

Slide Cell Culture よりみた結核化学療法剤の効果に関する研究

第 1 報 INH および各種 INH 誘導體投与後の
全血内結核菌阻止効果の投与量による比較

小 林 和 夫

東京大学伝染病研究所臨床研究部 (部長 北本 治教授)

受付 昭和 33 年 10 月 17 日

緒 言

最近種々なるイソニコチン酸ヒドラジド (INH) の誘導體がつかられ、これらは INH よりも副作用が少なく、したがって大量投与が可能であるところから、INH の副作用の強い症例などにこれら誘導體の大量投与が行われるようになってきた。

これと併行して INH 誘導體の生体内をはじめ、種々なる環境下における動態についても検討され、生体内および生体外環境でも INH に分解して遊離 INH として抗結核作用を現わし、大部分アセチル化されて尿中に排泄されるものとする報告が多い^{1)~4)}。

最近 Middlebrook ら^{5)~7)}により、血清中の INH 定量法として、Antimicrobially active INH の生物学的定量法が検討されている。

私は薬剤投与後の全血の抗結核菌作用を私の改変した Slide Cell Culture (SCC) 法により観察して、INH と INH 誘導體の慣用量投与と大量投与の場合の効果と比較検討した。

実 験 方 法

体重 50~53 kg のツベルクリン反応 既陽性の健康成人 A, B, C および D の 4 例を選び、INH およびその誘導體を薬剤ごとに日をあらためて食後 40~50 分に 1 回内服せしめ、投与前と、1, 2, 4 および 6 時間後に採血し、SCC 法により全血の結核菌増殖阻止効果の時間的消長を観察し、A, B, C の 3 例については同時に化学的定量法によつて血中濃度を測定した。

1. 薬剤および投与量

INH は 0.1 および 0.2 g をそれぞれ 1 回に、また、イソニコチン酸ヒドラジド・メタンサルフォン酸ナトリウム (IHMS)

イソニコチン酸ヒドラジド・メタンサルフォン酸カルシウム (IHMS-Ca)

グルクロン酸ナトリウム・イソニコチニール・ヒドラジン (INHG)

ピルピン酸ナトリウム・イソニコチニール・ヒドラ

ジン (IPN)

の 4 つの INH 誘導體は 0.3 および 0.5 g を 1 回投与した。

2. SCC 法

a. 菌液作成および SCC の術式

菌浮遊液は人型結核菌 Frankfurt 株の単個菌分離培養したものを、Dubos Tween-Albumin 培地に 1 週間均等培養後、3,000 r.p.m. 10~15 分遠沈し、その上清液 (0.2 mg/cc, 2.5~6×10⁶ V.U.) を用いた。培養操作、器具等は佐藤の法¹²⁾に従い、菌液 0.05 cc と被検血液 0.4 cc を毛細管ピペットでよく混和し、厚さ 0.07 mm の紙片を両端に付した滅菌載物ガラス上の 2 カ所に滴下し、他の 1 枚の載物ガラスでこれを被い、パラフィンで周囲を完全に封じ、37° C 孵卵器内に 7 日間培養し、1% 醋酸水で溶血、10% ホルマリン液で固定、水洗後、Ziehl-Neelsen 法で染色、鏡検した。かくして得られた標本 1 視野 (800 倍) 中の集落数は平均 3~4 コであつた。対照は同じ操作で培養のみを除外した。

b. 判定方法

実験成績は菌増殖度で表わし、その分類は渡川⁹⁾に従い、集落数 100 コを数え、その平均菌数を求め、対照と同じく単個菌の散在するを (-)、集落が 2~4 コの菌よりなるを (±)、5~10 コを (+)、11 ~ 30 コを (++)、31~50 コを (+++), 51 コ以上の菌よりなるものを (####) とした。この表記方法を阻止効果の面からみると、(-) (±) は完全ないし高度の阻止効果あり、(+) (++) は中等度の阻止効果、(+++) は軽度、(####) は阻止効果なしという関係を表わすことになる。

