

# Pyrazinamide によるマウスの実験的結核症に対する治療実験

宮本 泰\*・佐藤 直行・立花 暉夫

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 31 年 6 月 30 日

Streptomycin, P A S, T B<sub>1</sub>, I N H などの抗結核剤は、試験管内で結核菌に対して静菌的に作用する。しかし、これらの薬剤をいかに効果的に用いても、臨床的に細菌学的治癒という理想に、つねに到達しているわけではない。そこから必然的に化学療法に限界について、論議考察が行われるのである。もつとも細菌学的立場からすれば、これは抗結核剤自体の抗菌力の限度によるのではなく、結核症における感染形式の特殊性と、薬剤の作用形式の相互関係にもとづく現象である。したがって宿主側の因子を十分考慮すべきであり、この分野の研究を開拓することが、結核化学療法を新段階に導く基礎になると考えられる。

最近 McCune<sup>1)</sup>らによつて、Pyrazinamide (P Z A) と I N H とを併用したマウスの実験的結核症に対する治療成績では、感染動物の脾より結核菌が証明されず、eradicative chemotherapy といわれる効果を示すときもあると報告されている。そして P Z A の試験管内抗結核性の弱いことからして、本物質の作用機序は、他の化学療法剤のそれとは異なり、宿主側への影響に求められると考察されている。

わが国においても、P Z A の作用の検討が行われ、本剤のマウスの実験的結核症に対する効果に関する成績の報告も行われている。実験的結核症に対する治療実験では、Mc Cune らのいう治療成績の再現を目指したけれども、不成功に終つた。ここにわれわれの実験成績の概要を報告しておく。

## 実験成績

### I. 試験管内における抗結核菌作用

Kirchner Sy-Ser 培地を用いたとき、37°C 2 週間培養後の肉眼的判定の結果では、P Z A 500γ/cc でも H<sub>37</sub>Rv 株の発育を阻止していなかつた。同一実験時に薬剤対照としての I N H、および S M ではそれぞれ 0.1γ/cc、2γ/cc で発育を阻止していたので、P Z A の抗結核性は非常に弱いといえる。

また 1%、3%、および 5% に K H<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> を含む卵培地 (小川培地ないしその変法培地) 上での成績は、表 1 に示した。

表 1 Pyrazinamide の試験管内抗結核菌作用。1%、3%および5% K H<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> 卵培地上における抗菌作用の比較

菌株	菌量 10 <sup>-7</sup> mg	P Z A の濃度 (γ/cc)				
		1,000	200	50	10	0
1% K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> 培地						
H <sub>37</sub> Rv	( $\frac{4}{5}$ )	+ 30	+ 75	+ 75	+ 70	+ 100
H <sub>2</sub>	( $\frac{4}{5}$ )	0 0	+ 26	+ 30	+ 39	+ +
3% K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> 培地						
H <sub>37</sub> Rv	( $\frac{4}{5}$ )	+ 26	+ 110	+ 115	+ 110	+ 123
H <sub>2</sub>	( $\frac{4}{5}$ )	0 0	+ 14	+ 54	+ 76	+ 95
5% K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> 培地						
H <sub>37</sub> Rv	( $\frac{4}{5}$ )	+ 31	+ 59	+ 59	+ 61	+ (+)* 64(79)
H <sub>2</sub>	( $\frac{4}{5}$ )	0 0	40 0	40 35	+ 46	+ (+) 53(53)

注 \* 1% K H<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> 卵培地上の発生集落

これから P Z A の発育阻止濃度は、H<sub>37</sub>Rv 株に対して 1,000γ/cc 以上であり、5% K H<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> 培地を用いても著明なその発育阻止力の増強は認められない。ただ H<sub>2</sub> 株に対して発育阻止濃度は 200γ/cc 以上 1,000γ/cc 以下であり、H<sub>37</sub>Rv 株より低い値を示していた。

### II. 毒性試験

A) 急性毒性試験: 体重 18~22g のマウスに対し、1 kg 当り 120mg、240mg、300mg の P Z A を静脈内注射したが、中毒症状を認めなかつた。

