

数種抗結核剤の薬剤効果に関する基礎的研究

第二編

Pyrazinamide の基礎実験

岡山大学医学部平木内科教室（主任・平木 潔教授）

吉川 潔

〔昭和33年6月18日受稿〕

目 次

第1章 緒 言	第3章 マウス結核症に対する治療実験
第2章 試験管内実験	第4章 $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 株感染マウス結核症に対する治療実験
第1節 試験管内結核菌発育阻止作用	第5章 総括並に考按
第2節 他抗結核剤との併用実験	第6章 結 論
第3節 $H_{37}Rv$ R-INAH 株に対する Pza. INAH 併用実験	文 献

第1章 緒 言

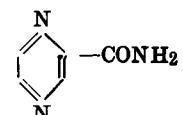
結核化学療法に関する研究は SM, Pas, Tbi, INAH 及びその誘導体と近時長足の進歩をとげたが、これら化学療法剤に対する耐性が早晚出現する事が知られて以来、耐性出現防止が重要な問題となり間欠療法、併用療法が工夫され、その効果が認められて来ている。しかしこれら既知の抗結核剤に対する耐性を、すでに獲得した患者の治療に新しい抗結核剤の出現こそ望ましく、こうした要望に答え最近世に出たのが Pyrazinamide (以下 Pza と略す) である。

1948年 Mckenzie¹³⁾ が Nicotinamide は試験管内抗菌力の割にマウスのスクリーニングテストに於て SM に勝る効果を認めて以来、Kuschner⁶⁾ は Pyperazin 核を有し、かつ Nicotinamide によく似た物質を幾種類か合成し、マウスにより詳細な実験の結果、酸アミドの内で Pza が最も強力な抗結核作用をもつてゐる事を知つた。しかし初期の臨床実験が Pza 単独で行われ所期の効果が得られなかつたのみならず、副作用として肝機能障害を起すと報ぜられ、一時 INAH の華々しい登場の蔭にかくれてしまつた感があつた。しかし1953年 Schwarz and Moyer et al¹⁵⁾ により Pza と INAH と併用する事により意外に奏効する事が明かにされ再び注目さ

れるようになつた。しかるに一方我国では島本²⁷⁾、北本²⁸⁾、三友³⁵⁾ 等により昭和29年来 Pza について紹介されているのみで、詳細な基礎的実験は行なわれていない。よつて私は *in vitro* の単独及び併用実験、マウスによる単独及び併用治療実験を行なつたので茲に報告する。

Pza は次のような化学構造を有する無臭の白色柱状結晶で、融点は188~193°Cである。水には僅かに溶けるが (約1%)、アルコール、エーテル、クロロホルムには溶け難い。熱には安定で、pH 3~10の範囲内では常温並びに短時間の加熱に耐える。

pyrazinamide



分子量 123.12

第2章 試験管内実験

第1節 試験管内結核菌発育阻止作用

1. 実験方法

使用菌株ならびに培地： $H_{37}Rv$, $H_{37}Rv$ R-INAH 株 (予研分与) の小川培地上培養2週目の菌塊をとりガラス玉入り硬質コルベンにて手振法にて 1 mg/cc の均等菌液を調製した。この菌液の

0.1 cc を10%血清加 Kirchner 培地に接種、培養2~3週の発育を読み、3週の最高発育許容濃度を採用した。

培地に含ませた薬剤 あらかじめ滅菌蒸溜水にて加温溶解せしめ、25~1,000 γ /cc に稀釀使用した。

2. 実験成績

第1表に示した如く、H₃₇Rv 株に対し、200 γ にて発育を阻止した。H₃₇Rv R-INAH 株に対しては500 γ にてやつと発育を阻止した。

第2節 Pza と SM, Pas, INAH, INHG との併用実験

Pza の単独発育阻止濃度以下の量である50 γ を加え、之と他の抗結核剤との併用効果が in vitro で現われるかどうか実験した。

1. 実験方法

10%血清加 Kirchner 培地に第2, 3表に示す如く SM, Pas, INAH, INHG のそれぞれの単独発育阻止濃度までの稀釀系列を作り、之に Pza 50 γ を加え、H₃₇Rv 株 0.1 mg を接種、3週後判定した。

2. 実験成績

i) Pza, INAH 併用実験

INAH 単独では0.07 γ にて発育を阻止したに対

し、併用では0.04 γ にて発育を阻止した。即ち INAH の抗菌作用は併用により1.8倍に増強された。

ii) Pza, INHG 併用実験

併用効果は INAH と全く同様であつた。

iii) Pza, SM 併用実験

SM 単独では1.0 γ にて発育を阻止し、併用では0.6 γ にて抗生作用を現わした。即ち SM の抗菌作用は1.7倍に増強された。

iv) Pza, Pas 併用実験

Pas 単独の発育阻止濃度は SM と同じく1.0 γ であり、Pas に Pza を併用しても、やはり発育阻止濃度に変化はなかつた。即ち併用効果は全く認められなかつた。

第3節 H₃₇Rv R-INAH 株に対する Pza, INAH 併用実験

1. 実験方法

前述の INAH, Pza 50 γ 併用実験と同じく、ただ接種菌として H₃₇Rv R-INAH 100 γ 株を使用した。

2. 実験成績

第4表に示した如く INAH 単独では100 γ で発育を阻止し、INAH, Pza 併用にても同じく100 γ にて発育を阻止した。即ち INAH 耐性菌に対して

第1表 Pza の結核菌発育阻止作用

	対	20	50	100	200	300	400	500	750	1000
H ₃₇ Rv	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv R· INAH	卅	卅	卅	+	+	+	+	-	-	-
	卅	卅	卅	+	+	+	+	-	-	-

