

Ebutol を含む化学療法時血清の総合抗菌力

岡本 亨 吉・照 沼 毅 陽

国立療養所村松晴嵐荘（荘長 加納保之）

受付 昭和 40 年 7 月 15 日

ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF SERUM FROM PATIENT UNDER
CHEMOTHERAPY INCLUDING 2,2'-(ETHYLENEDIIMINO)
-DI-1-BUTANOL (EBUTOL)*

Kokichi OKAMOTO and Kiyo TERUNUMA

(Received for publication July 16, 1965)

Introduction

The authors have reported on the antimycobacterial activity of serum from patient under chemotherapy which was demonstrated by an agar culture of tubercle bacilli with superposition of the serum.

The present paper is to report on the antimycobacterial activity of serum from patient under chemotherapy including 2,2'-(ethylenediimino)-di-1-Butanol in comparison with SM, PAS, INH, CS and TH.

Materials and Methods

Superposition of serum upon the Dubos agar culture in the test tube inhibited the tubercle bacilli to grow in the top layer of the agar plug. The bacilli grew at a certain depth and formed colonial disc according to the antimycobacterial activity of the serum. That the amount of the inoculum is one of the critical factors in influencing the size of the inhibitory zone has been reported by us elsewhere.

1. Minimum inhibitory concentration of Ebutol

Serial dilutions of Eb (1.25 r per ml-20 r per ml) were tested in comparison with SM. 1 ml of each solution was superposed on a culture with the same amount of inoculum.

2. Chemotherapy was ceased 24 hrs before the administration of the test drugs. Serum was collected 2 to 3 hrs after the administration of the test drugs: Eb 500 mg, Eb 1.0 g, Eb 500 mg+INH 200 mg, Eb 500 mg+PAS 10/3 g, Eb 500 mg+TH 300 mg, Eb 500 mg+CS 250 mg.

Results

1. MIC of Ebutol

2.5 r, 3 r and 5 r per ml of Eb produced minimum inhibition in different experiments. In these experiments, the amount of the inoculum was considered to be different.

2.5 r per ml of Eb produced an equal inhibition as 1.25 r per ml of SM in an experiment, that is to say, in the cultures of the same lot.

2. Serum antimycobacterial activity

Sera 2 hrs after the administration of 500 mg or 1.0 g of Eb did not inhibit the cultures. The MIC of Eb was 2.5 r per ml against the cultures of the same lot.

Sera 3 hrs after administration of Eb in combination with other agents produced various inhibitory zones, each size of which was considered to be comparable to that expected for each agent alone.

* From National Sanatorium Muramatsu Seiranso, Tokai-mura, Ibaraki-ken, Japan.

In an experiment with a smaller amount of inoculum, sera 2 hrs after administration of 1.5 g of Eb inhibited the cultures by their 2 fold and 4 fold dilutions.

Summary

It is evident that the amount of inoculum is one of the critical factors in comparing the minimum inhibitory concentration of antituberculous agents by means of superposition method.

2.5 r per ml of Eb is equal to 1.25 r per ml of SM in producing inhibitory zone in a Dubos-agar culture of tubercle bacilli.

Antimycobacterial activity of serum from patient who was treated with 500 mg or 1.0 g of Eb alone was undetectable.

500 mg of Eb does not seem to affect the antimycobacterial activity of INH, PAS, TH, or CS which was administered in combination with it.

In an experiment with a smaller amount of inoculum, sera from patients treated with 1.5 g of Eb were found to inhibit the cultures to some extent.