3. 血中濃度測定

薬剤による、掛見らの方法を改変した定量法⁹⁾に従つて測定した。本定量法は β-Naphthochinon-4-Sulfon 酸ソーダを用いて INH そのものを定量するもので、したがって血中濃度はすべて INH 量で示した。

実 験 成 績

INH および INH 誘導體の慣用量投与の場合と

大量投与の場合の全血阻止効果および血中濃度の時間的経過を各薬剤別に図表 1~5 に示した。図中(≡)~(一)は全血内結核菌増殖度を示し、曲線は血中濃度の時間的変動を示した。また図表 6 に血中濃度測定値を表示した。

1. INH 投与時の成績 (図表 1)

INH 0.1 g 投与時には、全血阻止効果は 2 例 (A および C) にわずかにみられたにすぎず、0.2 g 投与時には、1 例 (B) に 1 時間後完全阻止がみられ、他の 1 例 (A) でも中等度の阻止効果が認められた。血中濃度は 0.1 g 投与時 1.2~2.6 γ/cc の最高濃度を示し、0.2 g 投与により 3 例とも血中濃度は上昇し、6 時間後も 1.2~2.7 γ/cc を示していた。

2. IHMS 投与時の成績 (図表 2)

0.3 g 投与時には全例に阻止効果がみられず、0.5 g 投与時には、2~6 時間後に 1~2 時間以上にわたって、3 例 (A, B および C) に完全阻止効果を認めた。血中濃度は 2 例測定されたが、0.5 g 投与時はその血中濃度の著しい上昇と、その持続が認められた。

3. IHMS-Ca 投与時の成績 (図表 3)

0.3 g 投与時には 1 例 (C) のみ中等度の阻止効果がみられたが、0.5 g 投与時には 2 例 (A および C)

に IHMS 同様の完全阻止効果がみられた。しかし他の 2 例は薬剤増量による阻止効果の変化はみられなかった。血中濃度は 0.3 g 投与時においても高濃度を示し、6 時間後も 1.8~2.6 γ/cc を示した。0.5 g 投与時では 0.3 g 投与時高濃度を示した例はさらに高い濃度を示した。

4. INHG 投与時の成績 (図表 4)

0.3 g 投与時 2 例 (A および C) に中等度の阻止効果があり、0.5 g 投与により 1 例 (C) に完全阻止効果が現われ、他の 2 例 (A および B) も中等度阻止にいたる阻止力の増強をきたした。血中濃度は 0.3 g 投与時は 0.4, 1.2, 1.5 γ/cc の最高濃度を示したにすぎなかったが、0.5 g 投与時ではいずれの例も上昇しかつ持続も長く、6 時間後も 1.4~1.8 γ/cc を示した。

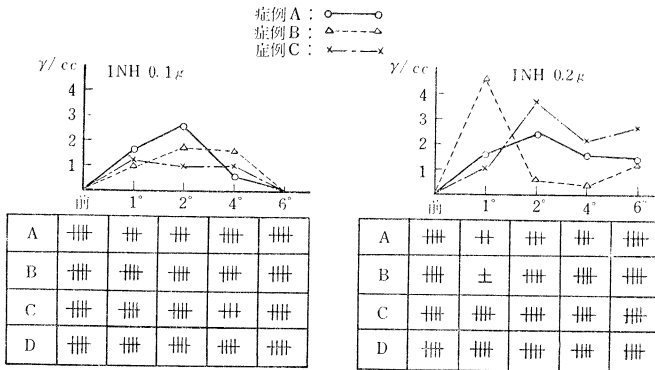
5. IPN 投与時の成績 (図表 5)

0.3 g 投与時全例に中等度の阻止効果がみられ、0.5 g 投与によつて阻止効果の増強をきたし、2 例 (A および C) では 1~3 時間以上にわたって完全阻止効果がみられた。血中濃度では A, C 例のごとく増量投与で上昇したのや、減少した例 (B) もあつた。

