

二次抗結核薬の治療効果に関する実験的研究 (その 3)

多 賀 誠

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎 竜郎)
名古屋大学医学部日比野内科 (教授 日比野 進)

受付 昭和 39 年 7 月 27 日

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE EFFECT OF SO-CALLED SECONDARY ANTITUBERCULOSIS DRUGS (3)*

Makoto TAGA

(Received for publication July 27, 1964)

The following two experiments were carried out to examine 1) the effect of INH and TH in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* resistant to INH (INH-R tubercle bacilli), and 2) the relationship between the therapeutic effect of anti-tuberculosis drugs and specific serum antimycobacterial activity titre (SSAAT).

Experiment 1: Young ddY female mice were intravenously infected with INH-R tubercle bacilli (v. u. 1.8×10^6) obtained from a tuberculous patient, clinically resistant to INH $0.2 \mu\text{g/ml}$ completely, sensitive to INH $1.0 \mu\text{g/ml}$, PAS $1 \mu\text{g/ml}$ and SM $10 \mu\text{g/ml}$. The mice inoculated with these bacilli and left untreated for 2 weeks were divided into 8 groups: INH, SM, TH, INH·SM, INH·TH, SM·TH, SM·INH·TH and untreated control. They were necropsied after respective treatment for 6 weeks. These three drugs were administered in the way previously noted. Each mouse was examined for body weight, macroscopic changes of lung lesions, lung weight, amount of viable tubercle bacilli in the lung and amount of $0.1 \mu\text{g/ml}$ INH-R tubercle bacilli in percentage to the total.

Results: 1. Therapeutic effects of INH 4 mg/kg in tuberculous mice infected with $0.2 \mu\text{g/ml}$ INH-R tubercle bacilli were not significant, but the effect of TH 12 mg/kg was definitely proved. Combined therapy of INH and TH was more effective than that of TH only, and actually percentage of $0.1 \mu\text{g/ml}$ INH-R tubercle bacilli was reduced by administration of TH.

2. Effect of SM semi-weekly in tuberculous mice infected with INH-R tubercle bacilli was the same as in the mice infected with $H_{37}Rv$.

Experiment 2: One ml. of serum was collected from 7~9 mice 1 hour and 4 hours in each group after administration of various combinations of drugs; KM, TH, CS, INH, KM·TH, KM·CS, TH·INH, TH·CS, KM·TH·CS, KM·TH·PZA, KM·CS·PZA and TH·CS·PZA. The sera were examined for SSAAT to $H_{37}Rv$ and INH-R tubercle bacilli used in the previous experiments in the Dubos liquid medium.

Results: 1. SSAAT in mice receiving single and combined drugs containing KM was raised highly 1 hour after administration, but not after 4 hours. Increase in SSAAT during single and combined administration of TH, CS and PZA was not found within 4 hours.

2. Increase in SSAAT of INH and INH·TH to $H_{37}Rv$ was proved 1 hour after the administration, but not to INH-R tubercle bacilli. Consequently the therapeutic effect of antituberculosis drugs on experimental tuberculosis in mice was thought not to be much related to the SSAAT.

* From 1st Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, Showa-ku, Nagoya, Japan.

H₉₇Rv 感染マウスを対象とした第1報, 第2報において, THを含む二次抗結核薬の治療効果は, INHを含む一次抗結核薬の治療効果に劣るが, 無治療群に比べてかなり優れていることが分かった。今回は INH 耐性菌感染マウスを対象として, 一次・二次抗結核薬の代表的な INH および TH の治療効果を検討し, 次いで各種抗結核薬によるマウス実験的結核症の治療効果と, その薬剤投与時のマウス血清総合抗菌力との関係を検討せんとして次の2実験を行なった。

実験 1: INH 低濃度耐性結核菌感染マウス に対する INH, TH, SM の治療効果の比較

目 的

INH 耐性菌感染マウスに対する INH, TH 単独の治療効果および INH・TH 併用の治療効果をもて, INH 耐性菌感染例に INH を投与する意味を知ろうとした。

方 法

肺結核患者より分離した臨床的に INH 0.2 γ /ml 完全耐性, INH 1.0 γ /ml 感性, SM 10 γ /ml・PAS 1 γ /ml 感性結核菌を INH 0.1 γ /ml 加 3% 小川培地に5代継代して使用した。

INH 0.1 γ /ml 加 3% 小川培地に3週間培養の人型結核菌 1.2 mg (v. u. 1.8×10^6) を幼若 ddY 系雌性マウス (平均体重 13g) に各群 10~11 匹宛尾静脈内接種して2週間放置後, 下記のように6週間治療を行なった。

