

培地置換培養法による諸種 結核化学療法剤の静菌作用の検索

〔第5篇〕 INH 誘導体の静菌作用に就いて

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

神 田 瑞 雄

【内 容 抄 録】

本編では、今日細菌学的活性の点に就いて盛んに論議されている INH 誘導体の結核菌に対する静菌作用を検索した。

その結果、普通培養法に比して培地置換培養法を行なうと Isonicotinyl hydrazide methanesulfonate (IHMS) の静菌力は強くあらわれ、INH と同様の傾向を示したが、Streptomycylidene isonicotinyl hydrazine (SH) の静菌力は変りなく、Sodium glucuronate isonicotinyl hydrazone (INHG-Na) 及び Isonicotinyl hydrazinopyruvinate (IPN) の静菌力は却つて弱くあらわれる成績を得た。

従つて、IHMS 及び SH は誘導体そのままの形で、INHG-Na 及び IPN は培養中に INH を遊離する事により、強力な静菌作用を示すものと考えられる。

以上の成績より、本法は、培養中に静菌力を減弱する薬剤のみでなく、逆に分解によつて静菌力が増強する薬剤のより正確な静菌力を検索する有力な方法の一つであると思う。

緒 言

著者は培地を一定期間毎に置換しつつ培養を続けるといふ培地置換培養法(以下置換培養法)を考案し¹⁾、培養中に变化する恐れのある諸種抗結核剤の真の静菌作用を知る方法として、前編迄に Streptomycin, Dihydrostreptomycin, PAS, INH, TB1²⁾; Viomycin, Cycloserine, Kanamycin³⁾; Sulfisoxazole, Tetracycline, Cyanoacetic acid hydrazide, Isopropyl cyanoacetic acid hydrazone, S-Ethyl-L-cysteine⁴⁾

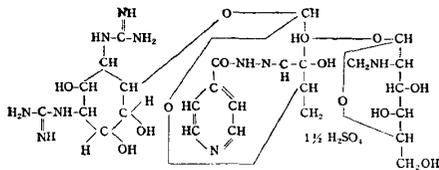
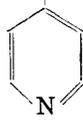
等の静菌作用を置換培養法により検索した。その結果培地置換を行なつた方がより強い静菌作用を示す薬剤のある事がわかつたのである。

さて本法は、培養中により強い静菌作用を示す物質に変化する薬剤を発見する方法となり得るのではないかと考えられる。このような考えのもとに、本編では今日細菌学的活性の点を盛んに論議されている INH 誘導体の静菌作用を本法によつて検索した次第である。

INH 誘導体として現在吾国で臨床的に用いられているのは、Isonicotinyl hydrazide methanesulfonate (以下 IHMS), Sodium glucuronate isonicotinyl hydrazone (以下 INHG-Na), Isonicotinyl hydrazinopyruvinate (以下 IPN) の3種と、Streptomycin との併用効果を期待した Streptomycylidene isonicotinyl hydrazine (以下 SH) とを併せて4種である。これ等の *in vitro* に於ける静菌力に就いては今日迄多数の報告がみられるが、概ね分子量から換算した INH 含有量に比例しているようで、当教室の内藤他⁵⁾¹⁰⁾、北川⁶⁾、今井⁷⁾、谷⁸⁾、前川他⁹⁾等の成績も概ね同様の傾向を示している。又さきに著者等が他の実験に附属して INH 誘導体の静菌力を同時に検討した成績によれば、10%血清加 Kirchner 培地を使用し、4週間培養後の発育阻止最低濃度(以下 MIC)は、IHMS 0.125~0.0625 γ /cc, INHG-Na 0.25~0.0625 γ /cc, IPN 0.125~0.0625 γ /cc, SH 0.125~0.25 γ /cc, INH 0.0625~0.0313 γ /cc 程度となつている。

