

持続性サルファ剤の結核治療への応用に関する実験的研究

塩田 憲三・前田 泰生・大貝 嘉弘
 稲葉 俊雄・松本 要三・古瀬 清行
 須賀 嘉幸

大阪市立大学医学部小田内科教室 (主任 小田俊郎教授)

受付 昭和 35 年 11 月 24 日

I 緒 言

内藤教授^{1) 2)}の研究に始まったサルファ剤の結核治療への応用は、多くの賛同を得て、昨年結核治療指針にも取り入れられた。

私は、本年 4 月の第 57 回日本内科学会総会の、シンポジウム「化学療法と内科臨床」において、持続性サルファ剤を検討することになったのを機会に、持続性サルファ剤の結核治療への応用に関して基礎的実験的研究を行なったので、その結果を報告する。

II 実験ならびに結果

1. 持続性サルファ剤の抗菌力

i) 実験方法

持続性サルファ剤として Sulfamethoxyypyridazine (L と略す), Sulfaphenazole (O), Sulfaisomezole (S), Sulfadimethoxine (M), Sulfathiomethylpyridazine (SY-1) を選び、これらの人型結核菌 $H_{37}Rv$ に対する試験管内発育阻止力を Sulfisoxazole (SI) のそれと比較した。

人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株は、栄研製 Dubos 培地に 7~10 日間隔で 3 代継代して培地によくならし 4 代目の 5 日培養のものを試験に供した。

サルファ剤を含む培地は、栄研 Dubos 培地の基礎培地に、各サルファ剤を直接溶解して 22.3 mg/dl の溶液を作り、高圧滅菌したものを原液として基礎培地で倍數稀釈液を作る。各稀釈液を 4.5 cc 宛中試験管に分注してのち、付属したアルブミン液を 0.5 cc 宛加えると、20 mg/dl から倍數稀釈されたサルファ剤加 Dubos 培地ができる。各稀釈ごとに 2 本の試験管を用い、これに前記菌液 0.1 cc を接種した。判定は 37°C に 7 日間培養後に行ない、管底に沈澱した菌苔の大きさや厚さによつて (+) ~ (卍) にし、菌を接種したまま冷蔵庫に入れておいた試験管と同程度のものを (-), やや増殖したかに思われるものを (±) と判定した。

ii) 成績

表 1 に明らかなように、 $H_{37}Rv$ の完全増殖阻止は O

および M の 20 mg/dl 濃度においてのみみられ、これ以下の濃度では各サルファ剤とも多少の菌増殖がみられるが、それでも 0.3 mg/dl においても対照と比べるとなお菌増殖は抑制されている。

各薬剤別にみると、もつとも静菌力の強いものは、この成績からは、O および SI ではほぼ等しく、ついで S, SY-1, M の順で、L はもつとも劣るようみえる。

Table 1 Growth of Tubercle Bacilli in Dubos' Medium Containing Sulfa-drugs

Drug	Conc. of Sulfa-Drugs in the Medium (mg/dl)							
	20	10	5	2.5	1.25	0.6	0.3	0
L	±	±	+	+	+	-	卍	卍
O	-	±	±	±	±	±	+	
S	±	±	±	+	+	+	+	
M	-	±	+	+	+	+	+	
SY-1	±	±	±	+	+	+	卍	
SI	±	±	±	±	±	+	+	

2. 持続性サルファ剤と抗結核剤の併用

i) 実験方法

持続性サルファ剤として SY-1 を選び、SI を対照とし、抗結核剤として SM および INH を使用し、SM+SY-1, SM+SI, INH+SY-1, INH+SI の組合せの併用作用を調べた。SY-1 の使用は、本剤が先のわれわれの実験によつて、1 回 1 g の服用で 24 時間は十分有効血中濃度を保つこと、ならびに、第 1 実験の結果からみて、同様の薬理的性質をもつ L よりは結核菌に対する抗菌力が高いからである。

使用結核菌は人型 $H_{37}Rv$ で、菌浮游沈作製法等は第 1 実験と同様である。

検査用培地も、同様に Dubos 培地であつて、これにサルファ剤は 2 mg/dl より倍數稀釈をして 0.125 mg/dl まで、SM は 1 γ/ml より 0.06 γ/ml まで、INH は 0.1 γ/ml より 0.006 γ/ml までそれぞれ 5 段階稀釈をし抗結核剤とサルファ剤を組合わせて加えた。す

