

## Pyrazinamide の作用機序の研究

## 第1報 Isoniazid との関連において

平敷 安正・国越 宇市

国立療養所清瀬病院

受付 昭和35年2月1日

Pyrazinamide (以下 PZA と略) の試験管内での結核菌発育阻止作用については, Dessau<sup>1)</sup>, Solotorovsky<sup>2)</sup>, 長沢<sup>3)</sup>, 高階<sup>4)</sup>, 中村<sup>5)</sup>, 高橋<sup>6)</sup>ら諸家の報告があるが, いずれも著明な阻止作用を認めていない。すなわちその阻止濃度は 100~1,000  $\gamma/cc$  で従来の抗結核剤のそれと比較すると全く阻止作用がないといつても過言ではない。しかるにその臨床効果—ことに Isoniazid (以下 INH と略) との併用効果—にはかな

りのみるべきものがあることはこれまた諸家の一致した意見である。このことは PZA が他の抗結核剤と異なっている特異な点として注目されており, 特殊な作用機序を有するものであると思われる。著者らはその作用機序の解明に資すべく, ことに INH との関連において 2, 3 の実験を行い次のような結果をえたので報告する。

### 実験 I PZA 添加による INH の試験管内静菌作用への影響

表 1 PZA 添加による INH の静菌作用

症例番号	K	N 1 $\gamma$	P 10 $\gamma$	N+P 1 $\gamma$ 10 $\gamma$
1	■	■	■	■
2	■	■	■	■
3	■	■	■	■
4	+	+	+	+
5	+	+	+	-
6	■	■	■	■
7	■	-	■	-
8	+	+	+	+
9	■	+	■	(14)
10	+	-	+	-
11	■	■	■	■
12	■	-	■	-
13	■	■	■	■
14	■	■	■	■
15	■	■	■	■
16	■	■	■	■
17	■	-	■	-
18	+	-	+	-
19	■	-	■	-
20	■	■	■	■

注: K—Control N—INH P—PZA ( )—コロニー数

臨床的に PZA は INH の約 10 倍量を用いるので, 著者らは 3% 小川培地を用いて, INH 1  $\gamma/cc$ , PZA 10  $\gamma/cc$ , INH 1  $\gamma/cc$  + PZA 10  $\gamma/cc$  の 3 種の耐性培地を作り, INH 0.1  $\gamma/cc$  以上の耐性菌を略出する 20 例の PZA 未使用患者からえた喀痰について検討してみた。なお PZA の臨床的耐性検査の方法はまだ確立されていないが, 著者らは PZA 1g が 100 cc の蒸溜水に水浴加温によつて溶解し冷却後も暫時析出しないことを確かめ, この溶液を用いて従来の抗結核剤の例に準じて 10  $\gamma/cc$  の耐性培地を作つた。

その結果は表 1 に示す通りで, PZA 10  $\gamma/cc$  では対照と全く同様に菌が生えて全然阻止作用を認めなかつた。INH 1  $\gamma/cc$  と PZA 10  $\gamma/cc$  混合培地では, わずかに症例 5 の菌株で添加による影響を認めたのみで残りの全部は INH のみと全く同様であつた。すなわち PZA 添加により INH の作用にほとんど影響を与えなかつた。

### 実験 II INH 耐性菌に対する PZA 感受性について

1955 年 Perry と Morse<sup>7)</sup> は pH 6.6 の oleic acid albumin agar 培地を用いて実験し, “5~15  $\gamma/cc$  の間の INH 耐性菌は 10~25  $\gamma/cc$  PZA に感受性を示す,” という特殊な関係を発表した。このことは病巣中の INH 耐性 5  $\gamma/cc$  以下の菌には INH が作用し, 5~15  $\gamma/cc$  の菌には PZA が作用することを暗示している。PZA の作用機序の 1 解釈法を提供している。そこで著者らは 0.1, 1, 5, 10, 15, 20  $\gamma/cc$  の INH 耐性培地および 10, 25, 50, 200, 500, 1,000  $\gamma/cc$  の PZA 耐性培地を 3% 小川培地を用いて作り, 数多くの患者の喀痰中より丁度 5~15  $\gamma/cc$  の間の INH

H 耐性菌を示す菌株5例をえて、これらの P Z A 感受性を検討してみたが表2に示すように症例2において P Z A 50  $\gamma/cc$  以上で菌数低下をみたのみで、とくにこ