緒言

研究材料および方法

著者らは、結核菌の寒天高層混積培養上に抗結核剤溶液または結核化学療法時患者の血清を重層して培養を続けるときに生ずる発育阻止帯を観察して、薬剤や血清の抗菌力を検討してきた^{1)~5)}。

今回は、Dextro-2, 2'-(ethylenediimino)-Di-1-Butanol (Ebutol) を入手して、これを中心とした化学療法時血清の抗菌力を同様に検討したので報告する。

ちなみに、化学療法剤の評価にあたり、いずれの薬剤についても、試験管内抗菌力とその血中濃度が検討せられるのが常であるけれども、結核菌に対する血清の抗菌力を直接的に測定した報告は少なかった。

今日、結核化学療法剤の開発が著しく、主として菌の薬剤耐性化防止の目的で、併用療法が広く行なわれる。したがって薬剤の協力、拮抗の関係はいつそう重要な問題となつている。この問題に関しても、試験管内協力、拮抗の関係は一般に検討せられるけれども、血清のレベルでの検討は少ない。

著者らは、1958 年以来、結核菌の寒天高層混積培養を固形培地の表面培養や液体培地の深部培養と比較研究中^{6)~8)} 頭書の方法を考案して¹⁾、化学療法時血清の抗菌力の検討に応用した。

その後、1963 年に Kass ら⁹⁾ の SSAAT が紹介されて以来、著者らの方法は、これと比較することができると考えている。

2, 2'-(ethylenediimino)-Di-1-Butanol の抗結核作用は、1961 年その開発者らの発表¹⁰⁾ 以来、すでに多くの報告¹¹⁾¹²⁾¹³⁾ があり、わが国でも、関係方面の研究¹⁴⁾ は、その優れた効力を報告しているのであるけれども、著者らもまた上記の主旨により、その成績を報告する。

(概要) : Dubos 液体培地の 2 倍の濃度の液で菌液を作り、Widal 試験管に 2 ml ずつ分注する。別に滅菌して用意してある 0.5% 寒天を溶解して、約 50°C に冷却して、その 2 ml を、分注してある菌液に混じて、冷水中で凝固せしめる。この寒天柱のうえに薬剤溶液または血清を 1.0 ml 重層して、37°C で培養する。5~7 日ころから現われる発育阻止帯を計測比較する。

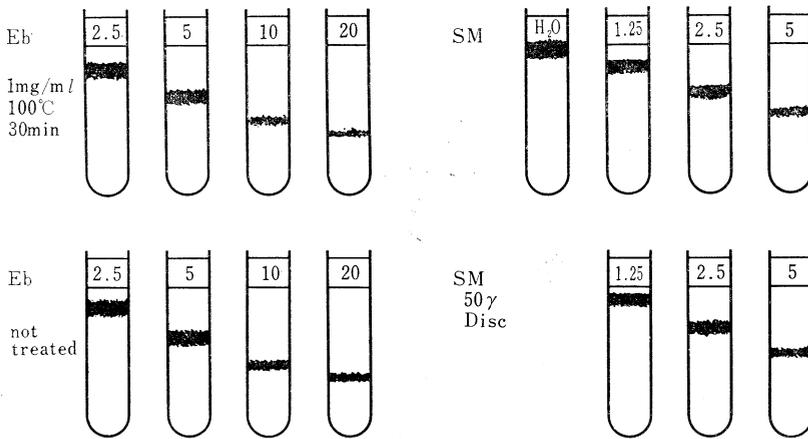
1. 検定菌および菌量 : 患者喀痰から分離せられた結核菌であり、SM, PAS, INH 等に感受性である。前報^{9)~5)} SM, PAS, INH, TH, CS, PZA, KM, VM 等の検討のために使用した菌株である。

上記の培養によつて阻止帯を生ずる場合、混積せられた菌量によつて著しく異なる所見が得られる。すなわち、菌量が少ないほど阻止帯が大きけれども、同時に、集落の散在する範囲が大きく、その範囲の境界が不明瞭になり、阻止帯の大きさを測定することが困難なことがある。ただし適当な菌量を用いると、集落の層の厚さが 2~3 mm で、境界明瞭であり、阻止帯の計測は、きわめて容易であるようにすることができる。したがって、このような方法で、薬剤の最少発育阻止濃度や各種菌株の薬剤感受性を比較する場合、菌量をもつとも重要な因子の一つであることが一目瞭然である。その詳細はすでに報告した⁷⁾⁸⁾ ので省略するが、通常、検定菌の Dubos 液体培地 10~14 日培養を新培地に 1% くらいの割合に混積した。Dubos 培養は肉眼的によく増殖したと思われるものを選んでいく。

