

Dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol の抗結核作用

第2報 Ethambutol と Isoniazid の併用効果

森 山 英 五 郎

熊本大学医学部第一内科学教室 (指導 河盛勇造教授)

受付 昭和 39 年 2 月 3 日

ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF DEXTRO-2,2'-(ETHYLENE-DIIMINO)-DI-1-BUTANOL (ETHAMBUTOL) (II)

Eigorō MORIYAMA*

(Received for publication February 3, 1964)

This paper is concerned with the antituberculous activity of ethambutol combined with isoniazid against the original susceptible strain and isoniazid resistant strains by the *in vitro* and *in vivo* experiments.

1) The H37Rv strain of human type tubercle bacilli was inoculated in Kirchner's semi-solid agar media containing ethambutol and isoniazid in graded concentrations and inhibition of the growth was determined after incubation of three weeks. No enhancement of antituberculous activity of the former drug was observed on addition of the latter.

The isoniazid-resistant variant of H37Rv strain and three strains freshly isolated from sputa of tuberculosis patients were tested in Dubos' liquid media for the influence of isoniazid on the *in vitro* growth inhibiting effect of ethambutol. The results were the same as in the experiment above mentioned.

2) Albino dd/y male mice weighing approximately 20 mg were used in the *in vivo* experiments. The animals were infected intravenously with H37Rv strain, and divided into four groups. Three groups were subcutaneously injected 2 mg of ethambutol, 0.02 mg of isoniazid and 1 mg of ethambutol plus 0.01 mg of isoniazid respectively, and the last group, the control, was untreated. The treatment were started from the next day of the infection and continued for twenty-one days. All animals were sacrificed two day after the last treatment, and the therapeutic effects were evaluated by comparison of the viable units of tubercle bacilli cultivated from the lungs and spleens of the animals.

The enhancement of antituberculous activity was demonstrated in the combined use of the drugs, where tubercle bacilli were cultivated to the least extent from the animals of the group of this treatment. The experiment with a single or combined use of 1 mg of ethambutol and 0.01 mg of isoniazid was carried out, showing the superiority of the combined treatment as in the former experiment.

Subsequently, the groups of mice were infected with the isoniazid-resistant variant of H37Rv and treated with ethambutol and isoniazid as in the experiment with the sensitive strain. No effect of isoniazid therapy was found in those animals, but the addition of isoniazid to ethambutol did suppress more significantly the culturable units of tubercle bacilli in organs of the animals.

* From 1st Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kumamoto University, Honjo-machi, Kumamoto-city, Japan.

than in those treated with ethambutol alone. The experiment was further conducted with the mice infected with two other isoniazid-resistant strains freshly isolated from tuberculosis patients yielding the same results.

緒 言

前報¹⁾で Dextro-2, 2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol (Ethambutol, 以下 EB と略) が教室保存の人型結核菌株および肺結核患者より分離した既存の薬剤に種々の耐性度を有するものを含む菌株に対し、交叉耐性を示さず、その大量菌接種での抗菌力は小川培地で 1~5 mcg/ml の最小発育阻止濃度を示し、マウス実験的結核症に対しても EB 1 mg/mouse/day が isoniazid (以下 INH と略) 0.02 mg/mouse/day に匹敵する治療効果を示し、また恒量継代および増量継代によつても容易に高濃度耐性菌を分離出来にくい成績を報告した。このように EB は第一級の抗結核薬としての期待はできないと思うが、しかしこれを他種抗結核剤と併用した場合は抗結核菌作用を増強する可能性があると考え、EB と他種抗結核剤の併用実験を計画した。その一部である PAS, Ethionamide, Streptomycin, Kanamycin との試験管内併用実験は前報に報告したごとく、著明な協力作用を認めえず、また拮抗作用も示さなかつた。

本報告では EB と INH の併用が INH 感性菌および INH 耐性菌に対して、試験管内実験およびマウス実験的結核症の治療実験で、結核菌の発育に対していかなる影響を与えるかを検討した成績を示すこととした。