他方体重 500~600g のモルモットに対し、メノウ乳鉢で磨碎して懸濁液とした P Z A を、ガラス製ゾンデを用いて経口投与した。

1 kg 当り P Z A 7g 投与群では 5 匹中 5 匹 (100%)、5g 投与群では 10 匹中 7 匹 (70%)、3g 投与群では 10 匹中 3 匹 (30%) が死亡した。2g 投与群では 10 匹全部が生じた。死亡例の中毒症状としては、歩行不全、呼吸困難がみられた。

B) 慢性毒性試験: 体重 450g 前後のモルモット 2 群に対し、P Z A 10mg/cc、50mg/cc の懸濁液を、それぞ

れ5ccずつ毎日ガラス製ゾンデを用いて経口投与した。したがって体重1kg 当り1群は毎日100mg, 他群は500mgのPZAを投与したことになる。経口投与を開始してから30日後に両群5匹ずつ, 50日後に3匹ずつの動物を屠殺剖検して, 病理組織学的検索を行った。

その結果, 全例の動物においてPZAの投与に帰因するとみられる, 著明な病的所見は発見されなかつた。ただ肝細胞の水疱様変性と, 肝, 肺におけるうつ血が, 全例に共通した主要変化であつた。しかし, ガラス製ゾンデを用いての経口投与方法には, 手技上の失敗が少なくなく, 気管内への注入によつて肺炎をひき起した例も多かつた。この肺炎を発生した例では, 特に肝の変化が強くみられたので, 肝の所見がPZAの投与による変化かどうか断定できなかつた。

III. マウスの実験的結核症に対する治療実験

A) 実験方法: 体重20g 前後の均一dd 系マウスを用いた。これに凍結乾燥して保存した人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株の蒸溜水浮遊液 0.01mg (注射量 0.2cc, 10.4×10<sup>4</sup> 生菌単位) を尾静脈から注射した。

感染2週後治療開始時に, これら動物をつぎの3群に分けた。

第1群: INH, PZA併用治療群

第2群: INH単独治療群

第3群: PZA単独治療群

INHは動物1匹当り1日100γの割合で, 5ccの飲料水に溶解して毎日経口投与した。PZAは1匹当り1日量 2.4mg を背部の皮下に毎日注射した。

治療6週間後に一時投薬を中止し, 10日後から再び第1, 第2群の半数の動物に15週間後まで治療をつづけた。これら2群の他の半数の動物は, 治療を中止したまま15週後まで放置した。

この期間中に, 治療開始時に3匹, 治療2週間後に第1, 第2群それぞれ5匹ずつ, 治療4週間後に第1, 第2群それぞれ5匹ずつと第3群8匹, 最後に治療開始より15週後に残つた全動物を殺した。そして肺, 肝, 脾の各組織について, 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地を用いて組織乳剤の稀釈定量培養法によつて, 結核菌の分離培養を行った。

B) 実験成績: 臓器の定量培養の成績は, すべて組織1mg 中の分離生菌数をもつて表2~表5に示した。治療開始時の成績は表2に, 治療2週間後, および4週間後の成績はそれぞれ表3, 表4に, 15週間後の成績は表5に示した。

表3の成績から, 治療2週間後では第1群, 第2群ともに肺, 肝, 脾の3臓器から同数の菌を証明している。さらに表4の成績から, 治療4週間後でも第1群と第2群との間には, 分離生菌数に差が認められず, 第3群の肺では他の2群のそれよりも検出された生菌数が多いようである。

表2 感染2週後(治療開始時)の定量培養

マウス No.	組織1mg 中の分離生菌数		
	肺	肝	脾
1	225	10	470
2	90	75	850
3	265	10	885

表3 感染4週後(治療2週間)の定量培養

群別	マウス No.	組織1mg 中の分離生菌数		
		肺	肝	脾
INH +PZA	4	185	25	47
	5	135	15	44
	6	115	0	10
	7	卅*	10	68
	8	80	4	98
INH 単独	9	卅	29	57
	10	40	4	42
	11	110	10	116
	12	156	15	34
	13	55	33	119

注\* 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 非培地上の発生集落量を, +~卅に分けた成績を示す。以下の表についても同じ。