第2表 SM と Pza 50 γ 併用実験

	対	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1.0
SM	卅	卅	卅	+	+	+	-
	卅	卅	+	+	+	-	-
SM+Pza	卅	卅	+	+	-	-	-
	卅	卅	+	±	-	-	-
Pas	卅	卅	卅	+	+	+	-
	卅	卅	卅	+	+	+	-
Pas+Pza	卅	卅	卅	+	+	+	-
	卅	卅	卅	+	±	-	-

第3表 INAH と Pza 50 γ 併用実験

	対	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
INAH	卅	卅	+	+	+	-	-
	卅	卅	+	+	-	-	-
INAH+Pza	卅	+	-	雜	-	-	-
	卅	+	-	-	-	-	-
INHG	卅	卅	+	+	+	±	-
	卅	卅	+	+	±	-	-
INHG+Pza	卅	+	±	-	-	-	-
	卅	+	-	-	-	-	-

第4表 $H_{37}Rv$ ・INAH株に対するPza・INAH併用実験

	対	1	5	10	20	40	60	80	100	200
INAH・Pza	#	#	#	+	+	+	+	+	-	-
	#	#	#	+	+	±	±	-	-	-
INAH	#	#	#	#	+	+	+	+	-	-
	#	#	#	+	+	+	+	+	-	-

は併用効果は全く認められなかつた。しかしINAH単独に比し、併用では菌の発育の程度はかなり悪かつた。

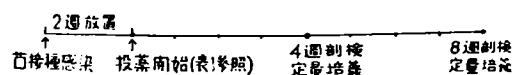
第3章 マウス結核症に対する治療実験

1. 実験方法

人型結核菌標準株 $H_{37}Rv$ の1%小川培地上1週間培養より、型の如く生理的食塩水を加え水晶玉入り丸底コルベンにて手振法により1mg/ccの平等菌浮遊液を作り、その0.1ccを体重16g前後の雄性マウスの尾静脈に接種、2週間放置後、治療を開始した。なお生菌数は 10^4 22であつた。

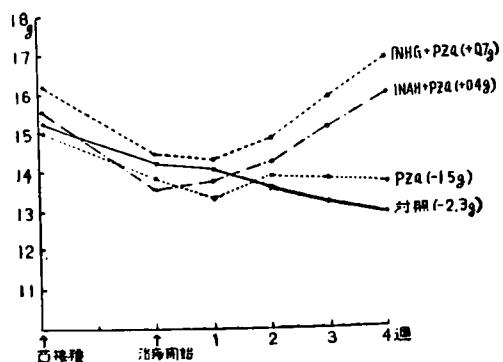
群編成は第5表に示した如く、第1実験、4群(Pza単独群、Pza+INAH併用群、Pza+INHG併用群、対照群)に分け、1群10匹宛使用し、薬剤は0.1cc中にPza 250mg/kg、INAH 50mg/kg、INHG 500mg/kgに含む水溶液となし、表5に示

図1 動物実験要領



第5表 実験動物の編成と投薬の種類、組合用量及び投与方法

実験	マウス				抗結核剤		投与法	
	群別	数			種類及び用量			
		実験開始時	4週剖検時	8週剖検時	死亡			
I	I	10	5	4	1	INAH 50mg/kg + Pza 250mg/kg	大腿皮下注	
	II	10	5	5	0	INHG 500mg/kg + Pza 250mg/kg		
	III	10	4	4	2	Pza 250mg/kg		
	IV	10	5	3	2	対照		
II	I	10	5	4	1	INAH 50mg/kg + Pza 250mg/kg	" " " "	
	II	10	5	4	1	INHG 500mg/kg + Pza 250mg/kg		
	III	10	5	3	2	Pza 250mg/kg		
	IV	10	5	3	2	対照		

図2 $H_{37}Rv$ 感染マウスの平均体重の変動

した組合せ、及び投薬の量にて全群とも毎日1回大腿皮下に注射し、しかも図2に示した要領に従い8週間投薬を続け、うち半数を途中4週にて薬剤投与を中止し、その翌日より屠殺し、肺、肝、脾の肉眼的病変の程度及び結核結節の多少を検し、そのうち各群2匹宛、肺、肝、脾の臓器内結核菌定量培養を行い、残りは8週治療後、同様な諸検索を行つた。

臓器結核菌定量培養は各臓器をガラスホモゲナイザーにて磨碎し平等乳剤となし、4%苛性ソーダにて50倍、500倍に稀釀し、その0.1ccを3%小川培地に夫々3本宛培養し、週1回取り出して生じた集

落数を算定し、判定は4週間にて行つた。なお生じた集落については INAH 及び INHG に対する耐性測定を行つた。

耐性測定方法：INAH を 1% 小川培地に各薬剤濃度がそれぞれ 0, 0.1, 1.0, 10.0, 30.0, 60.0, 100 μ /cc になるように加えた耐性培地を作り、定量培養により、マウスより分離した各治療群の菌株をそれぞれ硝子玉入り硬質コルベンにて手振法により 0.1 mg/cc の平等菌液となしその 0.1 cc を各段階の小川耐性培地に接種し、4週間後判定した。

2. 実験成績

1) 一般状態

対症群は過を追つて運動不活潑となり4週目頃には立毛し、目を閉じてうずくまり元気がなかつた。次で Pza 単独群が元気なく、他の群は比較的元気で経過し屠殺前には非接種の健康マウスに近くなつた。