群分けは INH, TH, SM の各単独群, SM・INH, SM・

TH, TH・INH の各2者併用群, SM・TH・INH の3者併用群の7群とし, 無治療対照群と比較した。薬剤投与量は人に使用するのと同じ方法を用い, SM 20 mg/kg 週2回皮下注, INH 4 mg/kg, TH 12 mg/kg 各々週6回経口投与とした。

治療効果の判定には, 菌接種2週ごとに3匹宛剖検し, 治療終了時には全群剖検して, 体重, 肺の肉眼的病変度, 肺重量, 肺内生菌数, 肺内生菌数中の INH 0.1 γ /ml 耐性菌の比率などを参考にした。

成 績 (表 1)

治療中に結核死をみたのは INH 群のみで, 9匹中3匹に達した。

結核死亡マウスを含めて肺病変度をみると, INH 群は平均 3.9 ともつとも高く, 無治療対照群は 3.3, SM 群も 3.3 と同程度に高い値を示した。SM・INH 群は 2.7, TH 群は 2.6 を示してやや軽くなっていた。さらに SM・TH 群は 2.2, SM・TH・INH 群は 1.6, TH・INH 群は 0.9 を示してその順に軽くなっていた。

結核死亡マウスを含めて肺重量をみると, INH 群は平均 349 mg, 無治療群 267 mg ともつとも高く, SM 群は 225 mg を示してやや軽くなっていた。TH 群は 185 mg で, SM・INH 群の 192 mg と同程度を示した。さらに SM・TH 群は 168 mg, SM・TH・INH 群は 172 mg を示したが TH・INH 群は 145 mg ともつとも軽い値を示した。

10 mg 肺生菌数の対数を結核死亡マウスを含めてみると, INH 群は平均 5.02 でもつとも多く, 無治療群は 4.83 を示した。SM 群, SM・INH 群は 4.68, 4.44 を

Table 1. Mean Value with Standard Deviation of Body Weight, the Degree of Macroscopic Changes in Lung Lesions, Weight of the Lungs, Logarithmic Number of Viable Tb-Bacilli in 10 mg of Lung and Percentage of 0.1 μ g/ml INH-R Tb-Bacilli in the Total

Groups	Body weight	Degree of lung lesions	Lung weight (mg)	Log. no. of viable Tb-bac. in 10 mg lung	% of INH-R Tb-bacilli
Pretreatment control (3)	20.8 \pm 0.7	0.2 \pm 0.2	178 \pm 16	4.05 \pm 0.11	—**
Untreated for 4 W. (3)	20.0 \pm 4.0	3.1 \pm 0.2	211 \pm 23	4.73 \pm 0.41	103 \pm 2
Untreated for 6 W. (3)	20.0 \pm 1.9	2.9 \pm 0.2	203 \pm 30	4.66 \pm 0.10	71 \pm 20
Control untreated for 8 W. (10)	21.0 \pm 2.7	3.3 \pm 0.6	267 \pm 62	4.83 \pm 0.43	83 \pm 24
INH* (9: 3 died of tb.)	16.3 \pm 4.2	3.9 \pm 0.9	349 \pm 159	5.02 \pm 0.81	60 \pm 13†
SM* (10)	21.2 \pm 4.2	3.3 \pm 0.7	225 \pm 28	4.68 \pm 0.53	59 \pm 20
TH* (10)	19.1 \pm 2.9	2.6 \pm 0.5	185 \pm 28	3.60 \pm 0.59	34 \pm 18
SM・INH (11)	20.6 \pm 2.0	2.7 \pm 0.7	192 \pm 40	4.44 \pm 0.51	44 \pm 19
SM・TH (11)	19.8 \pm 2.6	2.2 \pm 0.6	168 \pm 23	3.28 \pm 0.80	28 \pm 12
TH・INH (11)	20.5 \pm 2.0	0.9 \pm 0.3	136 \pm 20	1.75 \pm 1.05	27 \pm 22
SM・TH・INH* (10)	21.6 \pm 4.0	1.6 \pm 0.8	172 \pm 21	1.30 \pm 0.95	29 \pm 18

() Numbers of mice

* 1~2 mice were excluded because of accidental death.

** Uncounted.

† Mice died before the end of therapy, were excluded.