表4 感染6週後(治療4週間)の定量培養

群別	マウス No.	組織1mg 中の分離生菌数		
		肺	肝	脾
INH +PZA	14	47	7	25
	15	460	8	52
	16	70	5	15
	17	160	13	60
	18	16	6	6
INH 単独	19	540	7	28
	20	150	10	56
	21	570	16	35
	22	49	6	9
	23	100	8	13
PZA 単独	24	360	11	290
	25	260	4	21
	26	600	5	15
	27	卅	1	16
	28	410	2	17
	29	280	2	15
	30	580	3	29
	31	800	2	79

表 5 感染17週後の定量培養, 治療15週間継続群と治療6週間後中止群の成績

	群別	マウス No.	組織 1 mg 中の分離生菌数		
			肺	肝	脾
投 与 継 続 群	INH	32	87	4	1
	+	33	+	8	2
	PZA	34	84	1	1
		35	+	10	2
	INH 単独	36	+	0	0
		37	+	1	1
		38	+	2	0
投 与 中 止 群	INH	39	+	3	94
	+	40	+	9	+
	PZA	41	+	3	89
		42	+	2	20
		43	+	16	+
	INH	44	+	6	74
	単独	45	+	25	+
		46	+	21	56

また表5の成績から, 治療を継続しても第1群と第2群との間には, ほとんど分離生菌数に差がなかった。ただ治療6週間後投薬を中止した群の方が, 治療を継続した両群にくらべて, 特に肺内分離生菌数が多くなっている。

以上のように, 本実験の目的には普通の治療方法と異なつた点があつたため, いわゆる非治療対照群がおかれなかつたので, 3治療群の効果の有無は判定できなかつた。

その上3治療群の効果の比較も, わずかに肺内分離生菌数の多少によらねばならぬことになつた。

すなわち本実験においては15週間の治療によつても, INH・PZA 併用治療群と INH 単独治療群との間に, 著明な差を認めることができなかったし, 肺, 肝, 脾から生菌を証明しえている。

治療4週間の範囲内では, PZA 単独治療は INH・PZA 併用治療, INH 単独治療に劣る成績を示していた。

## 考 察

PZA の試験管内における抗結核菌作用については, いわゆる普通法によつてはほとんど見るべき作用がないという点で一致している<sup>2)~7)</sup>。ただ使用培地の pH を 5.0~5.5 にした Dubos 培地内では, PZA の抗結核性が増強すると報告され<sup>4)</sup>, Kirchner 培地についても, この現象が追試確認されたともいわれる<sup>7)</sup>。

しかし本実験成績に示したように, 凝固水の pH が 5.6 前後とみられる 5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地上においては, PZA の抗結核性の増強が認められていない。この現象は, PZA の耐性検査に際して, 簡便な使用培地がないということにも解釈されるわけである。

さて, 実験的結核症に対する PZA の治療効果に関しては, 多くの報告があるが, そのいずれもが著効ありとしているわけではない<sup>3)5)6)8)9)</sup>。

前述したように McCune らの成績は, すでにわが国においても概要の紹介が行われているので, 周知のように劃期的な治療法とも見られる。

すなわち感染当日より治療を開始した場合, INH・PZA の併用治療5週間以後では, 脾よりの結核菌の分離培養が不能であつたとしている。

他方, 結核病巣が確立され, 組織内の結核菌数が非常に多くなつている感染3週間後から INH・PZA 併用治療を行つた場合でも, 8週間治療以後, 脾の分離培養が陰性に終つたとしている。そしてこの場合, PZA 単独治療で INH 単独治療にまさる効果のみられ, しかも PZA 単独治療で脾の分離培養陰性の例もあつたとしている。この現象の解釈として, PZA は酸性環境にある病巣内の結核菌に対して, より有効に作用するものであると考察している。

しかし McCune らは INH・PZA 併用療法がマウスの実験的結核症に対し, 必ず完全に根絶的に作用するとはいつていないが, 明白なのは他の化学療法剤の作用機作と PZA のそれとが相違している点であるとしている。

ただし INH・PZA の併用療法に際し, マウスに対して少なくとも 1 kg 当り 1 g の PZA を 8週間投与して, 初めて PZA の効果が認められると結論されている。これが, 彼我の実験成績の相違をきたしている唯一の原因であるかどうかは明らかでない。