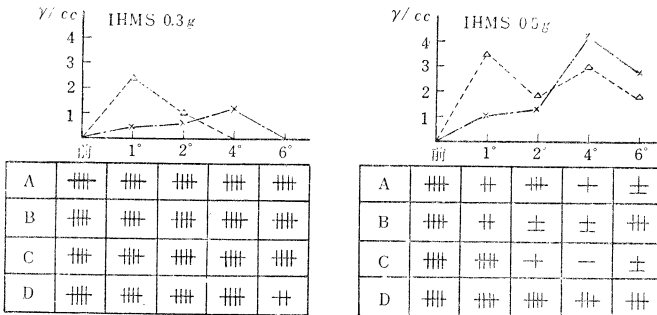
4 例に施行した肝機能検査 (Cephalin-Cholesterol 絮

薬剤投与後の血中濃度と全血阻止効果

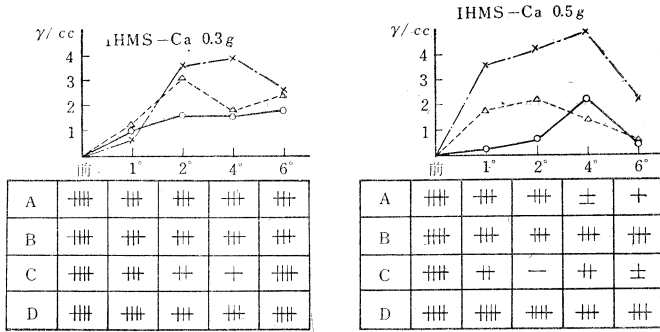
図表 1



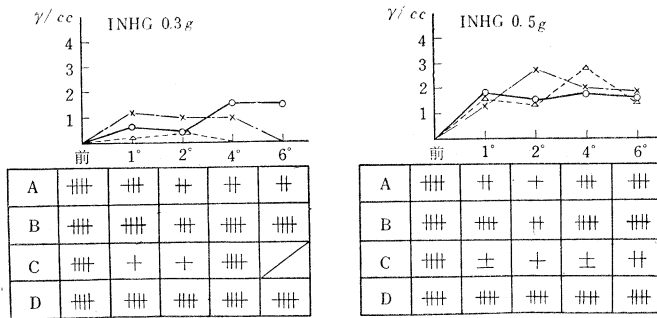
図表 2



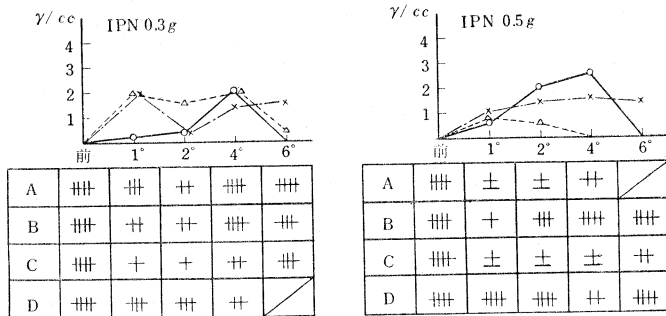
図表 3



図表 4



図表 5



状反応, Thymol 混濁および絮状反応, Kunkel 氏硫酸亜鉛混濁反応, Meulengracht 黄疸指数検査) では異状は認められなかった。

総括ならびに考案

従来化学療法剤の生体内における消長については主として血中濃度の面で検討され、主としてこの成績に基づいて投与量、投与回数が決められてきたが、緒言に記したごとくことに INH およびその誘導体の生体内運命については、それぞれ異なった様相を呈し、まだ解明されない点も多いので、このさいこれら薬剤投与後時間的経過を追って採取した血液につき、その血中濃度と並行して抗結核菌作用を比較することは有意義のことと考える。最近では血清中の抗菌性有効 INH の生物学的定量

成績から、INH の投与量、併用薬剤と臨床効果等が検討されている^{5)~7)}が、私は INH および INH 誘導体の慣用量を投与したとき、大量を投与した場合について、その1回量投与後の全血内結核菌増殖阻止力の消長を SCC 法により追求し、同時に行つた化学的血中濃度定量成績を参考にして、各薬剤慣用量および大量投与の場合の効果と比較検討した。