一方これ等誘導体は生体内で分解、INHを遊離して始めて効果を示すのではないかとの疑問がもたれている。これは誘導体の多くは経口投

表 1 被 検 薬 剤

No.	化 学 名	略 号	化 学 構 造	分子量	INH 含有量
1	Isonicotinyl hydrazide methansulfonate	IHMS	$\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 	271.23	50.6%
2	Sodium glucuronate isonicotinyl hydrazone	INHG-Na	$\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{N}=\text{CH}(\text{CHOH})_4\text{COONa}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 	371.26	36.9%
3	Isonicotinyl hydrazino- pyruvinate	IPN	$\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{N}=\text{C}-\text{CH}_3$ $\text{COONa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 	301.28	45.6%
4	Streptomycilidene isonicotinyl hydrazine (Streptohydrazide)	S H		847.8	23.6%
5	Isonicotinyl hydrazide	INH	$\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{NH}_2$ 	137.14	100%

与より非経口投与の方が毒性が低く、又非経口投与では治療効果を示し難いという動物実験の成績にもとづくものであるが、これを生物学的に証明する事は、静菌力試験の間に分解する恐れがあつて甚だ困難とされていた。これは人型結核菌の発育が緩慢な為確実に判定するには、どうしても1週間を要し、又人型菌以外の発育の速い *Mycobacterium* を用いる事は余り意味がないという事が一番大きな原因であろう。従つて真の静菌力を知るにはどうしても薬剤含有培地を頻回に置換しながら結核菌の培養を続ける以外に適当な方法がないわけであり、置換培養法こそ此の問題を試験管内実験で検索する最良の方法の一つと考えられるのである。

実験材料及び実験方法

第2編²⁾記載と異なる点のみ記す。

1. 被検液の調製

薬剤の化学名、略号、分子量及びINH含有量を表1に示した。これ等の誘導体を分子量に従つて70% Ethanol に溶解し、何れもINHの濃度にして1γ/ccより静菌力を検討した。但しSHは溶媒として滅菌蒸溜水を用いた。

2. 実験方法

置換培養は隔日に行ない、培養開始10日後普通培養と共に肉眼的並びに染色鏡検して判定した。判定基準は本論文第1篇¹⁾と同様である。

実験成績

培養開始10日後の肉眼的判定成績は表2及び表3の如くであつて、INHのMICは普通培養法では0.0313γ/cc、置換培養法では0.0156γ/ccで実験開始後判定迄の期間は第1編¹⁾及び第2編²⁾の4週間に比して短かつたが、置換培養

表 2 普通培養法と置換培養法との比較 (INH 誘導体)

薬 剤	培 養 法	第1管中 薬剤濃度 (γ /cc)	試 験 管 番 号											MIC (γ /cc)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	対照		
INH	普 通 置 換	1	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	0.0313
		1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++
IHMS	普 通 置 換	2	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	0.0625
		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++
IPN	普 通 置 換	2.2	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	0.034
		2.2	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	0.068
INHG- Na	普 通 置 換	2.7	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	0.042
		2.7	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	+++	0.169

表 3 普通培養と置換培養法との比較 (SH)

薬 剤	培 養 法	第1管中 薬剤濃度 (γ /cc)	試 験 管 番 号											MIC (γ /cc)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	対照			
S H	普 通	1.0 (INH)	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	0.0313
	置 換	1.0 (INH)	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	0.0313
SM+	普 通	1.0 (INH)	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	0.0313
INH	置 換	1.0 (INH)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	0.0156

法では1管即ち2倍弱い静菌力を示した。IH-MSの静菌力も置換培養法に於ける方がやや強くINHとはほぼ同様の傾向を示したが、IPN及びINHG-Naでは明らかに置換培養法に於ける方が劣っていた。即ち普通培養法で何れも0.0156 γ /ccのMICを示したにもかかわらず、置換培養法ではIPNは0.0313 γ /ccと1管弱く、INHG-Naでは0.0625 γ /ccと2管弱いMICを示した。

SHの場合は、SMとINHとのin vitroの併用効果が考えられるので、対照薬剤としてSHと同じ比率に即ちSM:INH=1000:236の割合にSMとINHを混合し、何れもINHの濃度にして1 γ /ccより静菌力を検討した。非置換と置換との差はSM・INH混合物は置換培養法に於ける方が1管強い静菌作用を示したが、SHは差を認めなかつた。顕微鏡的判定も同時に行なつたが全く同様の成績であつたの