特に実験方法について, その詳細は今日まで知ることができないが, 脾内生菌数の消長曲線よりみて少なくとも  $\text{H}_3\text{Rv}$  株の大量感染が行われていると推定される。

さらに McCune のいう, 化学療法剤に対して肺内と脾内とにおける結核菌の態度が異なるということは認められるとしても, 脾内に  $10^6$  の order の結核菌が固着しているとき肺内の生菌数, ひいては肺の所見によつて対照群が死亡せず生存しているという点から, 宿主の結核菌に対する感受性が低いことも想像される。

われわれの実験成績でも, 表5に示すように15週間の治療によつて, 脾内分離生菌数は肺のそれにくらべて著明に少なくなつている。マウスの実験的結核症に対して, 化学療法を8週間以上も継続して, その間における肺, 脾内生菌数の消長を追跡した実験例は, 本実験を除いてこれまで経験されていない。

したがって McCune の成績においては、脾の分離培養陰性となった時期ないしそれ以前から、すでに肺の分離培養は陰性となっているのであろうか。

われわれの実験成績では、治療2、4週間後の2時期ともに肺内生菌数が脾内生菌数より多くなっている。この事象から、本実験においては投与薬剤の不足ということも考えねばならないし、PZA体重1kgについて少なくとも1gというMcCuneの量に比較すれば、われわれのPZAの投与量はその約10分の1に当ることになる。単にPZAの増量のみによつて所期の治療目標が達成されるかどうか、かれらの実験方法の詳細が判明したなら、なお追試の必要があると思う。

もつとも、実験的結核症に対するPZAの治療効果が、生体内にそのまま反映されて生体内病巣の結核菌が根絶されるものとは考えられない。PZAの実験的結核症に対する効果発現の意義は、試験管内で認めるべき抗結核菌作用がないにもかかわらず、大量長期療法によつてMcCuneらの根絶効果が認められたという点にあると考えられる。

この事実は、マウスの実験的結核症に対する抗結核剤のスクリーニングテストに際して、われわれの劃一的な実験方法によつて、効果あるものを効果なしとして棄却する例もあることを教えている。

### 結 論

邦製 Pyrazinamide について、試験管内および動物実験を行つて次のような結果をえた。

1) Kirchner Sy-Ser 培地内における抗結核菌作用についてはみるべき効果がなく、鶏卵培地上においてもその発育阻止力は微弱であつて、pHの酸性側への移行によつても発育阻止力の増強は認められなかつた。

2) 急性毒性試験では、マウスに対してPZA300mg/kg以下の皮下注射によつて、またモルモットに対して

2g/kg以下の経口投与で毒性を認めなかつた。

3) マウスの実験的結核症に対しては、INH・PZAの併用治療によつて根絶的治療効果もえられなかつたし、PZA単独治療の効果はむしろINH単独治療に劣つていた。

柳沢部長の御指導に深謝する。

本報告の要旨は、日本結核病学会関東地方学会第33回総会（昭和30年9月）にて発表した。

### 文 献

- 1) McCune, M., Tompsett, R., Mushenheim, C., Organick, A., Batten, J. & McDermott, W.: Tr. of the 14 th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis. 66—71, Feb., 1955.
- 2) Tarshis, M.S. & Weed, W. A.: Am. Rev. Tuberc., 67: 391—395, 1953.
- 3) Steenken, W. Jr. & Wolinsky, E.: Am. Rev. Tuberc., 70: 367—369, 1954.
- 4) McDermott, W. & Tompsett, R.: Am. Rev. Tuberc., 70: 748—754, 1954.
- 5) 長沢 潤・彦坂亮一・加藤和一・原沢道美: 最新医学, 10: 897—903, 昭30.
- 6) 高階二郎・阿倍政次・古田守・佐藤祐一: 総合医学, 12: 631—641, 昭30.
- 7) 高橋欣一: 日結, 14: 910—912, 昭30.
- 8) Malone, L., Schurr, A., Lindh, H., McKenzie, D., Kiser, J. S. & Williams, J.H.: Am. Rev. Tuberc., 65: 511—518, 1952.
- 9) Solorovsky, M., Gregory, F. J., Ironson, E. J., Bugie, E.J., O'Neill, R.C. & Pfister, K. 3rd.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 79: 563—565, 1952.