2) 体重の推移

第2図に示した如く、菌静脈内接種と共に各群とも次第に平均体重は減少し、特に対照群にひどく、屠殺時には -2.3 g の減少を來した。之に反し治療群は治療開始3週目頃より次第に体重は増加し始め Pza+INAH 群は 0.4 g, Pza+INHG 群は 0.7 g の増加を示した。之に反し Pza 単独群は 1.5 g の減

少を示した。

3) 死亡数

対照群、Pza 単独群に各 2 匹、Pza+INAH 群は 1 匹屠殺前に死亡した。

4) 肉眼的剖検所見

治療開始4週後に屠殺したマウスの各臓器の剖検所見は第6表に示した通りである。

肺臓：対照群は腫脹し、重量も増し、大きな結節が全例に多数認められた。Pza 単独群は4例中1例に明かに結核結節を認め、2例に病的と思われる所見を得た。しかし腫脹、重量増大の度は対照群に比べ幾分軽度であった。Pza+INAH, Pza+INHG 群は共に全例全く結核結節を認めず、臓器腫脹、重量増大の度も対照群に比し極めて少なかつた。

肝臓：結核性病変は余り明確でなく、変化も少なく、対照群の2例に軽度の病変を認めた外、治療群はいずれも全く所見はなかつた。

脾臓：対照群は腫脹し、重量も増し、全例結核結節が多数認められるも、肺程著明でなかつた。治療群では Pza 単独群に1例軽度の病変を見た外、Pza+INAH 群、Pza+INHG 群には全く所見は見られなかつた。

治療開始8週後に屠殺したマウスの各臓器の剖検所見は第7表の通りである。

第6表 $H_{37}Rv$ 感染、4週間治療せるマウスの剖検肉眼的所見

		INAH+Pza			INHG+Pza			Pza			対照		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
マウス	1	—	—	—	—	—	—	±	—	—	++	±	+
	2	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	±
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	+
	4	—	—	—	—	—	—	±	—	—	+	±	+
	5	—	—	—	—	—	—	死	亡	—	+	—	+

— ……外見上正常

± ……かすかに病的と思われるもの。

+ ……はつきり病的所見のあるもの。 ++ ……臓器の半分以上病的なもの。

死 ……臓器の殆んど全部が病的なもの。

第7表 $H_{37}Rv$ 感染、8週治療せるマウスの剖見肉眼的所見

		INAH+Pza			INHG+Pza			Pza			対照		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
マウス	1	±	—	—	—	—	—	+	—	—	++	±	++
	2	—	—	—	—	—	—	±	—	—	++	±	+
	3	—	—	±	—	—	±	—	—	—	++	±	++
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	死	亡	—
	5	—	—	—	死	亡	—	死	亡	—	死	亡	—

肺臓： 対照群全例に臓器の腫脹、多数の結節等、4週剖検時よりなお高度の病変を認めるも治療群ではPza単独群の4例中2例に、Pza+INHG群の5例中1例に結核結節らしき病変を見た外、異常はなかつた。

肝臓： 4週剖検所見同様変化少なく、対照群全例に僅かに臓器の腫脹があつた外、治療群には全く病的所見はなかつた。

脾臓 対照群は肺同様4週剖検時よりも結核結節も多く、腫脹、重量増大の度も著しかつたが、治療群ではPza+INHG群の1例に結核結節らしき個所のあつた外、全く異常を認めなかつた。

5) 組織内結核菌定量培養成績

4週治療後の定量培養成績は第8表に示す通りである。

第8表 $H_{37}Rv$ 感染マウスの臓器定量培養成績

		INAH+Pza			INHG+Pza			Pza			対照		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
4週	1	0.2	3	5	2	2	5	42	18	53	+	+	+
	2	1.2	1	8	1	0.8	2	29	26	50	++	+	++
8週	1	0	0	1.4	0.7	0	2	30	13	48	+	36	++
	2	0	1	0	0.5	1	2	28	21	37	++	++	++

数字……集落数を示す。

+………集落数100～200

++………培地2/3以上に発育し数へ難いもの。

++………培地全面に発育せるもの。

肺臓 対照群は殆んど数え得ぬ程、菌の発育を見たに反し、Pza単独群は2例の平均集落数35.5と減少し、Pza+INAH群は1.5、Pza+INHG群は0.7と併用群では極めて少なかつた。

肝臓： 対照群は157と多いが、Pza単独群は22、Pza+INAH群は2.0、Pza+INHG群は1.4といずれも減少した。

脾臓： 対照群は共に培地2/3以上に菌の発育を見たが、Pza単独群も平均集落数51.5と、なお多数の集落を認めた。しかしPza+INAH群、Pza+INHG群はそれぞれ3.5、6.5と著明に少なかつた。

8週治療後の定量培養成績は第8表に示した通りである。

肺臓： 対照群の無数の菌の発育に対し、Pza単独群は29と減少し、Pza+INHG群は0.6で著明に少なく、Pza+INAH群は2例とも菌の発育を見なかつた。

肝臓： 対照群の(++)に対し、Pza単独群は平均数27で少なく、Pza+INAH群、Pza+INHG群は共に1例にのみ2～3ヶの集落を認めたに過ぎなかつた。

脾臓： 対照群は(++)と殆んど培地全面に菌の発育を見たに反し、Pza単独群は42.5と減少し、

Pza+INHG群は2.0、Pza+INAH群は1例にのみ2～3ヶの集落を見たのみである。

6) 耐性度測定

治療開始8週後に屠殺したマウスより分離した結核菌について行つた各治療群のINAH及びINHGに対する耐性度測定成績は第9表に示した通りで、各群ともINAHに対する主効菌の感受性には変化は見られず、治療群に1.0 γ 、10.0 γ に、対照群に1.0 γ に発育する別効菌を認めたが、そのPopulationは極めて僅かであつた。