示し無治療群に比べてわずかに低い傾向がみられた。TH 群は 3.60, SM・TH 群 3.28 を示し無治療群に比べて低くなっていた。

さらに TH・INH 併用群は 1.75 を示して TH 単独群に比べて生菌数の減少がみられた。SM・TH・INH 群は 1.30 とともに低い生菌数を示したが TH・INH 群と差はなかつた。

1% 小川培地上の INH 0.1 γ /ml 耐性菌の比率 (%) を求めてその平均をみると、無治療群は菌接種 4 週後 103%, 6 週後 71%, 8 週後 (治療終了時) 83% を示した。治療終了時 INH 群・SM 群は約 60%, SM・INH 群は 44%, TH 群は 34%, SM・TH 群, TH・INH 群, SM・TH・INH 群は 27~29% を示した。すなわち無治療群と TH 群間および SM 群と SM・TH 群間では有意の差で INH 0.1 γ /ml 耐性菌の比率が、TH 使用によつて減少していた。また無治療群, INH 群, TH 群, TH・INH 群で、INH 0.1 γ 以上耐性菌の INH 耐性度の変動の有無をみたが、ともに INH 0.2 γ /ml 完全耐性, INH 0.5 γ /ml 不完全耐性, INH 1.0 γ /ml 感性を示して治療による耐性度の変化はみられなかつた。

考 察

INH 耐性菌感染に対する INH の効果に関していろいろの動物実験の成績が報告されている。堀¹⁾は 0.1 γ ~0.2 γ /ml INH 耐性菌を高率に含む低濃度 INH 耐性菌感染マウスに対して INH 12 mg/kg, 24 mg/kg の治療効果はきわめて乏しかつたと報告し、井上²⁾は 0.05 γ ~0.1 γ /ml の INH 完全耐性菌感染モルモットに対して INH 10 mg/kg の効果はみられなかつたと報告している。

一方中野³⁾は安定した 100 γ /ml INH 耐性菌感染マウスに INH を投与したところ臓器内生菌数の減少は著明でないが、延命効果がみられたと報告し、吉田⁴⁾は INH 10 γ /ml 耐性菌感染モルモットに INH 4 mg/kg を長期投与したところ治療効果がみられたと報告している。また Barnett ら⁵⁾は INH 0.2 γ /ml 耐性, 1 γ /ml 感性結核菌を感染させたモルモットおよびマウスの実験的結核症に INH を投与したところ、INH 4 mg/kg は無効であつたが 20 mg/kg は効果があつたと報告している。

INH 耐性菌感染に対する TH の効果に関しては、土持⁶⁾は INH 耐性菌を TH 0.5 γ /ml 加 Dubos 液体培地に 4~8 代継代すると INH 耐性度および INH 耐性個体比率の低下がみられ、耐性菌は感性菌よりも強く TH の影響を受けたと報告し、高橋⁷⁾は臨床的に INH 耐性菌排出例に TH を長期投与したところ INH 耐性の低下をみたと報告している。野崎^{8,9)}は試験管内およびマウスを用いた動物実験で、INH 耐性結核菌に対する TH・INH 併用による効果増強を報告し、その意味づけに

INH 耐性菌は TH によつて INH 結合能が増加し、INH 耐性度の減弱を来たしたためであろうと推論している。

著者の実験では、INH 低濃度耐性結核菌感染マウスに対して INH 4 mg/kg 単独毎日治療は無効であり、TH 12 mg/kg 単独毎日治療は有効であつた。さらに INH を加えた TH・INH 併用は TH 単独より有意な治療効果の増強がみられた。一方対照群と TH 単独群, SM 群と SM・TH 併用群との間に、いずれも TH 使用によつて INH 耐性菌比率の有意の低下がみられたが、INH 耐性度の低下はみられなかつた。

TH 使用による INH 耐性菌比率の低下は、INH 耐性菌が感性菌に比べて TH に対する感受性が強い⁶⁾かどうか、又 TH の存在が INH 耐性菌の耐性度を減弱させるため⁸⁾かどうかは現在のところ分からないが、いずれにせよ TH 使用による INH 耐性菌比率の減少という事実から、INH 耐性菌感染に対して TH と INH の併用治療は臨床的にもすぐれた方法と考えられる。小林¹⁰⁾は INH 耐性菌排出例に対して TH・CS 治療と TH・CS・INH 治療を比較し、菌陰性化率は後者に優れていたと報告しているが、その成績にもこのことがうかがわれる。

ま と め

① INH 0.2 γ /ml 耐性結核菌感染マウスに対して INH 4 mg/kg 単独治療は無効であり、TH 12 mg/kg 単独治療が効を奏した。TH・INH 併用治療は TH 単独治療に比べて治療効果の増強を示した。一方 INH 0.1 γ /ml 耐性菌の比率は TH 使用によつて減少した。