2. 寒天 : Difco Special Agar Nobel を蒸留水で加熱溶解した。脂肪酸除去等のために特殊な操作を施さない。

3. 血清 : 入院化学療法を受けている患者に被検薬剤

Fig. 1. Ebutol γ /ml : Antimycobacterial Activity as Compared with SM γ /ml



も、上述と差はない。

SM 溶液重層では、1.25 γ /ml で約 0.5 cm、2.5 γ /ml で約 1 cm、5 γ /ml で約 1.5 cm の阻止帯を生じた。これにより Eb の抗菌力は SM の約 1/2 であるといえる。

SM-ディスクから SM を溶かし出した溶液を希釈して重層した場合、標示の濃度から計算して得た 1.25 γ /ml 重層ではバイアル入り SM を溶解して得た 1.25 γ /ml 液重層よりもわずかに小さい阻止帯を生じた。

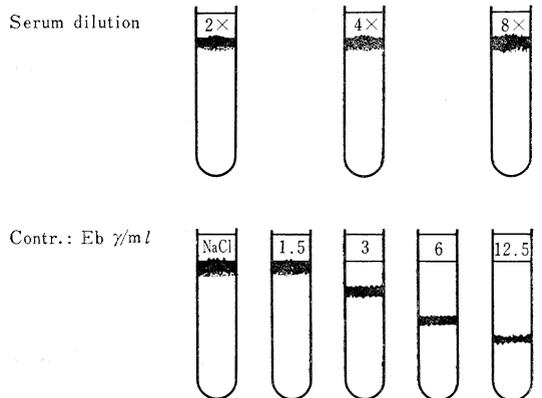
服用の前日からいつさいの化学療法を中止して、当日朝食前に被検薬剤を服用せしめ、所定時間後に採血し、遠心沈殿により血清を分離した。血清は生理食塩水で2倍、4倍、8倍に希釈して重層した。

しかしながら、両液の希釈系列の対応する濃度の抗菌力の差は1段階以内であつたので、ディスクから溶出して使用することは、小実験のために便利であることを知つた。

4. その他：各実験の方法の詳細は研究成績の項で記述する。

Fig. 2. Serum Antimycobacterial Activity Ebutol 500 mg 2 hrs, 3 hrs

研究成績

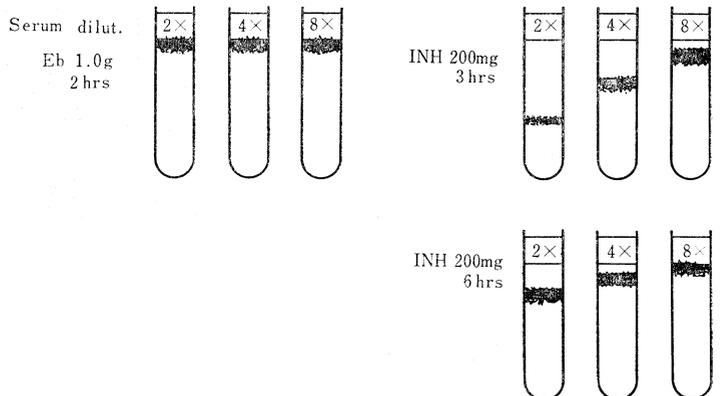


1. Ebutol 水溶液の最少発育阻止濃度 (SM との比較)

同一菌量の菌液を分注しておいて、同一寒天液を当量ずつ加えた混積培養すなわち、同一 Lot の混積培養上に、Eb 水溶液および SM 水溶液を重層して培養を続けた。Eb は無菌的に秤量して、蒸留水で 1 mg/ml 溶液を作り、以下 10 倍希釈または 2 倍希釈によつて作った 20~2.5 γ /ml 溶液および、1 mg/ml 溶液を 100°C、30 分加熱滅菌したものを同様に希釈した溶液各 1 ml 重層した。SM 溶液は、Dihydrostreptomycin 1 g (力価) を蒸留水で溶解した 10~1.25 γ /ml 溶液と、市販の 50 γ 含有ディスクを 5 ml の蒸留水に浸して溶かし出したあと希釈した溶液各 1 ml を重層した。

