

## 短 報

*Minocycline* と抗結核剤の結核菌に  
対する試験管内併用効果

東 村 道 雄・水 野 松 司・外 山 春 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 58 年 6 月 4 日

*IN VITRO* COMBINED EFFECT OF MINOCYCLINE ON *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* WITH ANTITUBERCULOUS DRUGS

Michio TSUKAMURA\*, Shoji MIZUNO and Haruo TOYAMA

(Received for publication June 4, 1983)

*In vitro* combined effect of minocycline with various antituberculous drugs on the growth of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv was studied. The concentrations of antituberculous agents used were those, except for isoniazid (INH) and kanamycin sulfate (KM), retarding the growth rate of the test organism (Tsukamura, M., and Mizuno, S.: Kekkaku 55: 365-370, 1980) but permitting the colony formation from a diluted bacterial suspension (Table 1). The effect of INH on the growth of *M. tuberculosis* was an "all or none"-type (see above reference), and therefore the concentrations of INH used in this study did not affect the growth of the organism when used singly. The concentrations of KM used were too low to affect the growth rate. The concentrations of the other drugs retarded more or less the growth rate, but such concentrations did not inhibit the formation of colonies from single cells.

In the present study, it has been observed how the combined antituberculous agents could modify the growth-inhibitory concentration of minocycline. The results are shown in Table 1.

The inhibitory action of minocycline was weakened in the presence of ethionamide (TH), INH and KM, whereas it was enhanced by the presence of enviomycin (EVM), ethambutol (EB) and para-aminosalicylate (PAS). The inhibitory concentration of minocycline remained unchanged in the presence of streptomycin sulfate (SM), rifampicin (RFP) and cycloserine (CS).

The results indicated that minocycline and TH, or minocycline and INH act antagonistically and that minocycline acts synergistically or at least additionally with EB, EVM, and PAS.

**Keywords:** Minocycline, Antituberculosis drugs, *In vitro* combined effect

**キーワードズ:** Minocycline, 抗結核剤, 試験管内併用効果

我々は前報<sup>1)2)</sup>で minocycline (MC) の *in vitro* 抗結核菌作用について報告した。本報では、これに続いて MC と抗結核剤との *in vitro* 併用効果について実験

した結果を報告する。

1958年に Tsukamura & Noda (東村, 野田)<sup>3)</sup>は抗結核剤の *in vitro* 併用効果の機作について観察した。

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Table 1. Combined Effect of Minocycline on *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv with Various Antituberculous Agents

Combined drug <sup>a</sup>	Minocycline concentration required for complete inhibition <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Bacterial suspension used for inoculation <sup>c</sup>		
	$10^{-1}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
None (control)	5	5	2.5
INH, 0.02 $\mu\text{g/ml}$	10	10	5
INH, 0.01 $\mu\text{g/ml}$	10	5	5
PAS, 0.05 $\mu\text{g/ml}$	2.5	2.5	0.32
PAS, 0.02 $\mu\text{g/ml}$	5	2.5	2.5
SM, 2 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
SM, 1 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
KM, 10 $\mu\text{g/ml}$	10	5	5
KM, 5 $\mu\text{g/ml}$	10	5	5
EB, 1 $\mu\text{g/ml}$	1.25	1.25	0.63
EB, 0.5 $\mu\text{g/ml}$	2.5	2.5	1.25
TH, 10 $\mu\text{g/ml}$	20	20	10
TH, 5 $\mu\text{g/ml}$	10	10	5
RFP, 2 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
RFP, 1 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
RFP, 0.5 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
EVM, 20 $\mu\text{g/ml}$	2.5	0.16	0.16
EVM, 10 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
CS, 5 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5
CS, 2.5 $\mu\text{g/ml}$	5	5	2.5

*Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv and Ogawa egg medium were used. A three-week-old culture of the test organism was suspended in a 0.1% Tween 80 solution to a concentration of 10 mg wet weight per ml. The suspension was diluted until  $10^{-6}$ , and 0.02 ml samples of  $10^{-1}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  dilutions were inoculated by a spiral loop onto each Ogawa egg medium, which contained minocycline with or without other antituberculous drug. The drugs were added to Ogawa egg medium before sterilization made by heating at  $90^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes. The concentrations of minocycline (minomycin) used for growth inhibition-tests were: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, and 0  $\mu\text{g/ml}$ . The reading of colonial growth was made after incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 4 weeks.