で記載を省略した。

総括及び考按

当教室の神頭等¹¹⁾はINHG-Naのマウスに対する急性毒性試験を行ない、LD₅₀は皮下注射では7,400 mg/kg、経口投与では2,850 mg/kgとの成績を得、河本¹²⁾もIPNは皮下注射3280 mg/kg、経口投与1585 mg/kgと報告している。この他五味¹³⁾も静脈注射、皮下注射、経口投与の3方法でINHG-Na、IPN、IHMS、INHの急性毒性実験を行ない、ほぼ同様の傾向を報告している。これ等を要約すると、INHとIHMSは一般の薬剤同様経口投与よりも非経口投与の方が毒性が強いが、INHG-Na、IPNはその反対に非経口投与による毒性の方が著明に弱いのであつて、消化管内で何等かの変化をうけて、誘導体より更に毒性の強い物質を遊離するのではないかとも思われるのである。

一方 Colwell¹⁴⁾等は *in vitro* で INH 及び INHG の安定性に就いて実験し、酸性に於いては INHG は速かに加水分解して INH を遊離する事、及びこの遊離は体液成分の存在によりやや抑制される事を報告し、伊藤等¹⁵⁾は IHMS を除く INH 誘導体は胃液又は代用胃液により容易に INH を遊離すると報告している。北本¹⁶⁾も *in vitro* の分解の程度を動物に対する毒性の推移から検討し、ほぼ同様の成績を示した。又当教室の辻野¹⁷⁾は、実験的動物結核症に対する INH 誘導体の効果を比較検討し、INH は経口投与でも皮下注射でも同じように有効であるが、IPN, INHG-Na は経口投与の方が皮下注射より有効であると報告している。

以上の点から、IHMS を除く INH 誘導体は INH を遊離して始めて有効な抗結核作用を示すもので、経口的に投与されると消化管内で誘導体より更に毒性の強い INH を遊離し、それが吸収されて治療効果を発揮するが、非経口的に投与されると毒性の弱いそのままの形で吸収、排泄され治療効果を示さないのではないかと推測されている。

しかしながら、これは飽く迄も推測であつて、INH 遊導体はそれ自身そのままの形で抗結核菌作用があるか否かを直接実験的に証明した報告は現在迄の所殆んど見られないのである。即ち先述の Colwell¹⁴⁾は *E. coli* を用いて INHG そのものの抗菌作用を調べようとしたが、余りにも INH への分解が速い為に結局結論を得られなかつた。まして発育が極めて遅く、判定迄に少くとも1週間を必要とする結核菌を対象として検討する事は更に困難である。

さて著者はこの点を究明すべく INH 誘導体の *in vitro* に於けるより正しい静菌力を知る方法として著者の考案した置換培養法を用いて検索し、IHMS は INH と同様置換培養法に於ける方がむしろ強い静菌作用を示し、SH は置換を行なうも大差なく、IPN 及び INHG-Na は共に置換培養法で却つて静菌力が低下する事がわかつた。従つて IPN や INHG-Na は培養中に *in vitro* で INH を遊離し、その INH が強力な静菌作用を発揮するものである事を実験的

に明らかにし得たわけである。このように IPN や INHG-Na の置換培養法による静菌力は、分子量を考慮に入れた濃度でも INH より弱い事は明らかであるが、置換培養法で得られた MIC が IPN や INHG-Na そのものの真の静菌力を示すか否かは極めて疑問である。何故なら、本実験では約48時間毎に培地置換を行なつたのであるが、これ等誘導体が少くともこの48時間の間殆んど INH を遊離しないのなら兎も角、遊離するとすれば置換培養法に於ける MIC でも遊離された INH の静菌作用が含まれる事になるからである。

Colwell¹⁴⁾の INHG (D-glucuronolactone isonicotinyl hydrazone) に就いての実験成績では、人血清中 (pH 7~7.5) で1時間後11, 4時間後65, 24時間後74%に INH を遊離している。Colwell の行なつたのは INHG のみであつて、著者の対象とした INHG-Na, IPN と同一には論じられないが、培地に添加後かなり速かに INH を遊離するであろう事が想像されるのである。