なわち Dubos 基礎培地に 22.8 mg/dl となるようにサルファ剤を溶解して高圧滅菌したものを原液とし、これを基礎培地で倍数希釈し、各希釈液をそれぞれ 4.4 cc 宛を中試験管に分注する。SM または INH はそれぞれ 55 γ/ml および 5.5 γ/ml から始まる蒸留水で倍数希釈したもののそれぞれから 0.1 cc を先のサルファ剤加基礎培地 4.4 cc に加える。さらに付属アルブミン液 0.5 cc を加えて所要の濃度のサルファ剤と抗結核剤を含んだ Dubos 培地が得られる。各希釈系列について 2 本の試験管を用い、これに前記人型結核菌液 0.1 cc を加えて 37°C の孵卵器に 7 日培養してのち判定した。判定規準は第 1 実験と同じである。

ii) 成績

SM に SY-1 または SI を併用した場合の成績は表 2 の上段に、INH に SY-1 または SI を併用した成績は下段に表示した。

上段についてみると、この実験においてわれわれが用いた H₃₇Rv は、SM 2 γ/ml で発育は抑制されるが完全阻止はみられていないものであつたが、SM+SI 群では SM 0.06 γ/ml と、SI 0.25 mg/dl の組合せで、SM+SY-1 群では SM 0.06 γ/ml と SY-1 0.5 mg/dl の組合せのところで対照に比べて発育阻止がみられている。すなわち SM にサルファ剤を加えると協力作用があつて抗菌力が高まることを物語るが、こ

の場合 SI のほうが 1 段階その作用が強いようである。

次に INH とサルファ剤の組合せについてみると、INH 単独での完全発育阻止は 0.05 γ/ml であるが、INH+SI 群では INH 0.0125 γ/ml と SI 0.25 mg/dl、ならびに INH 0.025 γ/ml と SI 0.125 mg/dl との組合せにおいて、INH+SY-1 群では INH 0.0125 γ/ml と SY-1 0.5 mg/dl の組合せ、ならびに INH 0.025 γ/ml と SY-1 0.25 mg/dl の組合せにおいて抗菌力の上昇がみられるが、このさいも、同濃度の INH に対する SY-1 の濃度は SI に比べて 1 段階高濃度を要している。

以上の点からみると、SI、SY-1 とも、SM または INH と併用すると SM、INH の抗菌作用を高めるようであるが SI のほうがややこの作用が強いように思われる。

3. SM と持続性サルファ剤との併用による結核菌の SM 耐性獲得について

i) 実験材料ならびに方法

本実験は持続性サルファ剤出現のもつとも早期に行なわれたものであるので、持続性サルファ剤として L が使われた。

第 2 実験と同様の方法で、SM ならびに L の 2 倍希釈の各段階のものを種々の組合せに含む Dubos 培地

Table 2 Synergistic Effect of SM or INH and Sulfa-drugs

SM	SI	2 mg/dl	1	0.5	0.25	0.125	0
1 γ/ml	-	-	-	±	±	+	+
0.5	-	-	-	±	±	+	+
0.25	-	-	-	±	±	+	+
0.125	-	-	-	±	±	+	+
0.06	-	-	-	±	±	+	+
0	-	±	±	±	+	+	±

SM	SY-1	2 mg/dl	1	0.5	0.25	0.125	0
1 γ/ml	-	-	-	±	±	+	+
0.5	-	-	-	±	±	+	+
0.25	-	±	±	±	±	+	+
0.125	±	±	±	±	±	+	+
0.06	±	±	±	±	±	+	+
0	±	±	±	+	+	+	±

INH	SI	2 mg/dl	1	0.5	0.25	0.125	0
0.1 γ/ml	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	-	±	+
0.0125	-	-	-	-	±	+	+
0.006	-	-	±	±	+	+	+
0	-	±	±	±	+	±	±

INH	SY-1	2 mg/dl	1	0.5	0.25	0.125	0
0.1 γ/ml	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-
0.025	-	-	-	-	±	+	+
0.0125	-	-	-	±	+	+	±
0.006	-	-	±	±	+	±	±
0	-	±	±	±	+	±	±