The  $10^{-1}$ ,  $10^{-4}$ , and  $10^{-5}$  suspensions gave a membranous confluent growth, a thin membranous growth, and 30 to 50 discrete colonies, respectively, on drug-free control medium. The size of colonies on control medium and on drug-containing medium were not so significantly different from each other so far observed macroscopically.

その結果によると併用効果は、通常、阻止下濃度の薬剤の組み合わせで観察されるが、各薬剤の発育可能菌数減少効果と発育速度遅延効果が重なり合うために、各薬剤が独立的に作用していても、2つの薬剤の併用で発育阻止が起こる。この発育阻止が往々にして特別の効果(synergism)の結果であると考えられやすいが、各薬剤が独立に作用しても、このような現象が起こりうる。例えば、阻止下濃度のSMとPASの組み合わせで完全発育阻止が起こるのは、SMとPASの発育遅延作用の重なりであると考えられた。したがって、薬剤の併用効果は、各薬剤が独立的に作用すると考えて説明できる範囲のものは相加作用(addition)と考えるべきで、相加作用で説明できない阻止効果が認められた場合のみ相乗作用(synergism)と呼ぶべきである。また、各薬剤が独立的に作用したと考えた効果より低い効果が得られた場合が拮抗作用(antagonism)に相当する。このような見地に立つて、MCと他の抗結核剤の

併用効果を観察した。

被検株として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv株を使用した。また、培地は1%小川培地を使用した。MCは静注用 minomycin (Lederle-Japan)を使用し、滅菌前の培地に次の終末濃度となるように添加した: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0  $\mu\text{g/ml}$ 。MCを含まぬ対照培地は2本を使用したので、10本1組となる。他の抗結核剤の添加濃度は表1に示してある。これら抗結核剤の添加濃度は既報<sup>4)</sup>の実験結果から菌の発育を少しく遅延させる濃度を用いた。但し、INHは作用が“all or none”-typeであったため、阻止下濃度は無作用濃度となった<sup>4)</sup>。また、KMも使用した10  $\mu\text{g/ml}$ および5  $\mu\text{g/ml}$ は、KM単独では無作用域にとどまった。

上記のMC濃度と抗結核剤濃度の組み合わせの180種の培地を作った。対照は2本としたので培地200本が1組となり、使用菌液の種類4種に応じて200本×4組=

800本の培地を使用した。培地は165×16.5mmの試験管に分注し、90°C60分の滅菌によって斜面培地に仕上げた。

H37R<sub>v</sub>株は小川培地10本に37°C 3週間培養し、菌をガラス玉コルペン中で振盪して均一化した後、湿菌量10mg/mlの菌液とした。菌液作製および希釈の溶媒としては0.1% Tween80水溶液を用いた。菌液を10<sup>-6</sup>まで10倍希釈し、10<sup>-1</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>の4菌液から渦巻白金耳(0.02ml接種量)で各培地に接種した。培地は穴あきダブルゴム栓を施し、37°C 4週間培養した後、発育を観察した。

表1に実験結果を示す、発育阻止濃度は文字通り完全発育阻止濃度を示した。実験に用いた抗結核剤培地単独では、対照培地(薬剤なし)と比較して、集落の大きさに著明な差はなかった。また、集落数も10<sup>-5</sup>菌液接種でみた場合、対照培地34および35、INH0.02μg/ml培地37および39、INH0.01μg/ml培地46および51、PAS0.05μg/ml培地29および46、PAS0.02μg/ml培地49および52などで、薬剤含有培地の集落数は最低29、最高54であった。10<sup>-4</sup>菌液接種の場合および10<sup>-1</sup>菌液接種の場合、対照培地と抗結核剤単独培地の発育は、10<sup>-4</sup>菌液接種で薄膜発育、10<sup>-1</sup>菌液接種で膜状発育がみられた。対照培地と抗結核剤単独培地の発育の間に差はみられなかった。以上のように、単独では、一見、結核菌の発育に著明な影響がないようにみえる抗結核剤濃度でも、MCと併用すると、MCの発育阻止作用にかなり著明な影響を与えた。

