r/cc の CM 濃度で発育を阻止されており、別動菌から見ても 20.0 r/cc では完全に阻止されており Youmans 等の成

績と類似の結果を得た。すなわち CM の結核菌に対する最小阻止濃度は大体において 10.0 r/cc ということが出来る。

II In vitro における SM あるいは PAS との併用に関する Youmans 等²⁾(1948) の実験成績は第9表の如くで CM を併用しても SM あるいは PAS 単独の抗菌力は増強せず、むしろ CM を含有させることにより僅かながら SM あるいは PAS の抗菌力の減弱が見られるがこれは実験誤差内であるとしてこれに対する特別な意味付けには言及していない。

私どもの施行した Youmans 培地および全血培養における SM との併用実験においても併用効果は認められずむしろ CM を 1.0 ないし 5.0 r/cc の濃度に含有させることにより SM の抗菌力の減弱が認められた。

一抗生物質に対し他剤を併用する場合、ある場合にはその効果を増強する(協同作用)が逆に相互にその効果を減殺し合う場合(拮抗作用)あるいは低濃度では協力し、ある濃度以上では一方の効果は減弱し他方は増強する(平均効果)等の場合のあることは種々の細菌についてすでに衆知の事である。また、細菌の種類によりあるいは同種の細菌のうちでも株によつてその併用効果の型式が異なることも数多く実証されている事柄であるが、H₃₇Rv, F 株を使用した私共の in vitro の併用実験においては SM と CM の併用はむしろ拮抗的作用を示し、一般に抗生物質を I 群; P, SM, NM, BC, II 群; CM, TM, AM の 2 群にわかち両群から任意に 1 剤ずつを選んで併用すると両者は干渉し合うという Jawetz³⁾ の仮説が結核菌の場合にもある程度参考になるものと思われる。

Mackness および Smith⁴⁾等の Dubos 培地を用いた TM と INAH の併用実験によると 1.0 r/cc の濃度における INAH の抗菌作用はこれに 10.0 r/cc の TM を含有させることによりほとんど完全に抑制され対照と

同程度の結核菌 ($H_{37}Rv$) の増殖を見ているが、私どもの実験の CM と IHMS との間にはかかる作用を認めなかつた。

III Youmans 等²⁾のマウスを用いた CM 単独投与の動物実験によると CM の 5 mg (1 日量) を 20% プロピレングリコール水溶液に溶解して皮下注射した場合は効無く、0.5 ないし 0.25% の割合に食餌に混じて経口投与した場合はわずかながら効果がある (only a very slight suppressive effect) という。又、Carr, Karlson, Gainer 等⁵⁾はモルモットの実験的結核症に 0.5% の割合に CM を含有した食餌で 200 日間治療したところ認むべき効果がなかつたと報告している。

私どもは、マウスの実験的結核症に対する CM 単独の効果と SM, IHMS 単独と比較すると共に CM+SM および CM+IHMS の併用群をおき併用効果の有無を検討した。

Youmans 等の実験における皮下注射の場合は注射側に腫脹、浮腫あるいは潰瘍を生じているが、私どもの実験においては CM は 1 日量 20 mg/kg で Youmans 等の実験の 1/10 以下の量を皮下注射した為かとくに副作用を認めず、死亡曲線から見ると CM 単独にてもある程度の効果があるようである。

私どもはさらに 3 週、3 カ月および 4 カ月治療したマウスを剖検に付し、その肉眼的観察、臓器乳剤の螢光顕微鏡的観察および臓器定量培養を施行したが、CM 単独群が対照につき最も病変高度で、SM+CM あるいは IHMS+CM 併用群は SM あるいは IHMS 単独群と比較して顕著な差を認めなかつた。

長期化学療法を施せるマウスより分離した菌の耐性獲得の問題に関しては昭和 29 年 4 月結核病学会総会において、われわれの教室から高度ではないが感受性の低い別動菌が出現し、またこれの出現は併用により抑制されることを報告 (詳細は追って発表予定) したが、今回の SM 単独群と SM+CM 併用群について見ると SM 単独群には 1.0 ないし 5.0 r/cc の SM に対し感受性の低い別動菌の出現を見るに反し SM+CM 併用群にはその発現を見ない。この点からすれば、CM を併用したことが菌の SM に対する耐性上昇を抑制したように考えられる。

IV Carr, Karlson, Gainer 等⁵⁾は、CM は SM 耐性菌に対しても感受性菌と同様抗菌力を有することから、SM 耐性 (100 r/cc , CM の最小阻止濃度 20 r/cc) の結核菌による粟粒結核に CM を 6 時間おきに 0.5 g

から 1.5 g (漸増) を経口投与し 45 日間継続して効果の無かつたことを報告しているが、私共の動物実験成績から CM の投与は単独の場合は非常に僅かながら実験的結核に改善が見られるが SM あるいは IHMS との併用においてはほとんどその併用効果が認められず、すなわち SM 又は IHMS 単独の場合とほとんど差がなく、しかも *in vitro* においては SM とむしろ拮抗的に作用しているので、SM 耐性出現を若干抑制するようではあるが、CM を臨床的に結核患者に SM と併用することは現在の段階では考えものである。

結 語

1) CM の結核菌に対する最小阻止濃度は大体において 10.0 r/cc で SM 耐性菌に対しても感性菌と同程度の抗菌力を有する。

2) *In vitro* における SM と CM の併用効果は認められず、むしろ CM を 1.0 ないし 5.0 r/cc の濃度を含有させることにより SM の抗菌力の減弱が認められる。

3) マウス実験的結核においては CM 単独にても甚だ軽微ながら病変の改善が認められるが、SM 単独群と SM+CM 併用群の間には顕著な差が認められない。

4) 実験的結核で治療したマウスからの分離菌についての感受性試験から見ると CM の併用は SM 耐性上昇を抑制する如き傾向がある。しかし人体における場合については今後の検討を要する。

なお本研究については文部省科学研究費 (総合研究結核) の補助を受けたことを記し感謝の意を表する。

文 献

- 1) Ehrlich, J., Bartz, Q. R., Smith, R. M., Joslyn, D. A. & Burkholder, P. R.: Science, 106: 417, 1947.
- 2) Youmans, G. P., Youmans Anne S. & Osborne, R. R.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 67: 426, 1948.
- 3) Jawetz, E., Gunnison, J. B. & Speck, R. S.: Am. J. M. Sc., 222: 404, 1951.
- 4) Mackness, G. B. & Smith, N.: Am. Rev. Tbc., 67: 322, 1953.
- 5) Carr, D. T., Karlson, A. G. & Gainer, J. H.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 25: 316, 1950.