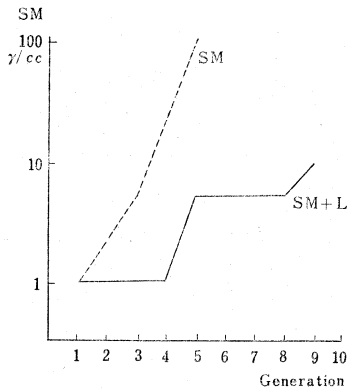
に前実験同様にして作製した人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株の Dubos 培地 5~7 日目の菌浮遊液 0.1 ml を加え、37 °C に 7 日間培養後の結核菌増殖程度を判定する。菌増殖が認められる両薬剤の最高濃度のところの試験管から菌を集めて、数回洗滌してのち、これを再び同様に SM および L の組合せ培地に植え継ぐ。このようないわゆる漸増培養を 7~10 日間隔で 10 代繰り返した。他方 SM のみを含む Dubos 培地で、7~10 日培養後ようやく菌発育を認める最高 SM 濃度の試験管からの菌を同様に洗滌して、再び新しい SM 含有培地に植え継ぐことを繰り返して対照とした。

ii. 成績

一括図示したものが図 1 である。初代の SM+L 加 Dubos 培地での L を含まない系列 (Lo 系列と略す) における結核菌は、この実験においては 1 γ/ml で完全に発育を阻止されていた。

しかして SM 0.5 γ/ml , L 5 mg/dl の割に含む試験管においてようやく菌増殖を認め、これを次代に継いだ。第 2 代 SM+L 加 Dubos 培地の Lo 系列においても結核菌は SM 1 γ/ml で発育を阻止されていたが、同様にして継代の第 5 代目では、Lo 系列では 5 γ/ml でようやく菌増殖を抑えられ 6, 7 および 8 代は同程度で、9 代目では 10 γ/ml で発育を阻止されていた。これに対して、はじめから SM のみを含む培地に継代された菌は、3 代で 10 γ/ml に、5 代では 100 γ/ml でもなお菌増殖が認められた。このことは、SM に L を加えて培養することによつて結核菌の SM に対する耐性獲得がかなり著明に遅延することを物語るものである。

Fig. 1 Resistance of $H_{37}Rv$ to Streptomycin in each Generation



4. INH に持続性サルファ剤を併用服用した場合の血清内活性 INH 濃度について

i) 実験材料ならびに方法

健康者ならびに肝腎機能正常な患者を用いた。

まず INH 400 mg を 1 回に内服させ、ついで 1 週間後に同一人に INH 400 mg に持続性サルファ剤 1 g を混ぜて 1 回に内服させた。

持続性サルファ剤としては、われわれの実験によつて 1 日 1 g 1 回の内服で少なくとも 24 時間は有効血中濃度を保つことが認められた、L および SY-1 を選び、対照として SI をおいた。薬剤内服後 2, 4 および 6 時間後に採血し、血清を分離し、-10°C 以下に保存し、同一人の INH 単独の場合の血清と、INH +サルファ剤の場合の血清とが揃ったところで同時に血清内 INH 濃度を測定した。

血清内 INH 濃度の測定は Bell³⁾ の方法による生物学的測定法を用いた。このさい培地は 2 γ/ml の割に PABA を加えた Dubos 培地を用いた。

ii) 成績

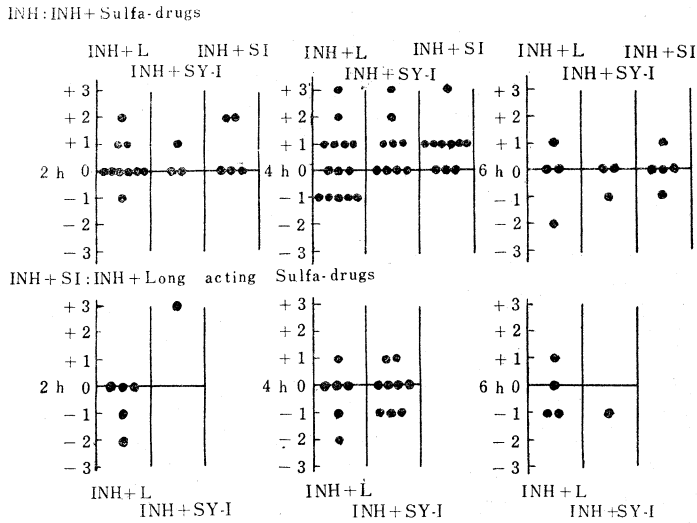
表 3 は同一人について INH 単独と、INH に少なくとも 1 種類以上のサルファ剤の併用内服を行なった場合とが 1 組揃ったものを集計したものである。したがつてある場合には同一人について INH 単独服用後 2, 4, 6 時間の血清と、INH に 1 種類のサルファ剤を併用内服して 2, 4, 6 時間の血清とがそれぞれ 1 対となつて揃ったものもあれば、2 時間後の 1 対が揃っただけのものも含まれている。しかし、同一人についての INH の吸収にはさほど著明な差はないといわれている⁴⁾ ので、これを集計してみたのである。