第9表 $H_{37}Rv$ 感染、8週治療後の耐性検査成績

	対照	0.1	1.0	10	30	60	100
INAH+Pza群	++	++	20	7	-	-	-
INHG+Pza群	++	++	54	2	-	-	-
Pza群	++	++	37	10	-	-	-
対照群	++	++	8	-	-	-	-

第4章 $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 株
感染マウスに対する治療
実験

1. 実験方法

1%小川培地上1週間培養の入型結核菌標準株 $H_{37}Rv$ より実験的に得られた INAH 10 γ 完全耐性株より、型の如く手振法にて 1 mg/cc の平等菌液となし、その 0.1 cc をマウス尾静脈内に接種、以下前述の $H_{37}Rv$ 株感染マウスに対する治療実験と全く同様の方法にて治療し、4~8週後諸検索を行なつた。なお生菌数は 10⁻⁴~16 であつた。

2. 実験成績

1) 一般状態

対照群及び Pza 単独群は過を追つて運動活潑となり元気がなかつたのに反し、Pza+INAH 群、Pza+INHG 群は比較的元気が経過したが、 $H_{37}Rv$ 株感染マウスに対する併用治療群には明かに劣つた。

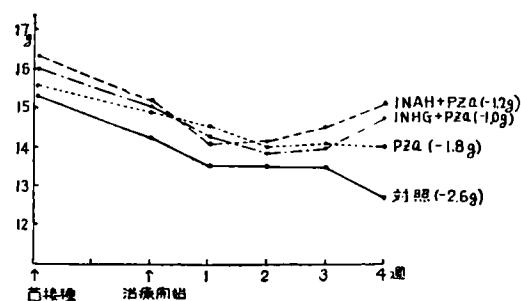
2) 死亡数

対照群、Pza 単独群は各 2 匹、Pza+INAH 群、Pza+INHG 群は各 1 匹屠殺前に死亡した。

3) 体重の推移

第 3 図に示した如く、菌接種と共に各群とも次第

図 3 $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 感染マウスの平均体重の変動



に平均体重は減少し始め、特に対照群は減少の一途をたどり屠殺時には -2.6 g, Pza 単独群は -1.8 g, 之に反し Pza+INAH 群、Pza+INHG 群は治療開始 2~3 週頃より僅かづつ増加し始めたが屠殺時にはなおそれぞれ -1.2 g, -1.0 g の減少を來した。

4) 肉眼的剖検所見

治療開始 4 週後に屠殺したマウスの各臓器の剖検所見は第 10 表に示した通りである。

肺臓： 対照群は腫脹し重量も増し大きな結節が全例に認められた。Pza 単独群は全例軽度腫脹し、5 例中 3 例に明かに結核結節を認め残り 2 例に結節と思われる所見を見た。Pza+INAH 群は 5 例中 1 例に明らかに結節を認めたのみであつた。Pza+INHG 群は 1 例に明に、3 例に軽度の結節を認めた。

肝臓： 結核性病変は明確でなく、変化も少なく、対照群の 2 例に軽度の充血腫脹を見た外、治療群はいずれも全く変化を見なかつた。

脾臓： 対照群は腫脹し、重量も増し全例に多数の結節を認めた。之に反し治療群では Pza 単独群に 1 例に明かに、1 例に極めて軽度の結節を見、Pza+INAH 群、Pza+INHG 群それぞれ 1 例であつて結節と思われる軽度の病巣を認めた外は全く異常なかつた。

治療開始 8 週後に屠殺したマウスの各臓器の剖検所見は第 11 表の通りである。

肺臓： 対照群は全例に高度の病変を認めた。Pza 単独群は 3 例中 2 例に、Pza+INAH 群、Pza+INHG 群は各々 1 例に明かに結節を認めた。

肝臓： 4 週剖検時と同様変化少なく、対照群の 1 例に結節らしき病巣を見た外、治療群には外見上全く異常はなかつた。

脾臓： 対照群は 4 週剖検時より腫脹、重量増加、結節形成は著しかつた。之に反し治療群では Pza+

第 10 表 $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 感染、4 週間治療せるマウスの剖検肉眼的所見

	INAH+Pza			INHG+Pza			Pza			対照		
	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
マウス	1	±	-	-	+	-	±	+	-	+	±	±
	2	±	-	-	±	-	±	-	-	+	±	+
	3	+	-	±	±	-	±	-	-	+	-	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	-	±	-	+
	5	±	-	-	-	-	-	+	-	-	±	+

第11表 $H_{37}RvR \cdot INAH10\gamma$ 感染、8週間治療せるマウスの剖検肉眼的所見

		INAH+Pza			INHG+Pza			Pza			対照		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
マウス	1	±	—	—	+	—	+	+	—	±	卅	±	+
	2	+	—	±	—	—	+	—	±	卅	—	卅	—
	3	—	—	—	±	—	±	—	—	卅	—	卅	—
	4	—	—	—	—	—	死	亡	死	死	死	死	死
	5	死	亡	死	亡	死	死	死	亡	死	死	死	亡

INHG 群の 1 例に明かに結節を認め Pza 単独群に 2 例、 Pza+INAH 群に 1 例結節らしき所見を見た外、異常なかつた。

5) 組織内結核菌定量培養成績

4週治療後の定量培養成績は第12表の通りである。

肺臓： 対照群の (卅) に対し、 Pza 単独群は 1 例は集落数 100ヶ以上、他の 1 例は 45ヶとなお多いが、 Pza+INAH 群は 2 匹の平均集落数 11.5、 Pza+INHG 群は 3.5 と併用群はいずれも少なかつ

