

マウス実験的結核に対する Rifamycin SV と 他抗結核剤の併用効果

東村 純雄・東村 道雄

国立療養所大府荘（荘長 勝沼六郎博士）
名古屋大学医学部第一内科（主任 日比野進教授）

受付 昭和 37 年 11 月 12 日

Rifamycin SV (RM) はイタリアの Sensi など¹⁾により *Streptomyces* から分離された新抗生物質で、試験管内実験で結核菌に有効なことが注目された。Timbal など²⁾、Blasi など³⁾および東村など⁴⁾はマウスおよびモルモットの実験結核に RM の単独投与が有効であることを認め、Monaldi⁵⁾ は人間の結核症に局所注入を行なつて有効であると述べている。RM ははじめ局所刺激作用があることが知られたが、Curci など⁶⁾が polyvinylpyrrolidone に溶解することにより筋注が可能なることを見出してから実用化が促進され、グラム陽性菌感染に対する臨床効果はすでにほぼ確認されている。したがつて向後の問題は結核症の治療に実用できるか否かということのごとく思われる。上述の一連の動物実験の結果^{2)~4)}は一応結核症への実用の可能性を示唆するとともに、RM の in vivo 効果が in vitro 実験から期待されたほどでもないことを示している。もつともイタリアの研究者¹⁾⁷⁾ ははじめ Dubos 培地を用いて INH に匹敵する抗菌力を認めて多大の期待を懐いたのであるが、卵培地を用いたわれわれの成績では in vitro の発育阻止力は INH よりはるかに SM よりも若干劣り、おおよそ KM に匹敵するものであつた。Monaldi⁵⁾ は人体応用の手ごたえから RM の臨床効果は INH, SM に劣ることを予想している。このような状況を考慮すれば、RM の実用化はむしろ他抗結核剤との併用にその重点をおかねばならぬし、またそうするのが抗結核剤使用の常道でもある。われわれが併用効果観察のための動物実験を行なつた理由もまたここにある。

RM と他抗結核剤との併用効果に関するわれわれの in vitro 実験の結果は、RM と他抗結核剤との間に拮抗を認めず、RM と他抗結核剤との併用が可能であることを示した。併用効果は実験条件により相当の影響を受けることは十分考慮しなければならぬが、マウスを用いた今回の動物実験の結果では、1314 Th と RM の間には

「陽性の併用効果」⁸⁾を認めることはできず、むしろ INH, SM または KM との間に「陽性併用効果」（不関性 in difference 以上の効果）を認めた。

実験方法

被検菌 人型結核菌 H₃₇R_v 株を用いた。あらかじめマウスに注射して 6 週後に分離した菌を Löwenstein 変法培地⁹⁾に 4 週培養したのち、ガラス玉と振盪して均一化して生理食塩水に浮遊し、その 0.1 ml をマウス腰部の筋肉内に注射した。

マウス マウスは実験動物中央研究所から購入した CF# 1 系マウス（雄性、体重 17.7 ± 2.64 g）を用いた。しかし一部の実験（RM と 1314 Th 併用）には、当所で飼育した dd-N 系マウスの近交系のもを用いた。

薬剤の投与 実験 A（CF# 1 系マウス使用）では、接種生菌数は 1 匹当たり 1.07×10^8 で、接種の翌日から治療を開始した。マウスは 8 群に分ち、次のごとく薬剤を投与した。薬剤投与は背部皮下に皮下注射する方法によつた。RM はイタリア Lepetit 製で、10% polyvinylpyrrolidone (K-17) に 10% の割合に溶解したのち、さらに 10 倍に薄めて使用した。

- (1) 対照群：生理食塩水 0.2 ml を毎日皮下注射。
- (2) RM 群：RM 1 mg (10 mg/ml × 0.1 ml) を毎日皮下注射。
- (3) INH 群：INH 0.1 mg (1 mg/ml × 0.1 ml) を毎日皮下注射。
- (4) SM 群：dihydrostreptomycin sulfate (SM) 1 mg (10 mg/ml × 0.1 ml) を毎日皮下注射。
- (5) KM 群：kanamycin sulfate (KM) 2 mg (20 mg/ml × 0.1 ml) を毎日皮下注射。
- (6) INH+RM 群：INH 0.1 mg + RM 1 mg を毎日皮下注射。
- (7) SM+RM 群：SM 1 mg + RM 1 mg を毎日皮下注射。