表に明らかのように、INH 単独あるいは INH にサルファ剤を混ぜて服用させた場合、血中濃度のピーク

Table 3 Active INH Level by Addition of Sulfa-drugs in Serum

Drug	Hour	Conc. of active INH Level in the Serum (γ/cc)						
		<0.3	0.3	0.6	1.2	2.4	4.8	9.6
INH	2				4	4	4	1
	4		1	6	4	3	3	1
	6	2	3	1	1			
INH + SI	2				3		3	
	4			3	1	3	3	
	6	3	1	1	1			
INH + L	2				1	4	5	
	4			3	2	1	2	
	6	1	2	1				
INH + SY-1	2				1	2		
	4			2	3		4	
	6	1	2					

Fig. 2 Comparison of Active INH Leveled between INH alone and INH + Sulfa-drugs



は2時間後にあるように思われる。すなわち、2時間後血清では生物学的 INH 濃度はすべて 1.2 γ/ml 以上であるが、4時間後ではそれ以下のものが現われ、6時間後では全部が 1.2 γ/ml あるいはそれ以下で、INH 単独で2例、INH+SI で3例、INH+Lで1例、INH+SY-1 で1例においては患者血清加培地（この場合患者血清は5倍希釈以上になっているが）では結核菌の発育阻止は全くみられず、かつ、対照培地における最少菌発育阻止濃度は 0.06 γ/ml であったので、少なくとも 0.3 γ/ml 以下であり本法での測定可能の範囲外にある。

さらに表3では INH 単独の場合と INH にサルファ剤を併用した場合との血清中活性 INH 濃度を比較することは困難であるので、INH 単独服用後各時間ごとの血清中活性 INH 濃度を原点にとり、INH にサルファ剤を併用服用後同一時間後の血清中活性 INH 濃度が前者に等しい場合は原点を通る線上にプロットし、それより2倍濃度の高いもの（試験管1本だけ高希釈で菌発育阻止がみられるもの）を +1 の線上に、2倍濃度の低いものは -1 の線上にプロットして作ったものが図2である。

図2上段左から右へそれぞれ薬剤服用後2, 4および6時間後について、INH 単独の場合の濃度を原点とし、これに INH に各種サルファ剤を併用した場合のものをプロットしたものである。2時間後では、INH+L 服用10例中 INH 単独服用の場合と同濃度のもので6例、2~4倍（試験管1~2本）高濃度のもので3例、2倍低濃度のもので1例で INH 単独と比べて著差がないといえる。INH+SY-1 の3例では2例が INH 単独の場合と等しく、1例は2倍高い。

INH+SI の5例では3例が INH 単独の場合

と等しく、2例は4倍高く、低いものは1例もない。例数は少ないがこの2つでは活性 INH 濃度がやや昇るものが多いといえようか。

同様に4時間後では、INH+L 14例中、INH 単独の場合と等しいもの3例、2倍以上高いもの6例、2倍低いものが5例あつて、この場合も増減相半ばして差がないが、INH+SY-1の9例では、INH 単独と等しいもの4、高いもの5例で低いものは1例もなく、また INH+SI の10例では、INH 単独と等しいもの3例、高いもの7例で、この場合においても SY-1 あるいは SI と INH の併用は、血清中 INH 濃度がやや高まるとみてよからう。6時間目については全体に濃度が低いので検討の対象とはしなかつた。

次に同図下段は、同一人について、INH 単独、INH+SI、ならびに INH+L または SY-1 と3回以上を Cross-over して検査できたものについて、INH+SI の場合の濃度を原点として、INH+L または INH+SY-1 の場合をプロットしたものである。この場合例数が少ないので明らかではないが、2時間値では、INH+L の5例中3例は INH+SI の場合に等しいか2例は低い。4時間値では、INH+L の6例中3例は INH+SI の場合に等しく、2例は低く、1例のみが高く、全般的にみると INH+L は INH+SI よりも血清活性 INH 濃度が低い印象を受ける。INH+SY-1 でも9例中 INH+SI の場合と等しいもの4例、高いもの2例、3例は低く、INH+L の場合と同様に INH+SI 服用の場合よりも血清中活性 INH 濃度が低いように思われる。