1. SCC 法について

かかる実験に SCC 法を応用する場合には、使用する菌液を構成する菌群が可及的均一なる増殖力、ならびに均一なる薬剤感受性を有することが望ましい。かかる意味から私は従来の方法に改良を加え、この目的にそうよう努めたのでまず実験方法そのものについても考察を加えたい。

図表 6 INHおよびINH誘導体投与後の血中濃度 (γ/cc)

薬劑	症例	服用量		0.1 g				0.2 g			
		時間	1°	2°	4°	6°	1°	2°	4°	6°	
											時間
INH	A		1.6	2.6	0.6	0	1.6	2.4	1.6	1.4	
	B		1.0	1.8	1.6	0	4.6	0.6	0.4	1.2	
	C		1.2	1.0	1.0	0	1.0	3.7	2.1	2.7	
薬劑	症例	服用量		0.3 g				0.5 g			
		時間	1°	2°	4°	6°	1°	2°	4°	6°	
											時間
IHMS	A		—	—	—	—	—	—	—	—	
	B		2.4	1.0	0	0	3.5	1.8	3.0	1.8	
	C		0.4	0.6	1.2	0	1.0	1.3	4.2	2.8	
IHMS-Ca	A		1.0	1.6	1.6	1.8	0.2	0.6	2.2	0.4	
	B		1.2	3.1	1.8	2.4	1.8	2.2	1.4	0.6	
	C		0.7	3.6	3.9	2.6	3.6	4.2	4.8	2.2	
INHG	A		0.6	0.4	1.5	1.5	1.8	1.5	1.8	1.6	
	B		0.2	0.4	0	0	1.6	1.4	2.8	1.4	
	C		1.2	1.0	1.0	0	1.5	2.8	2.0	1.8	
IPN	A		0.2	0.4	2.0	0	0.6	2.0	2.6	0	
	B		2.0	1.6	2.0	0.4	0.8	0.6	0	0	
	C		2.0	0.4	1.4	1.6	1.0	1.4	1.6	1.4	

SCC 法は Wright^{10) 11)} により報告されてから、佐藤¹²⁾、伊藤¹³⁾、緒方¹⁴⁾、西村ら¹⁵⁾ により主として結核免疫における体液の意義の究明に用いられてきたが、抗結核剤が使用されるようになってからは試験管内実験に比し、生体内環境により近い状態にあるとして全血液内における薬剤の抗結核作用が検討され、また試験管内で阻止作用の強い薬剤でも SCC 法においては抗菌作用を示さないものも存在することから、抗菌物質の検定法として SCC 法の存在値を無視できない¹⁶⁾ と報ぜられてきた。すなわち薬剤服用時の SCC 法による阻止作用は、個体の免疫効果、薬剤の直接の静菌作用および薬剤の刺激による生体防禦機構の変化等の影響を総合したものであり、この方法により生体内環境により近い状態で薬剤の効果が観察できるものと考えられる。

SCC 法の術式も上記諸氏^{12)~15)} により改良せられてきたが、その菌浮游液作成にあつては、多くは馬鈴薯培地あるいは岡・片倉培地等に 2~4 週培養の菌集落を瑪瑙乳鉢で磨砕し、生塩水または蒸留水で 5~10 mg/cc 溶液となし、2,000~3,000 r.p.m., 10~20 分遠沈し、その上層液を使用している。抗結核剤使用時の SCC 法においても多くは上述の方法に準拠して行われている^{17)~22)}。

SCC 法実施にあたり、定量的にかつ再現性を得るために主に注意すべき事項は、増殖力の強い単個菌を使用すること、接種菌量を一定にすることである。従来主として行われた乳鉢で磨砕する方法では一様の単個菌を得ることがむずかしく、かつ一般に増殖力が弱く培養後も増殖すべき対照の標本でも増殖せざる菌が、かなりの割合で見出され^{21) 23)}、私もまたこのことを経験している。よつて私は Dubos Tween-Albumin 培地を使用し 1 週間培養、振盪後、遠沈することにより容易にかつ菌の増殖力を阻害することなく単個菌を得ることができた。したがつて同一標本では各菌集落は一様の増殖度を示しその判定にあつても算術平均値をもつてその増殖度を表わすことができた。これには草間²⁴⁾ も報じているごとく、Dubos 培地において生菌数と混濁度とが平行した増殖曲線を示している 1 週間培養の菌液を用いたことおよび柴田²⁵⁾ により単個菌分離培養せる菌を使用したことが好影響をもたらしていると考えられる。