れらの I N H 耐性菌が P Z A に感受性があるとは考えられない結果をえた。

以上実験 I, II を通じていえることは、3% 小川培地

表2 I N H 耐性菌に対する P Z A の感受性

症例番号	K $\gamma/cc$	N <sub>1</sub> 0.1	N <sub>2</sub> 1	N <sub>3</sub> 5	N <sub>4</sub> 10	N <sub>5</sub> 15	N <sub>6</sub> 20	P <sub>1</sub> 10	P <sub>2</sub> 25	P <sub>3</sub> 50	P <sub>4</sub> 200	P <sub>5</sub> 500	P <sub>6</sub> 1,000
1	■	■	■	■	-	-	-	■	■	■	■	■	■
2	■	■	■	+	-	-	-	■	■	(35)	(17)	(4)	(7)
3	■	■	■	■	+	+	-	■	■	■	■	+	+
4	■	■	■	■	■	-	-	■	■	■	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	-	■	■	■	■	■	■

という pH 6.2 の固形鶏卵培地においては P Z A はほとんど結核菌阻止作用を示さないということである。著者らは今後、pH の異なる種々な固形および液体培地についてこのことをさらに追求したいと考えている。

実験III 実験結核症に対する P Z A-I N H の併用効果

実験結核症に対する P Z A の効果に関しては有名な McCune<sup>8</sup> らの I N H-P Z A 併用実験を始めとして、Solotorovsky<sup>2</sup>、Dessau<sup>1</sup>、岩崎<sup>9</sup>、宮本<sup>10</sup>、高階<sup>4</sup>、高橋<sup>11</sup>、染谷<sup>12</sup>、佐川<sup>13</sup>、村尾<sup>14</sup>らの報告がある。これらの報告の多くは、P Z A-I N H 併用効果と I N H 単独効果との間に有意の差を認めていない。著者らも mouse による Screening Test を行つたが、たまたま菌の大量感染時の臓器定量培養において、下記のごとく P Z A の作用に特異な点のあることを見出した。

1) 第1回実験方法

実験動物として体重 15g 前後の DD 種 mouse 60 匹を使用した。すべての動物に清 H<sub>1</sub> 菌(人型強毒菌、結核研究所保存株) 10 mg/cc 浮游液を 0.1 cc すなわち mouse 1匹につき 1mg を側尾静脈より注射した。このさいの生菌数は約 30 × 10<sup>5</sup>/0.1 cc である。

従来著者らのところでは Screening Test のさい清 H<sub>1</sub> 菌 0.1 mg を mouse に静注して感染させていたのであるが、その菌量では I N H の強力な作用によつて定量培養の菌数が極度に減少するので、P Z A-I N H 併用との比較が困難であると予想したため、10 倍量の菌量を注射したのである。感染後1週目より次の6群に分けて治療を開始した。

- K …… Control 無治療
- P …… P Z A 125 mg/kg
- P' …… P Z A 250 mg/kg
- N …… I N H 5 mg/kg

P N …… P Z A 125 mg/kg + I N H 5 mg/kg

P' N …… P Z A 250 mg/kg + I N H 5 mg/kg

投薬方法はすべて皮下注射による 1日1回法を用いた。なお P Z A は 1g を 80 cc の滅菌蒸留水に加温のもとに溶解せしめ、冷却時に析出した時には使用の都度加温して溶解せしめたうえで使用した。このさい薬液は 1.25% となりこれを P の場合は mouse の体重 10g につき 0.1 cc の割合で皮下注射し、P' の場合はその倍量を注射した。

治療後4週まで、1週ごとに各群とも数匹を体重測定後屠殺し、各臓器の重量を測定した。その後肺肝の一部を無菌的に取り出して、乳鉢でまめつし、1% NaOH 液で 1,000 倍に稀釈して、その 0.1 cc を各3本の 1% 小川培地に培養した。6週後培地に発育した結核菌のコロニー数を算定したが、算定に当つては 200 コロニーまでは実数を数え、培地斜面全面発育を■, 3/4以上を■, 1/2以上を■, それ以下 200 コロニー以上までを+とした。

2) 第1回実験成績

イ) 死亡数……死亡数および死亡日数は表3に示す通りで各群の間に一定の関係はなかつた。

表3 第1回実験死亡数

菌接種後日数	K	P	P'	N	P N	P' N
11日目					1	
29	1			1		
30	1					1
32			1			

ロ) 定量培養成績……以上の方法で実験を行つた中で、最後の第4週で屠殺した大多数 27 匹についての実際の成績を表4に示した。一見して I N H は肺にきわめて有効、P Z A は肺にほとんど効果がないのに肝においては I N H に優るとも劣らぬ効果を挙げている。