次に前実験と同様に健康人において、INH の200

mg と Sulfamethyazole (U) あるいは S I および M の 1.0 g を併用服用時の血清活性 INH 濃度は表 4, 図 3 に示すように INH 単独では 1.6~0.2 γ/ml に分布し, INH+U では 1.6~0.2 γ/ml , INH+S I では 1.6~0.4 γ/ml , INH+M でも 0.8~0.2 γ/ml に分布し S I 併用では多少高濃度を示し, M 併用では多少低濃度のものが多いようであるが優劣をつけるほどの差とは認めがたい。

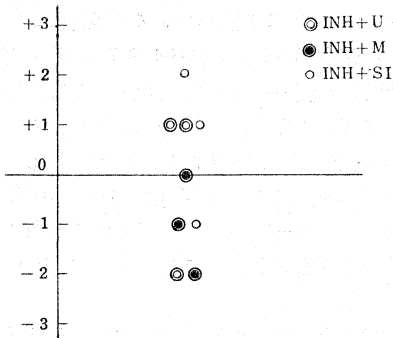
すなわち 前実験の INH 400 mg を 200 mg に減量投与することによつてはサルファ剤併用が血清活性 INH 濃度を前実験ほど高めなかつた。

これを分かりやすくするために, 前実験と同様に, INH 単独の場合を原点にとり, これと, INH+サルファ剤を比較したものが図 3 である。

Table 4 Active INH-Level by Addition of Sulfa-drugs to 200 mg of INH

	Drug	Conc. of INH in Serum (γ/ml)					
		6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2
Umeha	INH						
	INH+U					○	
	INH+S I			○			
	INH+M					○	
Nagai	INH						○
	INH+U					○	
	INH+S I				○		
	INH+M						○
Nakagawa	INH			○			
	INH+U					○	
	INH+S I				○		
	INH+M					○	
Sugiyama	INH						○
	INH+U						○
	INH+S I					○	
	INH+M						○

Fig. 3 Comparison of active INH Level between INH alone and INH + Sulfa-drugs



III 総括ならびに考案

抗結核剤 SM および INH と持続性サルファ剤との併用による抗結核作用を総括すると, 持続性サルファ剤の人型結核菌 H₃₇Rv に対する抗菌力は, O, M では 20 mg/dl で完全増殖阻止をみたが, その他のものでは 20 mg/dl 以下の濃度では不完全増殖阻止を示し, その順序は S I ≧ O で以下 S, SY-1, M, L の順であつた。

持続性サルファ剤 SY-1 と SM あるいは INH との併用による, 人型結核菌 H₃₇Rv に対する抗菌力は, SM のみでは 2 γ/ml , INH のみでは 0.05 γ/ml で発育阻止をみたものが, SM+SY-1 では SM 0.06 γ/ml で, SM+S I でも同様に SM 0.06 γ/ml で発育を阻止し, INH+SY-1 では INH 0.0125 γ/ml , INH+S I では SM 0.006 γ/ml で発育阻止がみられた。すなわち, SM または INH と SY-1 または S I との併用は抗結核剤の抗菌力を上昇し, S I のほうが SY-1 よりややその作用が優れている。

次に, SM と L の併用による人型結核菌 H₃₇Rv の SM に対する耐性獲得に及ぼす影響をみると, われわれの行なつた実験条件においては, SM 単独含有培地では菌の SM 耐性は連続的に上昇し, 5 代で 100 γ/ml 以上となるのに対し, 併用時には段階的にゆるやかに上昇し, 10 代目においても 10 γ/ml に達する程度であつて, 耐性獲得を遅延せしめた。

最後に INH と持続性サルファ剤併用時の血清中活性 INH の濃度をみると, 服用 2 時間後および 4 時間後では, INH 400 mg と持続性サルファ剤 1 g との併用内服では INH 単独服用に比べて活性 INH 濃度が高く測定された。そして, S I または SY-1 を併用したほうが L を併用した場合よりもやや高い値が得られた。しかし, INH 量を 200 mg とした場合には, サルファ剤併用と INH 単独服用との間に, 血清中活性 INH 濃度 (4 時間値) の差はみなかつた。