実験材料および方法

試験管内実験： 使用した結核菌株、培地および培養条件は前報と同様に行なつたので詳述を避け、概要を実験成績の項に記載した。

動物実験： 体重 20 g 前後の雄性 dd 系マウスを用い、接種菌として INH 感性菌 H₃₇Rv 株、INH 耐性菌として H₃₇RvR-INH 株、当教室で分離した患者由来の太田株 (INH 100, PAS 1, KM 100 mcg/ml 完全耐性) と馬場株 (INH 10 mcg/ml 完全耐性) を用いた。これらを 1% 小川培地で培養し、20日目ごろの発育良好な菌苔を掻き取り、ガラス玉入り丸コルベンで手振法により蒸溜水浮游菌液ほぼ 1~5 mg/ml を作り、10 倍稀釈しその 0.1 ml をマウス尾静脈内に接種した。感染マウスを EB・INH 併用治療群、EB 単独治療群、INH 単独治療群および無治療対照の 4 群に分ち、感染翌日より所定の薬剤量を 0.1 ml の蒸溜水に溶かし、マウス大腿部皮下注射によつて治療を開始した。治療終了後翌々日に屠殺し、肺および脾の全臓器を乳鉢で磨碎し 1% NaOH 液を加

えて 100 mg/ml の乳剤を作り、蒸溜水で 10 倍階段稀釈により 1% 小川培地に接種した。37°C に 4 週間培養後、発育した集落数から臓器 10mg 中の生菌数を算定して治療効果を比較検討した。

感染菌数、薬剤投与量および治療期間は各実験によつて異なるので、それぞれの実験成績の項に記載した。

実験成績

I. INH 感性菌に対する併用効果

実験 1. H₃₇Rv 株の試験管内発育に及ぼす併用効果
10% 馬血清加 Kirchner 半流動寒天培地を用い、EB および INH を種々な濃度に含有する培地 5 ml 宛に H₃₇Rv 株の 10⁻¹ mg の大量菌を接種し、37°C に 3 週間静置培養後判定した。成績は表 1 に示すごとく、発育阻止力について著明な協力作用を示さなかつたが、EB 5 mcg/ml と INH 0.05 mcg/ml 併用および EB 2.5 mcg/ml と INH 0.1 mcg/ml 併用が各単独の場合では発育を示したのに比べて発育を阻止することが認められた。

Table 1. Growth Inhibitory Effect of EB Combined with INH against H₃₇Rv Strain in Kirchner's Semi-Solid Agar Media

EB conc. mcg/ml	INH concentration mcg/ml				
	0	0.01	0.05	0.1	0.5
0	卅	卅	卅	20	—
0.625	卅	卅	卅	15	—
1.25	卅	卅	卅	12	—
2.5	卅	卅	卅	—	—
5	卅	卅	17	—	—

Notes: Degree of growth was expressed as following symbols:

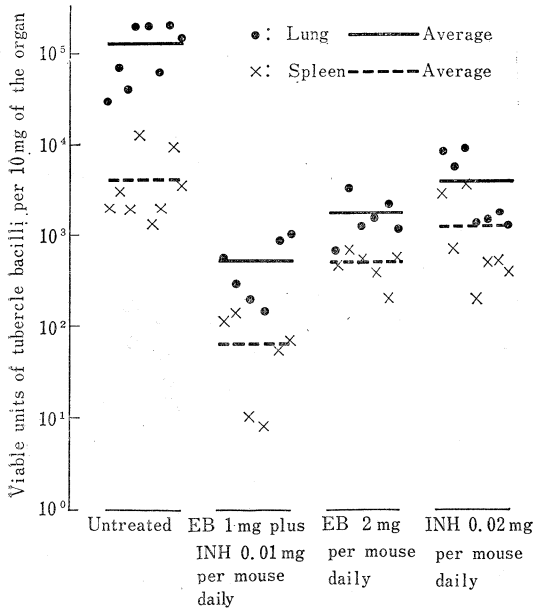
卅: Moderately confluent growth.
#: Innumerable distinct colonies.
+: Over 100 colonies.

Number: The average number of counted colonies.
Reading of growth was made at the end of 3 weeks.