Fig. 3. Serum Antimycobacterial Activity as Ebutol 1.0 g 3 hrs Compared with INH

培養1週間の所見は Fig. 1 のとおりであつた。すなわち Eb 2.5 γ /ml 溶液重層で約 0.5 cm の阻止帯が生じ、厚さ約 0.4 cm の境界鮮明な集落層が現われた。5 γ /ml で約 1 cm、10 γ /ml で約 1.5 cm、20 γ /ml で約 2 cm の阻止帯を生じた。Eb 溶液を 100°C、30 分間加熱滅菌して希釈した溶液を重層した場合



同じ菌株でも別の実験で、すなわち菌量が異なっていたと考えられる実験で、1.5 r/ml で阻止帯がなく、3.1 r/ml 以上で阻止帯を生じた場合もあり、2.5 r/ml で阻止帯なく、5 r/ml 以上で阻止帯を生じた場合もあった。

2. Ebutol 内服患者の血清抗菌力

(1) Eb 500 mg 単独内服 2, 3 時間後の血清抗菌力 (Eb 水溶液との比較)

2 時間後の血清 10 例, 3 時間後の血清 5 例を供試した。いずれの血清もその 2 倍, 4 倍, 8 倍希釈液重層で阻止帯を生じなかつた。

1 例を図示すると、Fig. 2 のとおりであつた。すなわち血清重層では阻止帯なく、対照系列では、NaCl 溶液および 1.5 r/ml 溶液重層で阻止帯がないけれども、3 r/ml で約 0.8 cm, 6 r/ml で約 1.2 cm 等の阻止帯が明瞭であつた。

(2) Eb 1.0 g 内服 2 時間後の血清抗菌力 (INH 200 mg 内服 3, 6 時間後の血清との比較)

Eb 内服後の血清 10 例, INH 内服後の血清 1 例を供試した。1 例ずつ図示すると Fig. 3 のとおりであり、Eb 1.0 g 内服後 2 時間の血清は 2, 4, 8 倍希釈液重層で阻止帯がなく、INH 200 mg 内服 3 時間後の血清は 8 倍希釈まで明らかに抗菌力を発揮し、同じ人の 6 時間後の血清も 4 倍希釈まで抗菌力を示した。

INH 内服の例は 1 例しか供試しなかつたけれども、これと同程度の抗菌力は多く経験している²⁾のであつて、この実験も同様な傾向を示した。

(3) Eb 1.5 g 内服 2 時間後の血清抗菌力

混釈培養の菌量を少なくして、阻止帯が大きくなるように実験を工夫した。5 例中 2 例は 4 倍希釈まで、2 例は 2 倍希釈まで、阻止帯を生じ、他の 1 例は阻止帯を生じなかつた。阻止帯の大きさは、体重と逆比例しなかつた。

(4) Ebutol 併用の血清抗菌力

Eb 500 mg + CS 250 mg, Eb 500 mg + INH 200 mg, Eb 500 mg + TH 300 mg, Eb 500 mg + PAS 10/3 g 同時内服 3 時間後の血清各 3 例ずつを同時に供試した。各 1 例ずつの成績は Fig. 4, Fig. 5 のとおりであつた。CS との併用例では 2 倍希釈でも阻止帯を生じなかつた。INH との併用例では、2 倍希釈で約 2 cm, 4 倍希釈で約 1.5 cm, 8 倍希釈で約 1 cm の阻止帯を

生じた。この例は 3 例中もつとも大きい阻止帯を生じた例であり、他の 2 例は Fig. 3 の INH 200 mg 単独内服 3 時間後の血清とほぼ同じであつた。

TH と併用の血清 1 例は 2 倍希釈で約 0.4 cm, 4 倍希釈で約 0.2 cm の阻止帯を生じ、8 倍希釈では阻止帯を生じなかつた。他の 2 例は 2 倍希釈で約 0.2 cm の阻止帯を生じ、4 倍, 8 倍希釈では阻止帯を生じなかつた。