② 低濃度 INH 耐性菌感染マウスに対する SM 20 mg/kg 週 2 回皮下注の治療効果は劣つていたが、H₃₇Rv 感染マウスに対する治療効果と変りはなかつた。

実験 2: 各種抗結核薬投与時のマウス血清総合抗菌力

目 的

近年結核症に対する治療効果を考えるとき、その薬剤の血清総合抗菌力が一つの指標とならないかと考えられて各施設で検討されている。

著者はマウス実験的結核症に対して各種抗結核薬の治療効果を見てきたが、薬剤の効果とその薬剤のマウス血清総合抗菌力との相関をみようとし、合わせてその抗菌活性から治療効果の予測ができないかと考えた。

方 法

1 群の ddY 雌性マウスに下記のような薬剤の組合せを投与し、1 時間、4 時間後に 7~9 匹宛マウス腕窩動脈を切断して集血し、遠沈によつて血清 1 ml を採取し

て行なつた。培地は 3 ml Dubos 液体培地で 4 倍から 128 倍まで血清を倍数稀釈し、その培地の H₃₇Rv に対する発育阻止力を菌接種 1 週間後に判定した。その判定にはネオテトラゾリウムの水溶液を滴下し、24 時間後菌塊が紫染するのを発育⊕とした。

群分けは KM, TH, CS, INH の各単独, KM・TH, KM・CS, TH・CS, TH・INH の各 2 者併用, KM・TH・CS, KM・TH・PZA, KM・CS・PZA, TH・CS・PZA の各 3 者併用の 12 群について行なつた。薬剤投与量は KM 40 mg/kg 皮下注, TH 12 mg/kg, CS 10 mg/kg, PZA 40 mg/kg, INH 4 mg/kg おのおの経口投与とした。

成 績 (表 2)

H₃₇Rv の発育阻止は KM 使用群にのみ 1 時間後に高くみられたが、4 時間後には菌の発育阻止はみられなかつた。また KM 使用群相互間に意味のある菌発育阻止の優劣はみられなかつた。

KM を含まぬ TH, CS, PZA などの単独および併用群では、菌発育阻止は 1 時間後にも、4 時間後にもみられなかつた。

INH 単独, INH・TH 併用群では H₃₇Rv に対し 1 時間後に 4 倍でのみ菌の発育阻止を示したが実験 1 で使用した INH 0.2 γ/ml 耐性菌に対してはともに阻止を示さなかつた。

Table 2. Specific Serum Anti-Mycobacterial Activity Titre in Mice after Administration of Antituberculosis Drugs Inhibition to the growth of H₃₇Rv : 1 hour after administration

Group	×4	×8	×16	×32	×64	×128	0
KM	—	—	+	+	+	+	+
KM・TH	—	—	—	—	+	+	+
KM・CS	—	—	—	—	—	+	+
KM・TH・CS	—	—	—	+	+	+	+
KH・TH・PZA	—	—	—	—	—	+	+
KM・CS・PZA	—	—	—	—	—	—	+
TH	+	+	+	+	+	+	+
CS	+	+	+	+	+	+	+
TH・CS	+	+	+	+	+	+	+
TH・CS・PZA	+	+	+	+	+	+	+
INH	—	+	+	+	+	+	+
INH・TH	—	+	+	+	+	+	+

No inhibition to the growth of H₃₇Rv 4 hours after administration.

Inhibition to the growth of 0.2 μg/ml INH・R Tb-bacilli : 1 hour after administration

INH	+	+	+	+	+	+	+
INH・TH	+	+	+	+	+	+	+

考 察

1959 年に Holmes¹¹⁾ らは CS の使用に当たつて、CS の有効濃度維持と副作用防止を目的として CS の血中濃度の測定を行ない、その患者に対する投与量を決定してのち化療を行なつて良効を得たことを報告した。

1962 年には Kass¹²⁾ らが一次抗結核薬に耐性の症例に二次抗結核薬を使用する場合、患者分離菌を指標として薬剤投与後の血清総合抗菌力を測定し、その患者の適応投与量を決定して化療を行なつたところ、3 カ月以内に耐性症例の 90% が菌陰性化したと報告して、その抗菌活性を SSAAT とよんだ。