た。

肝臓： 対照群は 60 で多く、 Pza 群は 31.5 と $1/2$ に減少し、 Pza+INAH 群 8.5、 Pza+INHG 群 4 と併用群は効果的であつた。

脾臓： 対照群は殆んど培地全面に菌の発育を見た。一方 Pza 群も余り効果なく 2 例とも 100 であり、 Pza+INAH 群は 22.5、 Pza+INHG 群は 55 とこれ又かなり多数の集落を認めた。

第12表 $H_{37}RvR \cdot INAH10\gamma$ 感染マウスの臓器定量培養成績

		INAH+Pza			INHG+Pza			Pza			対照		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
4週	1	4	7	30	2	5	25	+	25	+	+	37	卅
	2	19	10	88	5	3	20	45	38	+	卅	82	卅
8週	1	0	4	12	0.4	0.2	16	+	38	+	+	20	卅
	2	0.8	0	8	0	6	5	84	52	+	80	17	卅

8週治療後の定量培養成績は第12表に示した通りである。

肺臓： 対照群は 1 例に 80ヶ、 1 例に 100ヶ以上の集落を認め、 Pza 群も 1 例に 85ヶ、 1 例に 100ヶ以上と対照群と殆んど同数の集落を見た。之に反し Pza+INAH 群は 0.4、 Pza+INHG 群は 0.2 と非常に効果的であつた。

肝臓： 対照群は 18.5 なるに反し、 Pza 単独群は

40 と却つてより多くの集落を認めた。しかし Pza+INAH 群は 2、 Pza+INHG 群は 3.1 とこれ又優れた効果を認めた。

脾臓： 対照群は 2 例とも培地 $2/3$ 以上に集落をみた。一方 Pza 単独群は 2 例とも 100ヶ以上の集落を認め余り効果なく、 Pza+INAH 群は 10.5、 Pza+INHG 群は 10 と併用群は著効を見た。

6) 耐性度測定

治療開始 8 週後に屠殺したマウスより分離した結核菌について行なつた INAH、 INHG に対する耐性測定成績は第13表に示した通りである。各群とも INAH に対する主効菌の感受性には変化は見られず、対照群に 30γ 、治療群に 30 、 60 、 100γ に発育する別効菌を認めたが、その Population は極めて僅かであつた。

第13表 $H_{37}RvR \cdot INAH10\gamma$ 感染、

8 週治療後の耐性検査成績

	対照	0.1	1.0	10	30	60	100	γ
INAH+Pza 群	卅	卅	卅	卅	20	15	—	
INHG+Pza 群	卅	卅	卅	卅	67	6	11	
pza 群	卅	卅	卅	卅	32	—	—	
対照群	卅	卅	卅	卅	41	7	2	

第5章 総括並に考按

Kushner et al¹⁶) により発見されて以来、実験結核及び臨床にはなはだ良い成績を報告されつつある Pza の in vitro の Activity は如何なものであろうか。

Pza の結核菌発育阻止作用については Dessau⁴) et al は未だ Pza を投与していない患者より分離した結核菌に対し、100~1,000 γ /cc で完全に発育を阻止し、1~10 γ で部分的阻止を見ると報告し、Steenken and Wolensky²⁰) は H₃₇Rv 株に対し 200 γ /cc で、又長村³⁴) は 500 γ /cc で完全阻止すると報告している。長沢³³) は 100~1,000 γ /cc でやつと阻止力を示すに過ぎず、特に INAH 耐性菌に対しては 1,000 γ /cc で僅かに阻止力を認める程度であると述べている。しかし一方高階²⁹) は SM, Pas に交叉耐性なく却つてそれ等の耐性菌に対する方がより低い濃度で発育阻止が見られるように思われたと報告している。私の実験でも H₃₇Rv 株に対し 200 γ /cc で発育を阻止し、上記諸氏の報告とほぼ一致した。又 H₃₇Rv R-INAH に対しては 500 γ /cc で発育を阻止した点は高階²⁹) の報告と異なる。以上の如く Pza 単独での抗菌作用は極めて微弱なものであるが、1953年 Pza と INAH を併用すると意外に奏効する事が Schwartz and Moyer¹⁵) によって発見され再び注目されるようになった。

次に in vitro の Pza と SM, Pas, INAH 各々との併用効果について高橋³⁰) は三剤共に或る程度の併用効果を示し、本剤と INAH との併用が特に有効であるとの成績は得られなかつたと報告している。一方中村³²) は S.C.C. にて INAH との併用はその効果を増強かつ持続せしめると述べ、高階²⁹) は SM とも相当に協力するが、INAH との協力作用が最も優秀であり、Pas とは交叉耐性を思わず成績が出たと報告している。

私の実験では SM とはかなりの協力作用を示したが、一方 Pas との併用は全くその効果を見ず、INAH, INHG とは相乘的併用効果を示し長村³⁴), 高階²⁹) の報告及び多くの in vivo 及び臨床成績と一致した。

この点なぜ INAH とのみ優れた併用効果を現わすのか不明であるが、McDermott¹¹) の報告によると Pza は酸性側の方でより強い抗菌力を発揮すると述べており、従つて SM の如くアルカリ性側で抗菌作用を現わす薬剤との併用は意味が少ないのである。