PAS との併用の血清は 3 例とも著しい阻止帯を生じ、その 1 例は 2 倍希釈液重層により、管底までまつたく菌の発育が現われなかつた。4 倍希釈で約 2 cm の深部の集落層は薄く、集落は微細であつた。8 倍希釈で約 1.5 cm であつた。他の 2 例中 1 例は 8 倍希釈液重層でも集落がまつたく現われなかつた。

(付) PAS 10/3 g 単独内服 3, 6 時間後の血清抗菌力 各 3 例ずつ供試した。3 時間後の血清 3 例中 1 例が Fig. 5 のように、2 倍希釈で管底まで発育を阻止し、8 倍希釈でも約 2 cm 深部まで発育を阻止した。他の 2 例は 8 倍まで完全に発育を阻止した。6 時間後の血清は 3 例とも、抗菌力はまつたくみられなかつた。

考 案

1. Eb の最少発育阻止濃度について

本実験では、Eb の抗菌力を SM, INH 等と比較して

Fig. 4. Serum Antimycobacterial Activity Ebutol 500 mg Combined with CS or INH

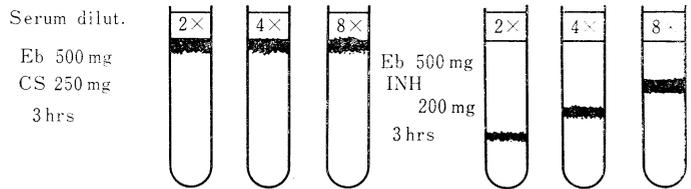
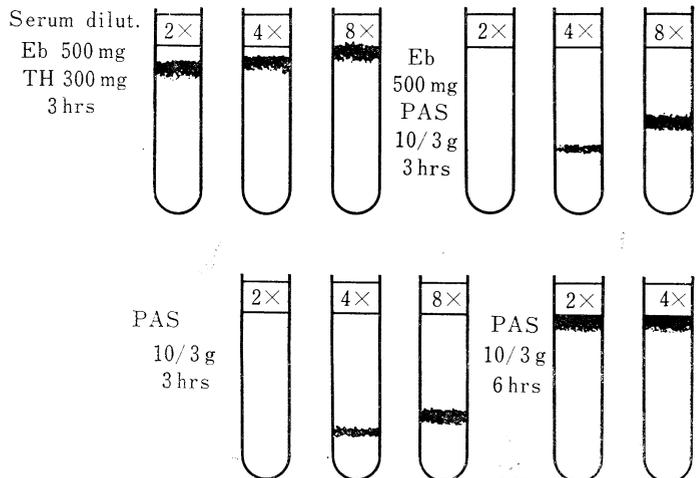


Fig. 5. Serum Antimycobacterial Activity Ebutol 500 mg Combined with TH or PAS



把握しようと努めた。したがって全体を通じて観察しやすい集落層が現われるような菌量を接種して、各図に示すように、一応成功したと考える。この菌量に対してEbの最少発育阻止濃度は2.5 γ/ml 以下と判断せられた。すなわちEb 2.5 γ/ml は、SMの最少発育阻止濃度に近い1.25 γ/ml の発育阻止と同程度の発育阻止を示したといえることができる。

しかしながら、このような方法では、発育阻止帯の大きさは接種菌量によつてかなり相違するのであつて、菌量を少なくすれば、もつと低い濃度で阻止帯を生ずるはずである。

最少発育阻止濃度の比較のために、培地はもちろん、菌量を決定することはきわめて重要である。今回の実験では真の最少発育阻止濃度は示されないと考えるといわなければならない。

本剤の開発者の1人であるThomasらは本剤のDL体の結核菌に対する最少発育阻止濃度はSauton液体培地で1~4 γ/ml であると報じ¹⁰⁾、KarlsonらはEgg-York-Agar培地を用いて、170株の結核菌株中115株はD体1 γ/ml で発育阻止せられ、55株は5 γ/ml で阻止せられたと報じた¹¹⁾。