実験 2. H₃₇Rv 株感染マウス実験的結核症に対する併用治療効果

1) 感染菌量は 66×10³ v. u.。 1 日 1 回の薬剤投与量は EB 単独治療群で 2 mg, INH 単独治療群で 0.02 mg, 併用治療群では EB 1 mg・INH 0.01 mg として、21 日間治療した。成績は図 1 に示すごとく、各治療群とも無治療対照群の臓器内生菌数 (平均値 肺: 123, 333 v. u., 脾: 4, 250 v. u.) より少なく、とくに併用治療群の臓器

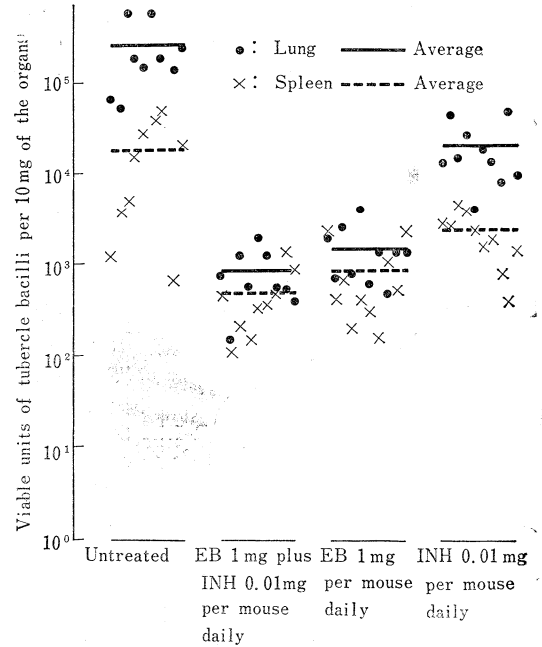
Fig. 1. Effect of EB and INH Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice Infected Intravenously with H₃₇Rv Strain



内生菌数 (平均値 肺: 525v. u., 脾: 68.6v. u.) は EB 単独治療群 (平均値 肺: 1,733v. u., 脾: 500v. u.) および INH 単独治療群 (平均値 肺: 4,130v. u., 脾: 1,300v. u.) よりそれぞれ 1/2 の薬剤投与量にかかわらず明らかに少数にとどまつた。

2) 1) の実験を確認するため同様の実験を繰り返した。感染菌量は 8×10³ v. u.。治療期間は 16日。薬剤投与量は各単独および併用治療群ともに, 1日1回宛 EB は 1mg, INH は 0.01 mg とした。成績は図 2 に示した。EB 単独治療群の臓器内生菌数 (平均値 肺: 1,455 v. u., 脾: 763 v. u.) および INH 単独治療群のそれ (平均値肺: 18,360 v. u., 脾: 2,100 v. u.) は対照群 (平均値肺: 232,777 v. u., 脾: 16,705 v. u.) より明らかに少なく, 併用治療群 (平均値 肺: 783 v. u., 脾:

Fig. 2. Effect of EB and INH Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice Infected Intravenously with H₃₇Rv Strain



477 v. u.) ではさらに各単独治療群よりも少値であつた。すなわち, マウス実験的結核症に対して, EB と INH の併用は明らかに治療効果の増強を示した。

II. INH 耐性菌に対する併用効果

実験 1. INH 耐性菌の試験管内発育に及ぼす併用効果

Dubos 液体培地に馴化培養した発育良好な H₃₇Rv R-INH 株, 当教室で分離した患者由来の坂城株 (INH 50, SM 10, PAS 10 mcg/ml 完全耐性), 吉本株 (INH 25, PAS 10, SM 10, KM 100, TH 10 mcg/ml 完全耐性) および太田株 (前記) の各 INH 耐性株の大量菌 (濁度判定ほぼ 5 mg/ml の 0.1 ml) を各薬剤含有 Dubos 液体培地に接種し, 37°C で 1日1回振盪して 2週間培養後

Table 2. Growth Inhibitory Effect of EB Combined with INH against INH-Resistant Strains in Dubos' Liquid Media

EB conc. mcg/ml	INH conc. mcg/ml	H ₃₇ Rv R-INH					Sakaki					Yosimoto					Ōta				
		0	12.5	25	50	100	0	12.5	25	50	100	0	12.5	25	50	100	0	12.5	25	50	100
0		卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
0.1		卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
0.2		卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
0.4		卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
0.8		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	+	-

Note: Degree of growth was expressed as following symbols:
 卍: Dense turbid 卍: Moderately turbid +: Slightly turbid
 Reading was made after 2 weeks by naked eye.