下注射。

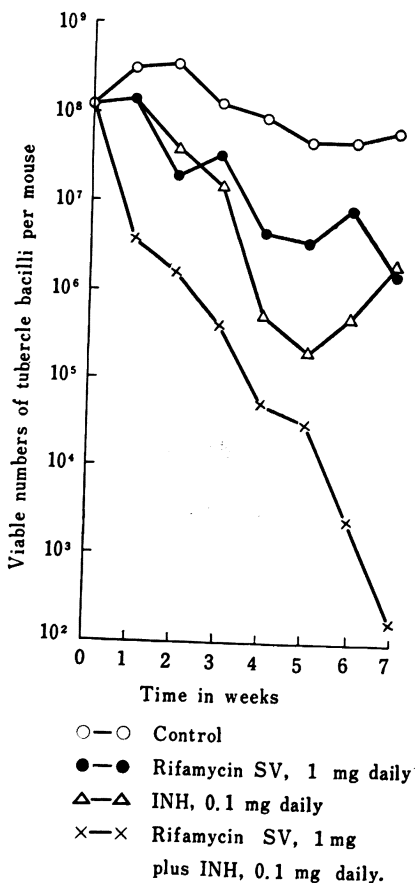
(8) KM+RM 群: KM 2 mg+RM 1 mg を毎日皮下注射。

治療は菌接種後, 7週まで続けた。RM 1 mg の投与はマウス平均体重が 17.7 g であるので, 56.5 mg/kg に相当する。

実験 B (dd-N 系マウス使用) は H₃₇R_v 株の接種生菌数は 2.22×10^8 で次の 4 群に分けて治療した。

- (1) 対照群: 10% propylene glycol 含有生理食塩水 0.1 ml 毎日皮下注射。
- (2) RM 群: RM 1 mg (10 mg/ml × 0.1 ml) を毎日皮下注射。
- (3) 1314 Th 群: α -ethylthioisonicotinamide (1314 Th) 0.1 mg (1 mg/ml × 0.1 ml) を毎日皮下注射。1314 Th はまず 10 mg/ml の割合に propylene glycol に溶解したのち, 生理食塩水で薄めて 1 mg/ml 液とした。

Fig. 1. Effect of Rifamycin SV and Isoniazid Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice (Experiment A)



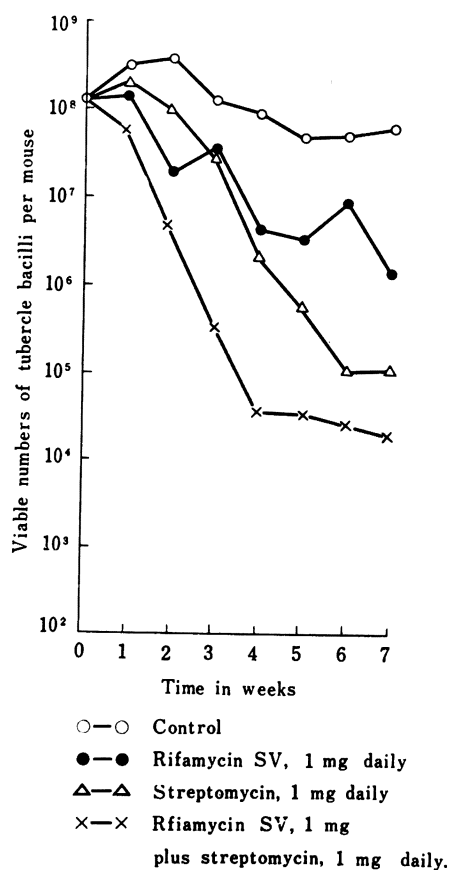
Test organism: *M. tuberculosis* var. *hominis* H₃₇R_v.