表1に示すごとく、「阻止下濃度」(いわゆる“subinhibitory concentration”)のINH、TH、KMの添加によってMCの作用は減弱し、発育阻止のために対照(MC単独)以上の量のMCが必要になった。これに対して、「阻止下濃度」のEB、PAS、EVMの添加では、対照(MC単独)よりも少量のMCで発育阻止が起こった。また、「阻止下濃度」のSM、RFP、CSでは、MCの発育阻止濃度は対照(MC単独)と変りがなかった。

抗結核剤の結核菌の発育に与える効果は、集落形成菌減少作用と発育速度遅延作用に分けることができる<sup>3)</sup>。本報の実験に用いた抗結核剤の濃度は、集落数には殆んど影響を与えないが、菌の発育速度を若干遅延させるものであった<sup>4)</sup>。ただ、INHは発育阻止濃度以下では殆んど発育速度に影響を与えない<sup>4)</sup>。また、本報で使用したKM濃度も発育速度に殆んど影響を与えぬものであった<sup>4)</sup>。

以上のように、INHとKMとは単独では無影響濃度と思われたにもかかわらず、MCと併用してみるとMCの作用を減弱させた。即ち、MCとINH、またはMCとKMとは拮抗的に作用する(INHおよびKMがMCの作用に拮抗する)ように思われる。THは単独で明らかに発育遅延作用を持つ濃度であるのに、THとの共存で

MCの発育阻止が減弱してしまった。即ち、THは明らかにMCの作用に拮抗的に作用している。

SM、RFP、CSの併用では、MCの発育阻止濃度は影響されなかった。SM、RFP、CSは、それ自体、発育遅延的に作用する濃度であるから、MCとこれらの薬剤は互いに独立的に作用するか、あるいは若干拮抗的に作用しているかもしれない。しかし、たとえ、拮抗的に作用するにしても決して著明なものではないから、一応、相加作用とみなしてよいであろう。

EB、PAS、EVMについては、併用によりMCの発育阻止濃度が低くなっている。即ち、MCとこれらとは独立的に作用する以上の効を發揮しているようにもみうけられた。即ち、相乗作用を示している可能性があり、少なくとも相加作用がすることは間違いない。したがって、MCとEB、PASまたはEVMの組み合わせは、よい組み合わせであると思われる。

註)前報<sup>2)</sup>でMCの*M. tuberculosis*H37R<sub>v</sub>株に対する発育阻止濃度は2 μg/mlと報告したが、今回の実験では5 μg/mlとなった。これは実験誤差の可能性もあるが、前回は発育阻止濃度判定を37°C 3週後に行なったのに対し、今回は37°C 4週後に行なったことが関係していると思われる。

結論として、*Mycobacterium tuberculosis*H37R<sub>v</sub>株に対するminocycline(MC)の発育阻止作用に対して、「阻止下濃度」の抗結核剤の併用がいかなる影響を与えるかを観察し、次の結果を得た。1)TH、INH、KMはMCの作用に対して拮抗的に作用した。2)SM、RFP、CSはMCの作用に対して著明な影響を与えなかった。3)EB、PAS、EVMはMCの作用に対して、おそらく相乗的に、少なくとも相加的に作用するものと思われた。

## 文 献

- 1) Tsukamura, M.: *In-vitro* antimycobacterial activity of minocycline, *Tubercle*, 61: 37-38, 1980.
- 2) 東村道雄・水野松司: Minocyclineの抗結核菌作用(試験管内実験), *結核* 58: 379-384, 1983.
- 3) Tsukamura, M. and Noda, Y.: The mechanism of the combined effect of antituberculous drugs, *Am Rev Tuberc Pulm Dis*, 78: 121-126, 1958.
- 4) 東村道雄・水野松司: 抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較, *結核*, 55: 365-370, 1980.