濁度により発育状況を肉眼判定した。成績は表 2 に示したが、INH 耐性株に対して EB と INH 併用による発育阻止力の増強はみられなかつた。しかし H₃₇Rv R-INH 株と太田株については EB 0.8 mcg/ml・INH 100 mcg/ml 両者含有培地で発育の阻止が認められた。そこで濁度判定の欠点を補う目的で H₃₇Rv R-INH 株について、同様に繰り返し実験を行ない、濁度により肉眼判定したのち、その菌液 0.1 ml を 1% 小川培地に接種し recovery test を行なつた。成績は表 3 に示すごとく、Dubos 液体培地の濁度による判定では EB 0.5 mcg/ml で発育阻止を示していたが、1% 小川培地への recovery test では、EB 1 mcg/ml 含有培地中にも INH 濃度に関せずいずれも少数ながら生菌が含まれていることを認め、併用による殺菌作用もうかがわれなかつた。すなわち、いずれの判定によつても INH と EB との併用効果を試験管内で証明しえなかつた。

Table 3. Growth of H₃₇Rv R-INH Strain which was Incubated in Dubos' Liquid Media Containing EB and INH for 2 Weeks

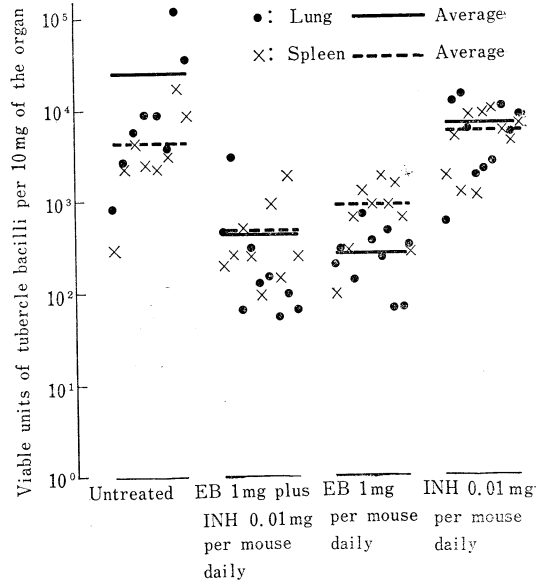
EB conc. mcg/ml	INH conc. mcg/ml				
	0	6.25	12.5	25	50
0	卅	卅	卅	卅	+
	卅	卅	+	+	+
0.25	卅	卅	卅	卅	+
	卅	+	+	+	90
0.5	—	—	—	—	—
	98	86	75	80	36
1	—	—	—	—	—
	5	6	4	7	3

Note: Upper columns express the grade of growth in Dubos' liquid media. Lower columns express the grade of growth on Ogawa's egg media.

実験 2. INH 耐性菌感染マウス実験的結核症に対する併用治療効果

1) 感染菌に H₃₇Rv R-INH 株を用い、その接種菌量は 2×10⁸ v.u. で、17 日間治療した。薬剤投与量 (1 日 1 回) は併用治療群および各単独治療群ともに EB は 1 mg, INH は 0.01 mg とした。成績は図 3 に示した。もちろん感染菌は INH 耐性株であるので、INH 単独治療群の臓器内生菌数 (平均値 肺: 6,330 v.u., 脾: 5,465 v.u.) は無治療対照群のそれ (平均値 肺: 23,106 v.u., 脾: 4,331 v.u.) と有意の差を認めず、EB 単独投与群では臓器内生菌数 (平均値 肺: 285 v.u., 脾: 865 v.u.) が少なく、EB・INH 併用治療群の臓器内生菌

Fig. 3. Effect of EB and INH Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice Infected Intravenously with H₃₇Rv R-INH Strain

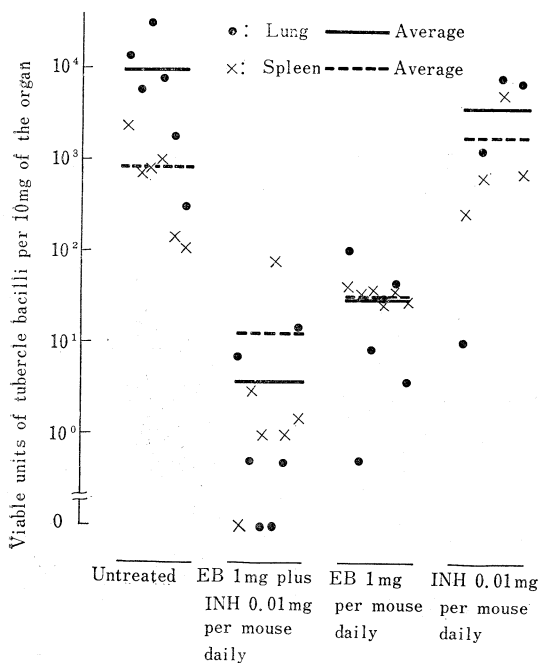


数は肺においては平均値 478 v.u. で EB 単独群より高値であつたが、脾では 499 v.u. で著しく少なかつた。なお肺の菌数も 1 匹のみ著しく多数に認められたための平均値の上昇となり、これを除くと平均値 163 v.u. となつて、すべて EB 単独より少数であつた。