IHMS は著者の実験成績では、置換により INHG-Na や IPN と反対に静菌力がやや増強した。これは極めて速かに INH を遊離する為に INH と同じ傾向を示すのか、IHMS そのものが INH に匹敵する静菌力をもつ為か二様の考えが出来るわけである。しかし直ちに INH を遊離するものとする、INH に比して毒性が低い原因が説明出来ないし、北本¹⁶⁾の毒性実験でも IHMS から INH の遊離は極めて遅い事が証明されている。又先述の INH 誘導体の毒性実験、生体内運命に関する諸成績でも IHMS は他の INH 誘導体とは異りむしろ INH に近い性質をもつように報告されているが、著者の実験でも全く同様の傾向を示したわけであつて、或はそのもの自身で静菌作用をもつのではないかと思われるのである。

SH は普通培養法で、その中に含まれる INH 濃度にして 0.0313 γ /cc で、ほぼ INH 単独の MIC に等しい濃度で結核菌の発育を阻止し、SM 濃度よりみると 0.132 γ /cc で SM 単独の MIC (約 1.25~0.625 γ /cc) より遙かに小さい。

これを SH 自身の MIC になおすと 1.9 γ /cc となる。従つて、SH の阻止力は分解遊離されたとしても、SM 自身の静菌力は INH の静菌力に覆われてしまう筈であろう。しかし SH の MIC が主として遊離された INH によるとすると、INH 単独時と同じく静菌力は置換培養法に於ける方がより強く出る筈であるが、著者の実験では変りなかつた。所が SH と同じ分子量比に SM と INH を混合したものは INH 単独と同じく置換培養法によつて静菌力が強く出たのである。このような成績から、SH の静菌力は INH の遊離によるものではなく SH そのままの形で 2 γ /cc 程度の静菌作用をもつものと考えられるのではなからうか。

丸田等¹⁸⁾の研究によると、SH は 20 mg/cc の水溶液として 60 \pm 4 $^{\circ}$ C に保ち 6 日後の生物学的活性の測定値は約 10% の力価減少を認めたのみであつた。このように比較的安定な点は著者の成績とよく一致するようである。

結 論

抗結核菌作用を生物学的に定量する事が困難とされていた INH 誘導體そのものの静菌力を培地置換培養法で検索し、本法がかかる目的の為に充分利用出来得る事を示した。又 Isonicotinylhydrazide methanesulfonate 及び Streptomycylidene isonicotinyl hydrazine はそのままの形で、Isonicotinyl hydrazinopyruvinate

及び Sodium glucuronate isonicotinyl hydrazone は INH を遊離して始めて強力な静菌作用を示すものと思われる成績を得た。

(擱筆に当り、終始御指導及び御援助を賜わった当教室助手津久間俊次博士と実験に終始御協力を戴いた当教室東向一郎学兄とに深甚の謝意を表します。)

文 献

- 1) 神田：本論文第 1 篇
- 2) 神田：同第 2 篇
- 3) 神田：同第 3 編
- 4) 神田：同第 4 篇
- 5) 内藤他：診断と治療，42：1096，1954.
- 6) 北川：京結紀要，5：16，1956.
- 7) 今井：胸疾，1：214，1957.
- 8) 谷：京結紀要，5：89，1956.
- 9) 前川他：胸疾，2：392，1958.
- 10) 内藤他：新薬と臨床，4：661，1955.
- 11) 神頭他：胸疾，2：110，1958.
- 12) 河本：神戸医大紀要，9：372，1957.
- 13) 五味：ヒドロロンサン文献集，中外製薬株式会社学術課編，第 1 集：32，昭和 31 年 8 月.
- 14) Colwell, Hess：Am. Rev. Tuberc., 73：892，1956.
- 15) 伊藤文雄他：胸疾，2：182，1958.
- 16) 北本：文部省結核化学療法班会議，昭和 33 年 5 月.
- 17) 辻野：未発表
- 18) 丸田：Jour. of Antibiot. Ser. B, 8：356，1955.