(4) RM+1314 Th 群: RM 1 mg+1314 Th 0.1 mg を毎日皮下注射。

薬剤投与は接種翌日に開始し, 6週まで続けた。マウス平均体重は 12.0 ± 3.0 g で雌雄混合である。したがって RM 投与量は 83.4 mg/kg であつた。

治療効果の判定 治療効果は加藤など¹⁰⁾のマウス全身ホモゲナイズ法と東村など^{11)~13)}の渦巻白金耳接種法をコンビにした方法を用いて測定した。すなわち, マウス1匹当りの結核菌生菌単位数の消長をもつて効果判定の指標とした。方法はマウス3匹を秤量したのち, 尾とツメを切り, 身体をハサミで分断した後, ホモゲナイザー(ミキサー)にかけて液状とし, これに体重の10倍量の2% NaOH 液を加えて攪拌したのち10分間放置し, その原液および10倍, 100倍, 1,000倍および10,000倍希釈液を渦巻白金耳で0.02 ml ずつ Löwenstein 変法培地に塗抹接種した。ゴム栓を施して 37°C 3週間培養したのち, 集落数を算定した。マウス1匹当りの生菌数(生菌単位

Fig. 2. Effect of Rifamycin SV and Streptomycin Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice (Experiment A)



Test organism: *M. tuberculosis* var. *hominis* H₃₇R_v.

数)の算定の基礎としては、培地(薬剤なし)上に50にもつとも近い集落数を示す希釈度を用いた。集落数は培地5本の平均値をとった。マウス1匹当りの生菌数は次式により計算される。

$$a \times 50 \times 10 \times 10^n \times (\text{平均体重 } gm)$$

ここにaは集落数、50倍するには接種量0.02 mlを1 mlになおすため、10倍するのは2% NaOH液で10倍希釈したのを修正するため、 10^n 倍するのは希釈度かけたものである。既報¹²⁾のごとく、渦巻白金耳接種法のほうがピペット接種法よりも正確な値を与える。

実験成績ならびに考察

実績成績は図1~4に示した。

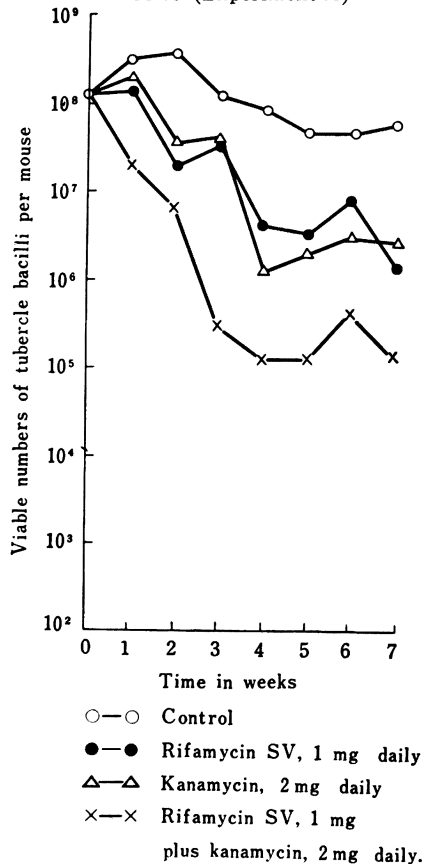
成績はCF#1系マウスを用いた実験A(図1~3)のほうに対照群の「マウス1匹当りの生菌数」の消長もきれいで、よく揃った成績が得られた。なお図1~3には、対照群とRM群の成績は重複して画かれている。

結果はRM 1 mg すなわち RM 約 60 mg/kg の投与

群で、生菌数が持続的に少なく、RMが明らかに有効であることを示した。この投与量を体重50 kgの人間に換算すれば、約3 gに相当する。もちろんマウスの量をそのまま人間に換算するのは無理であるので、要は各抗結核剤間の効果の比較のほうが重要と思われる。この意味では、被検条件で比較したかぎりでは、RMはその1/10量のINHにかなり劣り、同量のSMにもやや劣った。しかし2倍量のKMにはほぼ匹敵した。こうしてみると、RMの臨床適用もかなり有望であるように思われる。しかし、マウスのごとく結核菌に対する生体反応の弱いものと、人間の結核とは同日に論じられないであろうから、ともかく動物実験の結果有効である以上、向後は人体応用の結果をまつほかはない。人体適用にあたっては、抗結核剤適用の原則からも、他の薬剤を当然併用すべきと思われるが、動物実験の結果でも併用のほうが単独よりも有効である。