それ以来そうした考え方がわが国にも導入され、各方面で検討されている。

著者の実験で、KM の SSAAT は高値を示す割に治療効果が低かつたのは、岩崎の報告¹³⁾ にみられるように、細胞内結核菌に対して菌発育阻止をみる KM の濃度は、試験管内最小発育阻止濃度の 10 倍~20 倍を必要とするから、KM の場合 (SM も同様だが) 血中内で高濃度を示しても組織内への移行が少なく、一方腎臓から速やかに排泄されてしまうからであろうと考えられる。工藤¹⁴⁾ は INH 4 mg/kg, KM 40 mg/kg, SM 20 mg/kg 投与後のモルモット脳内抗菌活性を調べ、INH 投与に有効な抗菌活性の上昇がみられたが、SM, KM にはみられなかつたと報告しているが、この事実も KM, SM の組織内滲透性の低いことを物語つている。

一方動物実験では TH は相当有効であつたのに、SSAAT で菌の発育阻止がみられなかつたが、これに関しては人においても、TH の SSAAT は低く、4 倍で菌の発育阻止をみないことがよくあると報告されている^{15,16)}。SSAAT で阻止力をみるには、最小阻止濃度の 4 倍以上の濃度が必要なこと、腸管における TH の吸収の速度、最小阻止濃度の持続時間などが関係していると考えられるが、今後検討すべき問題であろう。

各種抗結核薬の投与法の文献を整理した Karlson ら¹⁷⁾ は、抗結核薬は 1 日 1 回投与と、1 日数回投与とで治療効果に差がなく、また週 2~3 回投与でも十分な効果が得られる場合もあることから、抗結核薬の血中抗菌活性の維持のみが抗肺結核症作用に結びつくという見方はなりたないとして述べている。また SM, KM の高い血中抗菌活性、INH, TH の低い血中抗菌活性と臨床成績との不一致を示す報告²⁹⁾や、岡¹⁷⁾ らの家兎の SSAAT 測定の実験にもみられることであるが、マウスの場合も同様に SSAAT のみから直接治療効果を予測することは難しいと考えられた。

ま と め

① KM 使用群に、1 時間後に高い SSAAT が認め

られたが、4時間後には認められなかつた。TH, CS, PZA 使用群 (KM 非使用) には1時間後にも4時間後にも SSAAT は認められなかつた。

② INH 使用群は $H_{97}R_v$ に対して1時間後に4倍でのみ菌発育阻止を認めたが、INH 0.2 γ/ml 耐性菌に対しては、菌発育阻止を認めなかつた。

したがってマウス実験的結核症に対する各種薬剤の治療効果は、その SSAAT からは推測できなかつた。

本論文 (その 1, その 2, その 3) の稿を終わるにあたり、本研究について直接ご指導いただき、ご校閲を賜わつた当研究所岩崎竜郎所長に厚く感謝いたします。

またいろいろご援助、ご討議をいただいた当所続木細菌科長、岩井病理科長、青木・亀田・初鹿野・工藤病理科の諸先生がたにお礼申し上げます。

当研究所における研究にご理解いただき、ご援助をいただいた名古屋大学第一内科日比野進教授にお礼申し上げます。

なお本論文の要旨は、第 39 回日本結核病学会総会において報告した。

文 献

- 1) 堀美津夫^他: 大阪大学医学雑誌, 12: 439, 1960.
- 2) 井上辰己: 福岡医学雑誌, 50: 3910, 1959.
- 3) 中野 昭: 結核, 35: 206, 1960.
- 4) 吉田綾子^他: 医療, 13: 879, 1959.
- 5) Barnett, M. ^他: Lancet 1, 314, 1953.
- 6) 土持隆彦: 結核, 38: 264, 1963.
- 7) 高橋欽一^他: 胸部疾患, 7: 490, 1963.
- 8) 野崎昭雄: 結核, 39: 217, 1964.
- 9) 野崎昭雄: 結核, 39: 223, 1964.
- 10) 小林栄二: 第 39 回日本結核病学会報告, シンポジウム 1, 1964.
- 11) Holmes, C. X. ^他: Dis. Chest 36: 591, 1959.
- 12) Kass, I. ^他: Excepta medica, 41: 100, 1961. (®より引用)
- 13) 岩崎竜郎: 第 34 回日本結核病学会報告, シンポジウム, 1959.
- 14) 工藤賢治: 結核研究の進歩, 28: 139, 1960.
- 15) 福原徳光: 第 39 回日本結核病学会報告, シンポジウム 1, 1964.
- 16) 下村康夫: 胸部疾患, 8: 250, 1964.
- 17) Karlson, A. G. ^他: Am. Rev. Resp. Dis., 84: 50, 1961.
- 18) 岡捨己^他: 日本胸部臨床, 21: 920, 1962.