2) 1) の成績を確認するために肺結核患者より分離した INH 耐性菌の太田株と馬場株を用いて実験した。感染菌量は太田株 950 v.u., 馬場株 480 v.u.。治療期間はともに 21 日。薬剤投与量は 1) と同様、EB 1 mg, INH 0.01 mg とした。成績は図 4, 5 に示した。各臓器内生菌数の平均値は太田株感染群にては無治療対照群の肺 9,680 v.u., 脾 824 v.u., 併用治療群の肺 3.8 v.u., 脾 13.4 v.u., EB 単独治療群の肺 31.6 v.u., 脾 32.6 v.u., INH 単独治療群の肺 3,777 v.u., 脾 1,650 v.u., であり、馬場株感染群では無治療対照群の肺 4,025 v.u., 脾 547 v.u., 併用群の肺 1.5 v.u., 脾 5.3 v.u., EB 単独群の肺 16 v.u., 脾 16.1 v.u., INH 単独群の肺 2,170 v.u., 脾 450 v.u. であり、ともに 1) の成績と同様 INH 単独治療群の臓器内生菌数が無治療対照群のそれと同等であつたのに、EB 投与群のそれは少なく、さらに EB・INH 併用治療群では EB 単独治療群のそれより明らかに少値であつた。

すなわち、INH 耐性菌感染マウスを EB で治療した場合、すでに耐性である INH の併用によつて EB の効果を増強する成績を確かめえた。

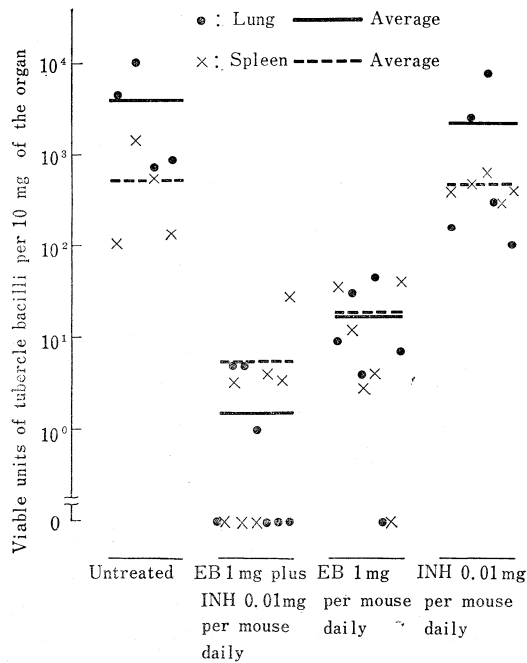
Fig. 4. Effect of EB and INH Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice Infected Intravenously with Ota Strain



考 察

伊藤ら²⁾も試験管内実験では INH 感性菌 H₃₇Rv 株に対する EB と INH の併用効果について Dubos 半流動寒天培地を用いて検討し、著明な協力作用を認めなかつたと報告している。私の Kirchner 半流動寒天培地を用いた実験でも同様に H₃₇Rv 株に対して著明な協力作用を認めなかつた。しかし動物実験では Karlson³⁾が H₃₇Rv 株を感染したモルモットの進展結核症に対する EB と INH の併用効果を主として剖検所見および組織学的所見について検討し、EB 25mg と INH 0.2mg 併用治療群が各単独治療群および EB 50mg 単独治療群よりもすぐれた治療効果を示し、EB 100mg 単独治療群に匹敵したと報告した。私はマウス実験の結核症に対する EB と INH 併用効果を、感染翌日より治療し臓器内より分離する菌数の比較によつて検討した結果、INH 感性菌感染に対しては、各単独治療群よりもすぐれた治療効果を認めた。また INH 耐性菌に対しては、EB と INH の併用が試験管内ではほとんど協力作用を示さなかつたにもかかわらず、INH 耐性菌感染マウスに感染翌日より併用投与すると、EB 単独治療群より明らかに臓器内生菌数の減少を示したことは注目に値する。この実験は菌株を変えて3回繰り返したが、いずれも同様の結果を認めた。このような試験管内実験と動物実験の相違については、金井⁴⁾、小関⁵⁾、賀来⁶⁾らが Isoxyl の抗結核作用を検討し、