サルファ剤単独の試験管内抗結核菌作用は内藤^{1) 2)}, 吉田⁵⁾, 吉脇⁶⁾, 渡辺ら⁷⁾ らも述べているように, その抗菌力は報告者によつて多少の差はあるが, S I がもつとも強いとされ, われわれの成績もこれと軌を一にする。

次に, SM または INH にサルファ剤を併用することによつて前者の抗結核菌力が高められることはすでに諸家^{8)~10)} によつて報告されているが, われわれは持続性サルファ剤にも同様の作用があることを認めた。持続性サルファ剤は 1 日 1 g 1 回の服用によつて, この実験において確かめられた SM または INH の抗菌力を高めるに十分な濃度を少なくとも 24 時間は維持することが知られているので¹⁵⁾, 従来のサルファ剤よ

りも副作用の少ない¹⁵⁾ ことと相まつて、使用するに足るものと考えられる。

さらに SM と L との併用が結核菌の SM に対する耐性獲得を遅延せしめることは、多少の異論もあるとはいえ¹¹⁾、内藤^{1) 2)}、浜口¹⁰⁾、初鹿¹²⁾、その他^{9) 13)}の成績と一致する。

INH とサルファ剤との併用による血清内活性 INH 濃度の上昇は山下¹⁴⁾ らも述べているように、INH の量が少量ではサルファ剤を併用しても効なく、 4 mg/kg ではじめて併用効果をみるというというのが、われわれの実験においては 400 mg/dl ではじめて血清中活性 INH 濃度の上昇をみた。

以上のことから、われわれの用いた持続性サルファ剤の各種は、*in vitro* の成績を対象とすると、SI と比べて必ずしも優れたものとはいえないが、1) 従来のサルファ剤に近い併用効果があること、2) 1日1回1g の服用で十分併用効果が期待できること、3) したがって長期連用時においても簡便に、かつ副作用少なく用いることができること等のことから、持続性サルファ剤と抗結核剤の併用は十分に用いるに足るものと考えられる。

IV 結 語

1) 持続性サルファ剤の人型結核菌 $H_{37}Rv$ に対する抗菌力は、O, S, SY-1, M, L の順で、O, M は 20 mg/dl で完全に増殖を阻止し、その他のものではこの濃度では不完全阻止を示した。

2) 持続性サルファ剤 SY-1 と SM または INH との併用による *in vitro* の抗結核菌作用は、それぞれ単独の場合よりも上昇する。

3) SM と L との併用によつて、結核菌の *in vitro* での SM に対する耐性獲得は抑制される。

4) INH と持続性サルファ剤を併用した場合、INH を 400 mg を一時に内服せしめた場合には、同量の INH を単独に服用した場合に比べて血清内活性 INH 濃度を上昇せしめるが、INH 量を 200 mg としたときにはこのようなことはみられなかつた。しかしこの作用も同量の SI を用いた場合にやや劣るようであつた。

小田教授の御指導、御校閲を深謝します。なお本論文要旨は第 57 回日本内科学会シンポジウムで化学療法と内科臨床の一部として報告した。

文 献

- 1) 内藤：結核研究の進歩，28：111，昭35.
- 2) 内藤：呼吸器診療，15：309，昭35.
- 3) Bell, J.C. & Riemensnider, D.K. : Amer. Rev. Tuberc., 75：992，1957.
- 4) Bell, J.C. & Riemensnider, D.K. : Amer. Rev. Tuberc., 75：995，1957.
- 5) 吉田：京大結研紀要，6：259，昭33.
- 6) 谷脇：結核の研究，第11集，15，昭34.
- 7) 渡辺：呼吸器診療，14：928，昭34.
- 8) 東海林：結核の研究，第9集，昭33.
- 9) 吉村：京大結研紀要，7 (2) 増刊 1：368，昭34.
- 10) 浜口：同誌，7 (3) 増刊 1：313，昭34.
8 (2) 増刊：659，昭34.
- 11) 村田：胸部疾患，3：634，昭34.
- 12) 初鹿：医療，12：596，昭33.
- 13) 板倉：医療，13：472，昭34.
- 14) 山下：京大研究紀要，8 (1) 増刊 2：623，昭35.
- 15) 塩田：日内誌：47 (11)，昭35.