も知れない。いずれにせよそのメカニズムは興味ある問題と思われる。

次に INAH 耐性菌を喀出する患者增加の現状に鑑み、INAH 耐性菌に対する Pza, INAH 併用効果を検した結果、併用効果の全く見られなかつた事は Schwartz & Moyer¹⁷) が本療法実施前、臨床的又は細菌学的に INAH 又は Pza のいずれか一方に抵抗性のある患者では抵抗性のない他方の薬剤、即ち Pza か、INAH か、何れか単独の効果が一過性に見られるのみであると述べているのに一致する。

動物の実験結核に対する Pza の効果については古くは1952年 Frederick⁵) の SM と Pas との中間に位するとの報告に始まり、Malone et al¹⁷) はマウス結核症に対し Pza は僅かにその生存期間を延長し、少しく抗菌力を有するといい、又 Solotrovsky¹⁸), Dessau⁴) は Pas よりも優れた効果を示すと述べている。

私の実験では Pza 250 mg/kg 単独投与では体重の減少も他群に比し比較的多く、肉眼的に肺、脾に於て結核結節、臓器の充血腫脹を認めるもの多く、又定量培養の集落数も特に肺、脾に多く見られ、併用群及び山下³⁸) の INAH 50 mg/kg, INHG 500 mg/kg 単独投与に比し明かに劣つた。

以上の動物実験及び Yeager¹⁹), Schwartz¹⁵), Cordice²¹ 等の Pza 単独投与の臨床実験でも、かなり有効なるも急激に耐性が出来るのが欠点であるという報告等より併用療法が浮び上つて来た。

1953年 Schwartz & Moyer¹⁵) 及び McDermott¹¹) はマウス結核症にて Pza+SM, Pza+Pas, Pza+INAH との併用療法中、Pza と INAH との併用が他のいかなる単独及び併用療法より有効であると報告し、次で McCune⁹) はマウス結核症に対し、INAH 治療群では脾臓より菌が消失しないのに対し、Pza 治療群では半数に菌の消失が見られ、Pza+INAH 群では全例菌が消失し、本療法によつて生体内の結核菌は激減乃至絶滅されると述べ、本療法は従来の抗結核剤の常識を越え、いわば滅菌療法というべきものであると報告した。この実験は現在なお米国研究者の Pza, INAH 併用療法の実験的基礎になつてゐる。

一方我国では高橋³⁰) はマウス結核症に対し INAH 40 γ , IHMS 40 γ 単独投与は僅かの効果しか見られず、Pza 1 mg 群、Pza 10 mg+INAH 40 γ 群は相当の効果が見られるが、INAH 40 γ 併用の効果は殆んどなかつたと報告している。又堂野

前³¹⁾はマウス結核症に対し, Pza 5 mg + INAH 0.5 mgで30日間治療し, 宮本³⁷⁾も Pza 2.5 mg + INAH 100 γ 併用で15週治療し, いずれも Pza と INAH 併用は INAH 単独と同様の効果しかなかつたと否定的である。之に対し光井³⁶⁾は Pza 5 mg + INAH 60 γ 50日間治療し, 組織学的に, 他のいかなる抗結核剤よりも最も有効であると述べている。又高階²⁹⁾は Pza 2 mg + INAH 0.5 mg を併用し, マウス臓器定量培養上, 肝を除き優れた効果を現わし, 特に肺では1例に僅かの集落を見たのみであると報告している。同じく島本²⁶⁾もマウス結核症にて Pza は INAH と併用する時のみ SM, Pas 併用時にも見られぬ驚異的な滅菌効果を見たと報告している。

以上の如く我国の研究者間での実験動物結核に対する Pza, INAH 併用療法成績はまちまちである。

私の実験では Pza, INAH 併用群は Pza 単独群に比し, 一般状態もよく, 僅かながらも体重の増加が見られた。又肉眼的所見は4, 8週治療とも殆んど見られなかつたが, 臓器定量培養では4週治療にて各臓器とも, なお数個の集落を認めた。しかし8週治療後には肺には2例とも菌の発育を見ず, 肝, 脾には各1例に2~3ヶの集落を認めたのみである。

なお INHG はその毒性が INAH の 1/6 なので 500 mg/kg の極めて大量を併用したが, マウスの体重増加, 一般状態などは INAH 50 mg/kg より却つて勝つていた。肉眼的所見は8週剖検時に2例に病的と思われる所見を得た他は異常はなく, 各臓器とも数ヶの集落を認め, 又8週治療でもなお僅かながらも菌の発育を見, その成績は Pza + INAH 群に僅かに劣つていた。

以上は同時に実験した Pza 250 mg/kg 単独投与はいよいよ及ばず, 山下³⁸⁾の INAH 50 mg/kg, INHG 500 mg/kg 単独投与では及び得ない臓器内結核菌への滲透性, 並にその細胞内に存する結核菌の殺菌にある程度の成功を見たといえる。しかしながら肺を除き, 肝, 脾に僅かながらも菌の発育を見た事は, McCune⁹⁾, 島本等²⁶⁾のいう生体内結核菌の滅菌療法というべき程の効果とはいえないが, 前述の光井³⁶⁾, 高階²⁹⁾等の報告とほぼ一致した。

McCune⁸⁾はマウスの脾に Eradication を起すためには Pza 1日 1 g/kg 位を少くとも 8 週間与えねばならないと述べているが, 私の実験では投与期間は同じく8週間でも, 使用量は 250 mg/kg でありこの差も考慮に入れねばならないであろう。

なお併用効果の見られなかつたという高橋³⁰⁾は Pza 500 mg/kg 7週間, 堂野前³¹⁾は Pza 250 mg/kg 30日間, 宮本³⁷⁾は Pza 150 mg/kg 15週間といずれも Pza の投与量, 投与期間とも非常に少なかつた。