わが国では、1%小川培地では2.5 γ/ml ¹²⁾¹³⁾、同直立拡散法で2.2 γ/ml ¹⁴⁾、キルヒナー寒天¹³⁾では、pH、菌量によつて異なり、pH 6.5では1.25~6.25 γ/ml 、Dubos液体培地では2.5~5 γ/ml 等¹³⁾と報ぜられている。また山本¹⁵⁾は、患者から分離した結核菌67株中57株は1%小川培地でEb 2.5 γ/ml で完全に発育阻止せられ、残りの10株は5 γ/ml で阻止せられたと述べている。

われわれの方法でも2.5 γ/ml くらいであつた。というのは、従来検討してきたSM、INH等の抗菌力と比較するために、ある程度の菌量を供試するよう努めてのことであるけれども、既報の成績と比較して大きな差はないものと推測せられる。

2. Eb内服後の血清抗菌力について

(1) Eb単独内服後の血清抗菌力

Eb 1.5g内服後2時間の血清を、菌量の少ない混釈培養上に重層したとき、5例中4例に阻止帯をみる事ができた。やや菌量の多い実験では、Eb 500mgまたは1.0g内服2時間後の血清では抗菌力をみる事ができなかつた。

しかしながら、後者の場合も、菌量の関係を明らかにしなければ、抗菌力の有無を断定することはできないと考えられる。ただし、これらの内服量では、INHやPAS、THの慣用量内服後の血清抗菌力よりも明らかに小さい血清抗菌力しか得られないことが確認せられたといえる。

Placeら¹⁶⁾はM. Smegmatis(ATCC 607)株を用い

て、血中濃度を生物学的に測定して、本剤内服後2時間で最高となり、50 mg/kgで10 γ/ml 、25 mg/kgで5 γ/ml となると報告した。わが国では、金沢のH₇株を用いて、0.5g内服で1~4 γ/ml ¹⁷⁾、25 mg/kgで5.1~7.8 γ/ml ¹⁸⁾等と報じられている。

われわれの方法では、MICが2.5 γ/ml であり、血清は2倍以上に希釈して供試するので、血清中に5 γ/ml 以上ないと測定困難であることになる。しかしながらSSAATでは、25 mg/kgで4倍希釈程度といわれ¹⁹⁾²⁰⁾、この値は薬剤の抗菌力が不詳であると考えられる値である。われわれの成績からしても、1.5gでわずかに阻止帯がみられたというべく、両者はほぼ同じことを証明しているといえるであろう。

(2) Ebの併用効果

CS 250mg内服後3時間の血清は2倍希釈で阻止帯を生じないこと、TH 300mg内服2~4時間後の血清2倍希釈でわずかな阻止帯を生ずる例がかなり多いことはすでに報告した⁵⁾とおりであり、INH 200mg内服4~6時間後の血清2~4倍希釈液重層で阻止帯を生ずる例が多いことも既報²⁾のとおりである。PAS 10/3g内服3時間後の血清が著しい抗菌力を示すことは上記実験成績で明らかに示された。

薬剤の併用による抗菌力の増強を証明するためには、各単独では阻止帯を生じない程度の量を併用して阻止帯が発現することを示すことができれば、理解しやすい。CS、THとの併用は、この意味で企図せられた。

拮抗を証明するためには、単独では阻止帯を生ずる量を併用して阻止帯の消失を示すことができれば、もつとも明瞭である。TH、INH、PASとの併用は、この意味で実験した。

■ Eb 500mgとCS、TH、INH、PAS各慣用量との併用3時間後の血清重層によつて生じた阻止帯の大きさは、併用剤各単独内服後の血清が与える阻止帯と差がないと認められ、Ebとこれらに協力も拮抗もないと判断せられた。

3. 併用療法時血清抗菌力検査法について

化学療法を実施するさいに、臨床上の効果を予測して、薬剤使用のための指針を得ようとするとき、薬剤の試験管内抗菌力、血中濃度および菌の薬剤耐性獲得状況を検討することが、一般に、その一つの方法である。