Fig. 5. Effect of EB and INH Used Singly or in Combination on Experimental Tuberculosis in Mice Infected Intravenously with Baba Strain



Isoxyl の試験管内抗菌力が弱かつたにもかかわらず、マウス結核症に対し感染直後より治療を行ない、延命効果に著明な有効性を示したが、モルモット進展結核症に対しては有効性を示さなかつた実験成績の報告がある。すなわち、かかる同一目的で行なつた実験成績が現在、routine に行なつている実験方法によつて異なつた結論を得ることは重要な意味を有するもので、今後さらに検討されねばならない。

本実験でもつとも興味深い成績であつた INH 耐性菌感染マウスの臓器内生菌数の減少が、EB 単独治療群よりも、EB と INH 併用治療群に強く認められたことは一体何を示唆するものであるうか。薬剤の抗菌作用は菌の増殖時期にもつとも強く作用し、発育静止菌には作用しにくいことは周知のことであるが、たとえば SM 存在下ではじめて他種薬剤の作用を受ける SM 依存株⁷⁾のように、INH 耐性菌にもかかる INH 依存性があるのであろうか。おそらく、諸家の報告もなく、試験管内実験成績からは否定される。また、耐性菌は感性菌よりも他種抗結核剤の発育抑制作用を受けるといふ Hypersusceptibility⁸⁾で説明できるだろうか。やはり試験管内実験成績よりみて妥当性に乏しい。しかし本実験で行なつた試験管内実験については今後さらに追求を重ねる必要があり、INH 耐性機構に関して、INH 耐性菌ではまず細胞質膜の INH に対する透過性が低下し、細胞質内に INH が入りやすく、したがつて代謝系の阻害が起らないと

推定している報告⁹⁾¹⁰⁾もあり、また INH 耐性菌に対して Penicillin と INH を併用すると協同作用が認められ、これは Penicillin が cell wall の生合成を阻害することによつて細胞壁の脆弱化をきたし、INH が菌体に作用しやすくなつたのではないかと想定している報告¹¹⁾もあり、EB の作用機作についてさらに検討を加える必要を痛感する。また菌と薬剤だけの相関因子のほか、宿主たるマウスの生体内因子が大きな役割を果たしているのではなからうかとも考えられるが、要するに EB の菌に対する作用機作の解明にまたねばならないだろう。その解明については今後さらに用いた実験方法の再検討およびかかる事象について追求されねばならないものとする。

結 論

EB と INH の併用が試験管内における結核菌の発育とマウス実験的結核症の臓器内生菌数に及ぼす影響を検討して次の成績を得た。

1) INH 感性菌に対して、試験管内では著明な協力作用を示さなかつたが、INH 感性菌感染マウス実験的結核症に対しては明らかな併用治療効果を示した。

2) INH 耐性菌に対して、試験管内ではほとんど協力作用を示さなかつたが、INH 耐性菌感染マウス実験的結核症に対しては明らかな併用効果を示した。

稿を終わるに臨み、終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜わり、御校閲いただいた恩師河盛勇造教授に心から深謝の意を表します。

本論文の一部の要旨は、第 15 回日本結核病学会九州地方会総会において発表した。

文 献

- 1) 森山英五郎：結核，39：155，1964.
- 2) 伊藤文雄・青木隆一・立花暉夫・高橋洋一：日本胸部臨床，22：36，1963.
- 3) Karlson, A. G.: Am. Rev. Resp. Dis., 86：459, 1962.
- 4) 金井興美・岡本茂広・室橋豊穂：結核，38：470, 1963.
- 5) 小関勇一・賀来隆二：結核，38：62，1963.
- 6) 賀来隆二：結核，38：67，1963.
- 7) 金井興美：結核，38 (3) (臨時増刊号)：97，1963.
- 8) 河盛勇造：結核研究の進歩，14：23，1956.
- 9) 江田亨：結核，38：37，1963.
- 10) 江田亨：結核，38：395，1963.
- 11) 高部勝衛・坂口喜兵衛・守山隆章：結核，37：495, 1962.