なお現在人間に於ける使用量は通常1日 50 mg/kg であり, McCune⁸⁾の所謂マウス脾臓に Eradication を起すに充分な量の 1/20 に過ぎず, SM のマウス実験結核症に用いる有効量が通常人体に用いる量の 2.5~5 倍であるのに比較し, McCune の実験では非常に大量が使用されている点は注目に値する。

次に INAH 耐性発現以後の Pza 及び Pza + INAH, Pza + INHG の治療効果はどうであろうか。

沢田等²⁵⁾は INAH 0.1 γ 完全耐性菌をマウスに接種 Pza 50 mg/kg 及び Pza 50 mg/kg + INAH 10 mg/kg, Pza 50 mg/kg + IHMS 40 mg/kg で6週間治療するも, 各群とも治療効果は期待出来なかつたと述べている。之に反し前述の高階²⁹⁾の報告は SM, Tb₁, INAH に耐性になつた菌を用いたものであるが, 生体内では感性菌と同様に, 或は屢々感性菌より以上に有効であつたと述べている。外国, 本邦とも上記2つの文献が見られるのみである。

私の実験では Pza 単独群は体重の減少も他群に比し多く, 対照群と同じく2匹が実験中に死亡し, 肉眼的所見も肺では全例に結核結節, 臓器の腫脹が見られ, 定量培養では肺, 肝とも多数の集落が見られ, 特に脾では2例とも 100ヶ以上の集落が見られ, 対照群に比し殆んど治療効果は見られなかつた。

次に Pza + INAH 群, Pza + INHG 群は共に, 特に肺に充血, 腫脹, 結核結節が見られたが, 肝, 脾の変化は少なく, 8週治療後の定量培養では肺, 肝とも1例には集落の発生を見ず, 他の1例も2~3ヶの集落を見たのみである。しかし脾には5~20ヶの集落の発生を見た。以上の如く対照群に比較し治療効果には見るべきものがあつた。勿論 H₃₇Rv 株感染マウスに対する治療効果には明かに劣つたが, 山下³⁸⁾の H₃₇Rv R-INAH 10 γ 株感染マウスに対する INAH 50 mg/kg, INHG 500 mg/kg 単独治療に比較し僅かに優れていた。なお Pza + INAH 群, Pza + INHG 群では治療効果に差は見られなかつた。

次に耐性発現について Solotrovsky¹⁹⁾, 染谷²⁸⁾は試験管内実験にて Pza の附加は INAH 耐性上昇を高度に抑制し, この事は Pza と INAH 併用療法が頗著な効果を示す裏付けとして甚だ意義深いものがあると述べている。

実験動物結核の Pza の耐性発現に関する文献は未だ之を見ない。私の 8 週治療後マウスより分離した結核菌について測定した成績では $H_{37}Rv$ 株感染マウスに対する治療実験、 $H_{37}RvR$ -INAH 株感染マウスに対する治療実験とも主効菌の耐性上昇は認められず、前者に於て Pza+INAH 群、Pza+INHG 群とも 10 γ に発育する別効菌を認め、後者では両群共に 100 γ に発育する別効菌を認めたが、山下³⁸⁾ の INAH、INHG 単独治療群でも耐性の上昇が見られなかつたので Pza 附加の効果は不明であつた。

以上、実験動物結核に対する治療効果が、人体内にそのまま現われて人体内病巣の結核菌が根絶されるとはもとより考えるわけにはいかない。しかしながら我国療研²⁴⁾ の臨床成績は Back ground factor (年令、性別、体力、病巣の性状等) を考慮すれば米国の報告と大差なく、殺菌的ではないが重症結核症に対し或る程度有効であると結論しており、私の動物実験の成績も生体内結核菌滅菌療法というべき程の効果は見られなかつた。

しかし Pza の実験結核症に対する意義は試験管内で認むべき抗結核作用がないにかかわらず、INAH を併用する事により、しかも大量長期使用する事により優れた効果を示す点にあると考えられる。

いずれにしても奏効機転の全然異なる、しかも極めて強力な抗結核剤の併用、即ち SM+Pas、Pza+INAH の 2 群を得た事は結核化学療法の長期計画立案その他に対し、重大な進歩を意味するものである。

第6章 結 論

Pza の *in vitro*, *in vivo* の単独及び併用実験を行い次の結果を得た。

1) Pza の単独発育阻止濃度は $H_{37}Rv$ 株に対し

文

- 1) Campagna et al. : Am. Rev. Tuber., 69, 334, 1954.
- 2) Cordice Am. Rev. Tuber., 69, 319, 1954 より引用。
- 3) Dessau et al. Am. Rev. Tuber., 65, 519, 1952.
- 4) Dessau et al. 新薬と臨床, 4, 8, 昭30中村論文より引用。
- 5) Frederic : Am. Rev. Tuber., 65, 519, 1952.
- 6) Kuschner J. Am. Chem. Soc., 74, 3617, 1952.
- 7) Malone Am. Rev. Tuber., 65, 511, 1952.
- 8) Mc Cune and Tompsett Transaction of the 14th Conferens on the Chemotherapy of Tuber. Febr., 1955.
- 9) Mc Cune and Tompsett : 呼吸器診療, 11, 59,