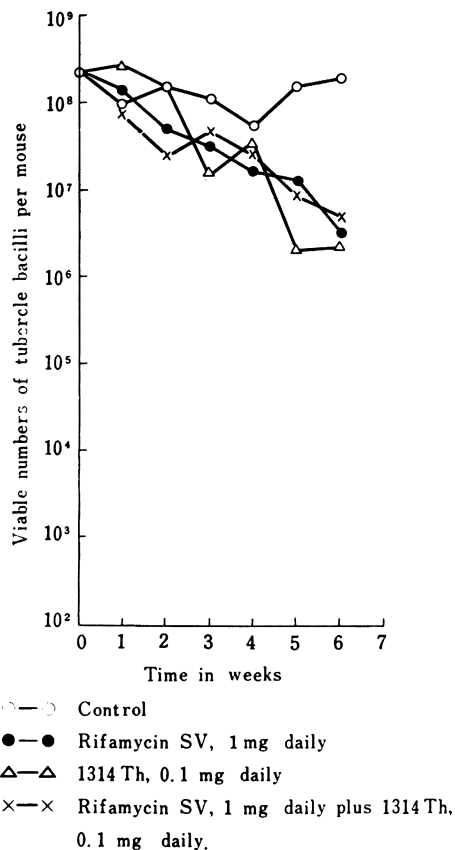
すなわち、図1~3に示すとおり、RMとINH、SMまたはKMとの併用は、RMまたはこれら薬剤の単独

Fig. 3. Effect of Rifamycin SV and Kanamycin Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice (Experiment A)



Test organism: *M. tuberculosis* var. *hominis* H₃₇Rv.
Mice: CF#1 strain.

Fig. 4. Effect of Rifamycin SV and Ethionamide (1314 Th) Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice (Experiment B)



Test organism: *M. tuberculosis* var. *hominis* H₃₇Rv.
Mice: dd-N strain.

使用よりも有効であつた。とくに INH と RM との併用の成績がとくにすぐれていることは注目に値する。

一方、1314 Th と RM との使用は、in vitro 実験の結果からは、その併用による効果増大が期待されたのであるが⁴⁾、実際に動物実験で得られた結果はあまり芳しいものではなかつた(図4)。ただし、この動物実験には 1314 Th 溶解のための propylene glycol が注射されているので、これがマウスの生体作用になんらかの毒作用を示すために併用効果が出ない可能性も一応考えられるし、またこの実験は dd-N 系の近交系を用いたためか、対照の生菌数消長もやや不規則であるので、なおさらに検討の余地があるようにも思われる。

以上の結果から、RM は INH、SM または KM などの既知抗結核剤と併用して有効と思われるので、臨床実験もむしろ併用療法に重点をおくほうがよいと思われる。また in vitro 実験の結果から、RM 耐性の出現は速やかであると推定されるので⁴⁾、耐性防止の意味でも有力な抗結核剤との併用が必要であらうと思われる。

結 論

マウス (CF#1 系、体重 17.7 ± 2.64 g) に人型結核菌 H₃₇R_v 株を接種し、マウス全身ホモゲナイズ法でマウス 1 匹当たりの生菌数の消長を算定することにより、RM 単独、INH 単独、SM 単独または KM 単独の場合と、RM + INH、RM + SM、RM + KM などの併用の場合の治療効果を比較した。

その結果は、被検条件では、RM (Rifamycin SV) 単独 1 mg 毎日の注射 (約 60 mg/kg) で実験結核に有効であることが観察された。被検条件では、RM はその 1/10 量の INH および同量の SM に劣つたが、2 倍量の KM にほぼ匹敵した。