両者併用群は肺肝ともに著明な効果を挙げていることが目立つ。なお対照の5例中2例は数えられる程度の菌数しか示さなかつた。これは mouse の個体差によるものか、または結核菌接種時の菌量不足によるものと思われるが、このさいでも肝の菌数は肺の菌数の $\frac{1}{2}$ 以内にあつて、P や P' の肝の菌数低下とは明らかに異質のものであると考えられる。

表4 第1回動物実験成績(4週後)

	臓器コロニー数						臓器重量 mg			体重 g
	肺 <sub>1</sub>	肺 <sub>2</sub>	肺 <sub>3</sub>	肝 <sub>1</sub>	肝 <sub>2</sub>	肝 <sub>3</sub>	肺	肝	脾	
K <sub>1</sub>	■	■	■	■	■	■	/	/	/	15.5
K <sub>2</sub>	210	180	180	32	28	35	176	356	173	15.9
K <sub>3</sub>	200	191	180	雑	88	63	93	196	66	14.8
K <sub>4</sub>	■	■	■	■	■	■	/	/	96	17.2
K <sub>5</sub>	■	■	■	■	■	■	/	/	171	11.0
P <sub>1</sub>	230	■	■	4	14	9	115	211	150	20.2
P <sub>2</sub>	■	■	■	1	4	雑	123	178	131	17.0
P <sub>3</sub>	42	38	53	-	-	雑	96	152	117	18.1
P <sub>4</sub>	■	■	■	65	77	66	122	243	161	14.7
P' <sub>1</sub>	180	■	■	1	1	-	110	280	250	22.0
P' <sub>2</sub>	■	■	■	15	10	12	118	138	171	18.5
P' <sub>3</sub>	121	142	110	1	5	2	118	409	154	19.5
P' <sub>4</sub>	■	■	■	2	1	1	154	353	186	21.7
N <sub>1</sub>	-	2	7	141	60	120	124	24	140	17.9
N <sub>2</sub>	12	1	14	71	71	45	106	181	78	16.8
N <sub>3</sub>	3	6	2	30	25	35	152	182	78	21.7
N <sub>4</sub>	8	1	5	125	115	117	103	212	133	16.0
N <sub>5</sub>	-	-	-	2	1	1	114	181	84	19.5
PN <sub>1</sub>	-	-	1	1	2	-	62	176	185	16.1
PN <sub>2</sub>	1	3	8	11	15	8	122	251	169	22.0
PN <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	81	258	149	21.0
PN <sub>4</sub>	1	-	-	-	-	-	64	202	191	17.7
PN <sub>5</sub>	3	3	-	56	59	53	120	182	170	16.5
P'N <sub>1</sub>	-	-	-	20	22	15	111	234	152	21.4
P'N <sub>2</sub>	5	5	4	15	2	5	116	264	173	21.2
P'N <sub>3</sub>	1	-	5	7	雑	8	81	206	154	19.5
P'N <sub>4</sub>	-	1	-	-	-	-	108	193	176	17.9

注：雑は雑菌 -は菌陰性

コロニー実数と符号■等の数とを平均し比較することは不可能であるが、試みに符号の方は過半数を占める符号をもつて代表し、実数はその平均値をとつて比較してみたら表5に示す通りになり、PZA は肝に特異的に有効であり、併用群はINH, PZA 各単独の相乗効果を示している。なおPZA 125 mg/kg と 250 mg/kg との間には有意の差を認めなかつた。

表5 治療4週後の定量培養平均コロニー数

	肺	肝
K	■	■
P	■	24
P'	■	4
N	4	64
PN	1.3	14
P'N	1.8	8.5

3) 第2回実験方法

次に季節と mouse の種類を変えて同様な実験を行つてみた。今回(秋期)は体重 12g~18g の V.S 種 mouse 66 匹を用い、かつ PZA は 125 mg/kg のみとして4群に分けて実験を行つた。接種菌株およびその量、投薬方法、臓器定量培養法等はすべて前回と同様である。

4) 第2回実験成績

1) 死亡数……死亡日数および死亡数は表6に示す通り、今回は mouse の種類によるためかあるいは季節が寒冷にすぎたためか死亡数多く、そのために治療後3週で生き残つた全部を屠殺して実験を切りあげた。なお死亡数と治療法との間の関係を見出すことはできなかつた。