200 γ であつた。

2) Pza, SM はかなりの協同作用を示したが Pas との併用は全くその効果を見ず、INAH, INHG とは相乘的併用効果を認めた。

3) INAH 耐性菌に対する Pza, INAH の試験管内併用効果は全く見られなかつた。

4) マウス結核症に対する Pza 250 mg/kg 単独治療の効果は INAH 50 mg/kg, INHG 500 mg/kg 単独治療に劣つていた。

5) マウス結核法に対する Pza 250 mg/kg + INAH 50 mg/kg, Pza 250 mg/kg + INHG 500 mg/kg 併用療法の効果は INAH, INHG 単独療法に比し優れていた。しかし生体内結核菌滅菌療法というべき程の効果は見られなかつた。又 Pza, INHG 併用群は Pza, INAH 併用群に僅かに劣つていた。

6) $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 株感染マウス結核症に対し、Pza 250 mg/kg 単独治療の効果は殆んど見られなかつた。

7) $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 株感染マウス結核症に対し Pza+INAH, Pza+INHG 併用療法は有効であり INAH, INHG 単独治療に比し、僅かに優れていた。なお Pza+INAH 併用群、Pza+INHG 併用群では治療効果に差は見られなかつた。

8) $H_{37}Rv$ 株感染マウス結核症、 $H_{37}Rv$ R-INAH 10 γ 株感染マウス結核症に対し、両群とも 8 週間の治療では INAH, INHG に対する耐性上昇は認められず Pza 附加の耐性上昇抑制効果は不明であつた。

擇筆するにあたり御指導、御校閲を頂いた恩師平木教授並に大藤助教授に深甚なる感謝の意を表する。

(本報告の要旨は第31回日本結核病学会総会及び第6回中・四国地方結核病学会にて報告した)

献

- 昭30高橋論文より引用。
- 10) Mc Dermott et al. Transaction 13 th V. a. Army-Navy conf. on the chemotherapy of Tuber., 170, 1954.
- 11) Mc Dermott et al. Am. Rev. Tuber., 69, 319, 1954.
- 12) Mc Dermott et al. Am. Rev. Tuber., 70, 748, 1954.
- 13) Mckenzie. J. Lab. Chlin. Med., 33, 1243, 1948.
- 14) Muschenheim Am. Rev. Tuber., 70, 743, 1954.
- 15) Schwartz et al. Transaction 12 th V. a. Army-Navy Conf. on the chemotherapy of Tuber., 296, 1953.
- 16) Schwartz and Moyer Am. Rev. Tuber., 70, 413, 1954.
- 17) Schwartz and Moyer Am. Rev. Tuber., 69, 319, 1954より引用。
- 18) Solotrovsky : Transaction of 13 th V. a. Army-Navy Conf. on the chemotherapy of Tuber. Febr., 1954.
- 19) Solotrovsky 総合医学, 12, 631, 高橋文献
- より引用。
- 20) Steenken and Wolensky. Am. Rev. Tuber., 70, 367, 1954.
- 21) Yeager et al. Am. Rev. Tub., 15, 523, 1952.
- 22) 大藤他: 治療, 38, 636, 昭31.
- 23) 北本: 最新医学, 9, 436, 昭29.
- 24) 厚生省療研報告: 医事新報, 1646, 3, 昭30.
- 25) 沢田 結核, 31, 526, 昭31.
- 26) 島本: 医事新報, 1541, 5, 昭28.
- 27) 島本: 最新医学, 10, 115, 昭30.
- 28) 染谷: 厚生省療研協議会報告書, 昭30.
- 29) 高階: 総合医学, 12, 631, 昭30.
- 30) 高橋 日結, 14, 910, 昭30.
- 31) 堂野前 結核, 31, 180, 昭31.
- 32) 中村: 新薬と臨床, 4, 515, 昭30.
- 33) 長沢: 最新医学, 10, 897, 昭30.
- 34) 長村他: 新薬と臨床, 5, 231, 昭31.
- 35) 三友 日結, 13, 793, 昭29.
- 36) 光井: 結核, 31, 525, 昭31.
- 37) 宮本 結核, 31, 674, 昭31.
- 38) 山下 岡山医学会雑誌, 発表予定。

Fundamental Studies on the Effect of Several Anti-Tuberculous Agents

Part 2. Fundamental Study with Pyrazinamide

By

Kiyoshi Yoshikawa

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

By performing in vitro and in vivo experiments with pyrazinamide (Pza) separately and in combination with other drugs, the author obtained the following results:

1. The concentration at which Pza, acting alone, inhibits the growth of H₃₇Rv strain proves to be 200 μ /1cc.
2. Pza and SM in combination act quite collaborately, but either one of these in combination with PAS has no effect inhibiting the growth of tuberculous bacilli at all. However, Pza in combination with INAH or INHG presents a multiple action assisting one another.
3. The therapeutic effect to experimental mouse tuberculosis of Pza (250 mg/kg) alone is inferior to that of INAH (50mg/kg) or INHG (500 mg/kg) given separately.
4. The effect of the treatment with Pza (250 mg/kg) + INAH (50 mg/kg), or Pza

(250 mg/kg)+INHG (500 mg/kg) is superior to that of INAH or INHG alone, but this effect is not so efficacious enough to be valued as a bacteriocidal treatment in vivo. Moreover, the combination of Pza with INHG is slightly inferior to the combination of Pza with INAH.

5. The use pf Pza (250mg/kg) alone on the mouse tuberculosis induced by the infection of INAH-10 -resistant strain gives hardly any therapeutic effect.

6. The combinations of Pza-INAH and Pza-INHG are effective for the treatment of mouse tuverculosis induced by the infection of INAH-107-resistant strain. The effect of the combination therapy is slightly better than that of INAH or INHG alone, but the combination therapy of Pza with INAH does not differ from that of Pza with INHG in effectiveness.