RM と INH、SM または KM の併用は、いずれの単独投与よりも有効で、とくに RM と INH の併用はもつとも有効であつた。RM と 1314 Th の併用は試験

管内実験から期待されたごとくには有効でなかつた。RM と INH、SM または KM の併用は一応臨床実験を試みる価値があるように思われる。

ご指導を受けた国立療養所大府荘長勝沼六郎荘長ならびに名古屋大学医学部日比野進教授に謝意を表す。また国立療養所研究室外山春雄、水野新、岡田金男の諸氏のご協力を謝する。また本研究には藤沢薬品株式会社学術部から一部材料の提供を受けた。ここに謝意を表する。

Reference

- 1) Sensi, P., Margalith, P. & Timbal, M. T.: *Il Farmaco*, 14: 146, 1959.
- 2) Timbal, M. T. & Brega, A.: *Il Farmaco*, 16: 191, 1961.
- 3) Blasi, A., Curci, G. & Ninni, A.: *Arch. Tisiol.*, 16: 1124, 1961.
- 4) Tsukamura, M. & Tsukamura, S.: *J. Antibiotics*, Ser. A. in press.
- 5) Monaldi, V.: *Arch. Tisiol.*, 16: 1013, 1961.
- 6) Curci, G. & Ninni, A.: *Arch. Tisiol.*, 16: 1079, 1961.
- 7) Nitti, V., Virgilio, R. & Ninni, A.: *Arch. Tisiol.*, 16: 1023, 1961.
- 8) Tsukamura, M.: *Jap. J. Clin. Tuberc.*, 18: 170, 1959.
- 9) Tsukamura, M.: *Kekkaku*, 37: 278, 1962.
- 10) Kato, M., Miki, K. & Matsunaga, K.: *Kekkaku*, 30: 638, 1955.
- 11) Tsukamura, M. & Noda, Y.: *Kekkaku*, 32: 639, 1957.
- 12) Tsukamura, M., Noda, Y. & Nakamura, E.: *Kekkaku*, 33: 43, 1958.
- 13) Tsukamura, M.: *Kekkaku*, 35: 397, 1960.

In Vivo Combined Effect of Rifamycin SV with Other Antituberculous Agents on Experimental Tuberculosis in Mice

Rifamycin SV is a new antibiotic discovered by Sensi et al.¹⁾ in Italy. Its in vivo antituberculous activity was reported previously by Timbal et al.²⁾, Blasi et al.³⁾ and Tsukamura et al.⁴⁾ in mice and guinea pigs, and Monaldi⁵⁾ stated on the therapeutic effect of Rifamycin by local administration. The purpose of this study is to deal with the combined effect of this antibiotic with the known antituberculous agents, isoniazid, streptomycin, kanamycin and

alpha-ethylthioisonicotinamide (1314 Th) in experimental tuberculosis in mice and to make further observations on the therapeutic effect of the antibiotic at a relatively low concentration.

Methods

Mycobacterium tuberculosis var. *hominis* H₃₇R_v was used throughout the study. The test organism grown on a modified Löwenstein medium⁹⁾ was homogenized by shaking with glass beads, suspended in saline and inoculated into the waist of mice intramuscularly. Mice used were the CF#1-strain mice supplied by the Central Institute for Experi-

mental Animals, Tokyo (Experiment A). In some experiments (Experiment B), however, dd-N strain-mice were used.

Administration of antituberculous agents was begun on the next day of inoculation. Rifamycin SV supplied by the Lepetit, Milan, Italy, was dissolved in polyvinylpyrrolidone solution (10%) and injected subcutaneously. Other antituberculous agents also were administered subcutaneously. Method of administration was as follows:

Experiment A (Test organism: *M. tuberculosis* var. *hominis* H₃₇R_v; CF# 1 mice)

- (1) Control group; saline 0.2 ml daily subcutaneously;
- (2) Rifamycin group; Rifamycin SV 1 mg daily;
- (3) Isoniazid group; Isoniazid 0.1 mg daily;
- (4) Streptomycin group; Streptomycin 1 mg daily;
- (5) Kanamycin group; Kanamycin 2 mg daily;
- (6) Rifamycin+Isoniazid group; Rifamycin SV 1 mg daily plus isoniazid 0.1 mg daily;
- (7) Rifamycin+Streptomycin group; Rifamycin 1 mg daily plus streptomycin 1 mg daily;
- (8) Rifamycin+Kanamycin group; Rifamycin SV 1 mg daily plus kanamycin 2 mg daily.