しかしながら試験管内抗菌力は供試培地、薬剤の溶媒、供試菌量によつて影響せられることが多く、また血中濃度には個人差があるものもあるので、簡単にこれらの一連の検査を評価することが困難である場合がある。

これに比して、血清抗菌力の検査は溶媒と個人差の影響を考慮する必要がないので、臨床上、より便利であると考えられる。

われわれは上記の方法を考案して、現行結核化学療法

剤の血清抗菌力を検討してきたところ、今回、Ebutolの血清抗菌力とその併用時血清の抗菌力の検討に及んだ。

この方法によつて観察せられる抗菌力は、菌の発育阻止帯の大きさによつて表現せられるのであり、併用剤の中のいずれか強力な一剤による阻止帯だけが現われ、これに対して他剤の影響がみられなかつた。すなわち供試各剤間には協力も拮抗も認められなかつた。

このことは一方、阻止帯の大きさの観察に限るならば、弱力な併用剤の抗菌力についてはまったく不明であつたといわなければならない。

したがつて併用療法時血清抗菌力と単独療法時血清抗菌力との間になんらかの相違があるとするならば、上記の観察以外のなんらかの方法によつて、これを求めなければならぬと考えられるのである。

結 論

結核菌の Dubos 半流動寒天混積培養を用いた重層法による供試結核菌に対する最少発育阻止濃度は供試菌量により異なるけれども、一般に考えられている SM の最少発育阻止濃度に近い SM 1.25 γ/ml の抗菌力と匹敵する抗菌力を示す Ebutol 濃度は 2.5 γ/ml であつた。

本法によつて、Ebutol 0.5~1.0 g 内服 2 時間後の血清の抗菌力を検出することができなかつたけれども、供試菌量を少なくすれば、Eb 1.5 g 内服 2 時間後の血清は 2~4 倍希釈液重層により発育阻止帯を生ずることを知つた。

Eb 500 mg と CS 250 mg との併用後の血清では阻止帯を生ぜず、TH 300 mg、INH 200 mg、PAS 10/3 g との併用 2 時間後の血清は、この順に大きな、阻止帯を

生じたけれども、それらは TH、INH、PAS 単独の抗菌力によるものであると認められ、Eb と各剤間に協力も拮抗もないと考えられた。

文 献

- 1) 岡本亨吉・宇都宮利善・古泉桂四郎：結核，35：543，1960.
- 2) 古泉桂四郎・岡本亨吉：結核，37：18，1962.
- 3) 岡本亨吉・藤永亮三・山内秀夫：結核，38：413，1963.
- 4) 岡本亨吉：日胸臨，22：552，1963.
- 5) 岡本亨吉・照沼毅陽：結核，39：474，1964.
- 6) 宇都宮利善・岡本亨吉・飯田実：衛生検査，8：25，1959.
- 7) 宇都宮利善：結核，35：173，1960.
- 8) 岡本亨吉：結核，38：78，1963.
- 9) Kass, I., Dye, W. E.: Ecerpta Med., 41：100，1963.
- 10) Thomas, J. P., Baughn, C. O., Wilkinson, R. G. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 83：891，1961.
- 11) Karlson, A. G.: Am. Rev. Resp. Dis., 84：902，905，1961.
- 12) 山本和男：胸部疾患，8：1070，1964.
- 13) 森山英五郎：結核，39：155，1964.
- 14) Ebutol の参考資料，科研化学社，1963.
- 15) 山本和男・桜井宏・下村康夫他 1：日胸臨，22：797，1963.
- 16) Place, V. A., Thomas, J. P.: Am. Rev. Resp. Dis., 87：901，1963.
- 17) 馬場治賢・楊維垣・田島洋二他 2：日胸臨，23：862，1964.
- 18) 桜井宏・下村康夫・井上幾之進他 1：日胸臨，24：216，1965.
- 19) 下村康夫：胸部疾患，8：250，1964.
- 20) 岡捨己：日胸臨，23：30，1964.