接種菌量については明記した報告は少なく、多くは 5~10 mg/cc の菌液の 2,000~3,000 r.p.m., 10~20 分遠沈後の上層液を使用しているが、伊藤¹³⁾ は標本の 1 視野ごと 50~10 ㉿の菌液、小野塚²⁶⁾ は 800 倍にて 1 視野当り 20~40 ㉿の菌液、また佐藤¹²⁾ は 0.25 mg/cc、緒方¹⁴⁾ は 0.5 mg/cc、大塚²⁷⁾ は 2 mg/cc の菌液を使用している。私は本実験においては、0.2 mg/cc の菌液 0.05 cc (0.01 mg) を用いたが、これは従来の報告に比しては少量であるが、なお判定成績から考えると、かなり多量と考えられ、その後の実験においては、0.05 mg/cc 液、0.05 cc を用いている。

2. 慣用量と大量投与の場合の比較

INH および INH 誘導体の 1 日慣用量および大量投与の場合の 1 回量を同一人に投与し、その全血阻止力の消長を観察した。

INH 0.1 g 投与例には著明な阻止効果がみられず、0.2 g 投与例のうち 1 例のみに完全阻止効果がみられた。血中濃度は 0.1 g 投与時 1.2~2.6 γ/cc 、0.2 g 時 2.4~4.6 γ/cc を示した。加藤²²⁾ は 0.1 g 投与時 (空腹時) 2 時間まで完全阻止を認め、Rubin 法で血中濃度を測定し、最高濃度 1.9~3 γ/cc と報告している。本岡²¹⁾ は INH 0.2/3 g 投与後 3 時間まで阻止効果があるというも完全阻止ではないようであり、芦野²⁰⁾ は 0.15 g (3 mg/kg) で完全阻止効果を認めるも 3 回分服では 4 mg/kg 以上でのみ阻止効果があると報じている。私の成績は阻止効果が幾分劣るようであるが、菌液、菌量などの差異を考えなければならぬ。すなわち INH 増量により 1 例(B)に顕著な、他の 1 例(A)に中等度の阻止効果の増強がみられた。

IHMS 投与例では 0.3 g 投与時は INH 0.1 g 投与時と同様阻止効果がほとんど認められず、0.5 g 投与

時 3 例に著明な阻止効果が 1~2 時間以上にわたって認められた。すなわち阻止力の弱い例でも増量によつて完全阻止にいたるまでの増強を示している。この傾向は IHMS-Ca, INHG, IPN においても認められた。すなわち 0.3 g では阻止効果は軽度ないし中等度であるが、0.5 g 投与にて 1~3 時間にわたって完全阻止がみられ、なお 6 時間後にも阻止効果がみられる例が認められた。このことは INH および INH 誘導体服用患者で臨床効果のない、あるいは少ない症例においては、一応大量療法を考慮すべき 1 つの根拠となるものと思われる。

薬剤増量に伴う血中阻止力の増強の傾向は同時に施行した化学的定量法による血中濃度においても明らかに認められた。すなわち増量に伴い血中濃度は上昇かつその持続時間の延長が認められた。

3. SCC 法による阻止効果と血中濃度との関係およびその各個人における差異

加藤²²⁾は Rubin 法で血中濃度を測定し、1 γ /cc 以上で完全阻止をみたと報じている。私の成績では完全阻止効果をうるためには、INH として 1~1.5 γ /cc 以上の血中濃度を要する結果を得たが、一方 2.4~2.8 γ /cc でも阻止効果の弱い例があり、密接な平行関係はみられなかつた。実験条件の異なるためと思われる。