Experiment B (Test organism: *M. tuberculosis* var. *hominis* H₃₇R_v; dd-N mice)

- (1) Control group; Saline 0.1 ml daily;
- (2) Rifamycin group; Rifamycin SV 1 mg daily;
- (3) 1314 Th group; 1314 Th 0.1 mg daily;
- (4) Rifamycin+1314 Th group; Rifamycin 1 mg daily plus 1314 Th 0.1 mg daily.

Therapeutic effect of the treatment was followed up by the whole body-homogenizing method of mice according to Kato et al.¹⁰ The method consisted of enumerating the viable number of tubercle bacilli per mouse. The number of tubercle bacilli was expressed usually as an average in three mice. Mice were homogenized by a Waring blender and the resulting fluid was added with 10 volumes of 2% NaOH and allowed to stand for 10 minutes. The fluid was then diluted with saline. The original fluid, which was diluted ten times by 2% NaOH, and its 10-fold dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁴) were used for inoculation to medium. One-fiftieth ml samples of these dilutions were inoculated to the modified Löwenstein medium with a spiral loop¹¹⁻¹³ and the tubes inoculated were incubated at 37°C for three weeks. The viable number of tubercle bacilli contained in one mouse was calculated utilizing the

dilutions, in which the number of colonies in a control medium containing no drug was the nearest to fifty, as the basis of calculation. The number of colonies was calculated as an average of five tubes. The viable number of tubercle bacilli per mouse was calculated by the following equation: $a \times 50 \times 10 \times 10^n \times$ (average body weight of mice in gm). Here, "a" is the number of colonies; fifty was multiplied to make the 0.02 ml-inoculum size into one ml; ten was multiplied to make up for the ten-times dilution with 2% NaOH, and 10ⁿ means 10⁻ⁿ-dilution of the mice fluid.

Results and Discussion

The results obtained are shown in figures 1 to 4.

Under the conditions tested, in which the organism inoculated multiplied slowly, a relatively low concentration of Rifamycin SV, 1 mg daily=about 60 mg/kg, exhibited a recognizable effect, although a care should be taken for that this effect was observed in mice, in which vital reaction to tubercle bacilli would be weaker than in human being. Under the conditions tested, Rifamycin SV was almost as effective as a two-times amount of kanamycin and a one-tenth amount of 1314 Th. However, it was less effective than the same amount of streptomycin or a one-tenth amount of isoniazid.

Combined effect of Rifamycin SV with isoniazid, streptomycin or kanamycin was more effective than any single administration among these agents. Combined effect of the antibiotic with 1314 Th was not so effective as expected from the in vitro experiment⁴). Considering the side effect of this antibiotic, which is expected to appear when administered for a long time, it appears that the combined use of Rifamycin with isoniazid, streptomycin or kanamycin may be rather hopeful than the single use of the antibiotic.

Summary

In vivo combined effect of Rifamycin SV with isoniazid, streptomycin, kanamycin and 1314 Th was observed in experimental tuberculosis in mice by the whole body-homogenizing method. The results obtained showed that the combined use of Rifamycin and isoniazid, streptomycin or kanamycin was more effective than any single use of these agents. Among them, the combined use of Rifamycin with isoniazid was the most effective under the conditions tested. The combined use of Rifamycin with

1314, It was not so much effective as expected from the in vitro experiment.

(The authors wish to express their appreciation to Dr. F.M. Chiancone, Lepetit, for his kind supply

of Rifamycin SV and to Dr. G. Curci and Dr. V. Nitti, Tuberculosis Institute of Naples University, for their kind suggestions to this work.)