表6 第2回実験死亡数

菌接種後日数	K	P	N	P+N
15日目	1			
22	2	2	1	1
23	1	2	3	1
24				1
27				2
28	1	2		
計	5	6	4	5

2) 定量培養成績……最後の第3週で屠殺した16匹についての実際の成績は表7に示す通りであり、前回に準じてこれをまとめた結果は表8のごとくである。この

回の実験においてもまた前回の結論に矛盾しない結果をえた。

表7 第2回動物実験成績(3週後)

	臓器コロニー数						臓器重量 mg			体重 g
	肺 <sub>1</sub>	肺 <sub>2</sub>	肺 <sub>3</sub>	肝 <sub>1</sub>	肝 <sub>2</sub>	肝 <sub>3</sub>	肺	肝	脾	
K <sub>1</sub>	卅	卅	卅	+	+	+	122	152	82	11.5
K <sub>2</sub>	卅	卅	卅	30	45	14	210	277	188	13.0
K <sub>3</sub>	卅	卅	卅	+	+	+	253	208	47	10.5
P <sub>1</sub>	卅	卅	卅	41	50	61	124	191	192	13.5
P <sub>2</sub>	卅	卅	卅	11	8	8	151	325	187	16.4
P <sub>3</sub>	卅	卅	卅	8	27	16	121	204	149	13.5
N <sub>1</sub>	-	-	-	5	-	7	95	158	161	14.1
N <sub>2</sub>	+	+	+	45	33	45	94	176	138	13.5
N <sub>3</sub>	110	100	120	50	82	雑	104	180	79	11.6
N <sub>4</sub>	35	61	38	49	46	72	68	169	83	9.5
N <sub>5</sub>	99	85	54	24	56	37	98	183	40	10.0
N <sub>6</sub>	24	22	25	20	31	25	102	148	127	12.0
PN <sub>1</sub>	24	35	27	2	3	13	230	300	276	19.0
PN <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	130	201	40	14.5
PN <sub>3</sub>	56	53	50	6	8	30	118	132	289	15.0
PN <sub>4</sub>	雑	+	雑	5	7	12	99	162	102	13.0

表8 治療3週後の定量培養平均コロニー数

	肺	肝
K	卅	+
P	卅	26
N	77	37
PN	42	7.3

以上、著者らは mouse の実験結核症において、PZA が肝に特異的に有効であることを見出したが、これは肝と肺の臓器 pH の差によるものかあるいは他の原因が存するのかを今後さらに追求していきたいと思つてい

る。

結 論

1) 3% 小川培地で INH 1γ/cc, PZA 10γ/cc, および両者の混合耐性培地を作り、種々な INH 耐性菌を用いて検討した結果、PZA の添加により INH の静菌作用にほとんど影響を与えなかつた。

2) INH 耐性を示す菌株中 5~15γ/cc の間の耐性を示す菌株5例をえて、PZA 感受性を検討したが、とくにそれらが PZA に感受性を示すといふことはみられなかつた。

3) mouse の実験結核症において、PZA が肺の病巣にほとんど無効であるのに肝に特異的に有効に作用することを、2回の実験によつて認めた。

稿を終るに臨み懇切なる御指導御校閲を頂いた東京医科歯科大学島本教授および清瀬病院島村院長に深甚の謝意を表し、併わせて当病院検査室諸氏の御協力を感謝する。

なお本論文の要旨は昭和 32 年 10 月第 12 回厚生省医務局研究発表会において報告し、その一部は昭和 31 年 5 月第 4 回日本化学療法学会において報告した。

文 献

- 1) Dessau et al.: Am. Rev. Tuberc., 65: 635, 1952.
- 2) Solorovsky et al.: Proc. Soc. Biol. & Med., 79: 563, 1952.
- 3) 長沢 他: 最新医学, 10: 897, 昭30.
- 4) 高階 他: 綜合医学, 12: 631, 昭30.
- 5) 中村 他: 新薬と臨牀, 4: 515, 昭30.
- 6) 高橋 他: 日本臨牀結核, 14: 910, 昭30.
- 7) Perry et al.: Am. Rev. Tuberc., 72: 840, 1955.
- 8) McCune et al.: 13th Conf. Veterans Administration. 1954.
- 9) 岩崎 他: 「結核治療の再評価」昭31.
- 10) 宮本 他: 結核, 31: 674, 昭31.
- 11) 高橋 他: 呼吸器診療, 11 (3): 59, 昭31.
- 12) 染谷 他: 第32回結核病学会総会, 昭32.
- 13) 佐川 他: 同上
- 14) 村尾 他: 同上