阻止効果と血中濃度を同時に測定した 3 例について、その個人差をみると A, C 例はともに増量に伴う阻止効果の増強が明らかであり、B 例では INH, IHMS 服用時以外では、その影響は著明でなかつた。血中濃度も A, C 例ことに C 例において増量に伴う上昇とその持続延長がみられた。一方 D 例においては阻止効果弱く、IPN 服用時に中等度の阻止効果をみたにすぎず、薬剤の種類および増量に伴う影響はきわめて軽微にすぎなかつた。このような差異の起る原因については、INH の吸収、排泄および体内での非活性化の Pattern が人によつて異なるためと考えられる。私の検査した症例では、薬剤の投与時間を食後一定時間に統一し、また肝機能も異常を認めなかつたのであるが、その血中濃度および阻止効果において顕著な個人的差異が観察された。

結 論

INH および INH 誘導体である IHMS, IHMS-Ca, IPN, INHG につき、SCC 法により、これら薬剤の慣用量投与時と大量投与時の全血阻止効果を比較検討し、同時に血中濃度を測定した。

1. INH および INH 誘導体はいずれも慣用量より大量投与時において、阻止力の増強と阻止時間の延長をきたし、血中濃度もその上昇と持続時間の延長を認めた。すなわち薬剤服用後の全血の結核菌阻止効果の面からは大量投与の場合の方が小量投与の場合よりも有効

であると思われる。

2. 阻止効果と血中濃度との関係をみると、感受性菌に対する完全阻止には、INH として大体 1~1.5 γ /cc 以上の血中濃度を要した。

3. INH および INH 誘導体投与後の全血の時間的阻止効果および血中濃度には顕著な個人差が認められた。

4. SCC 法実施にあたり、その菌液は Dubos Tween-Albumin 培地に 1 週間培養せるものを用いることにより従来方法よりも簡便かつ正確に行うことができた。

稿を終るに臨み、御懇切なる御指導と御校閲を賜わつた北本教授に深謝し、御援助、御協力を戴いた福原博士ならびに研究室諸兄に感謝の意を表す。本論文の要旨は昭和 32 年 5 月、第 5 回日本化学療法学会総会において発表した。

文 献

- 1) 堂野前他：日本医事新報，-1697, 3, 昭31.
- 2) 那須：結核，32：12, 昭32.
- 3) 下村：結核，32：481, 昭32.
- 4) 五味：結核，32 (増刊号)：1, 昭32.
- 5) Middlebrook, G., et al.：日結，15：647, 昭31.
- 6) Mandel, W., et al.：Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91：409, 1956.
- 7) Kass, I., et al.：Ann. Intern. Med., 47：744, 1957.
- 8) 渋谷：結核，11：63, 昭8.
- 9) 芦野：結核診療，7：33, 昭29.
- 10) Wright, A.E., et al.：Lancet, 1：365, 417, 473, 1923.
- 11) Wright, A.E.,：Lancet, 1：218, 1924.
- 12) 佐藤：実験医学雑誌，10：871, 昭1.
- 13) 伊藤：結核，8：291, 昭5.
- 14) 緒方：結核，10：117, 昭7.
- 15) 西村：結核，13：9, 770, 昭10.
- 16) 鈴木：日本臨床，6：468, 昭23.
- 17) 北野：日本内科学会雑誌，41：477, 昭27.
- 18) 堂野前他：臨床，5：460, 昭27.
- 19) 松島：結核，28：86, 昭28.
- 20) 芦野：抗酸菌病研究雑誌，8：176, 昭28.
- 21) 本岡：九大結研紀要，1：133, 昭29.
- 22) 加藤：結核，30：390, 昭30.
- 23) 堂野前他：最新医学，7：640, 昭27.
- 24) 草間：結核，33：185, 昭33.
- 25) 柴田：結核，32：17, 昭32.
- 26) 小野塚：抗酸菌病研究雑誌，6：183, 昭25.
- 27) 大塚：医学と生物学，13：403, 昭23.