

各種結核化学療法剤の他剤耐性菌に対する静菌作用

〔第2編〕 Isonicotinic-acid-hydrazide, Cyanacetic-acid-hydrazide

耐性菌に対する各種結核化学療法剤の静菌作用

京都大学結核研究所化学療法部 (主任 教授 内藤益一)

神 尾 彰

(昭和33年12月20日受付)

〔内 容 抄 録〕

第1編に述べたと同様の観点に立つて、同様の方法で Isonicotinic-acid-hydrazide (以下 INAH), Cyanacetic-acid-hydrazide (以下 CAH) 各耐性菌に就いて実験を行った。尚 INAH 耐性菌は Catalase 陰性菌と陽性菌とに分けて各耐性菌に就いて他種抗結核剤に対する感受性を親株と比較した結果次の成績を得た。

1) INAH 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性は Catalase 陰性菌に於いては Pyrazinamide, Sulfoxazole, Kanamycin に対して多少共増強する傾向があり, Streptomycin, CAH, Viomycin, Cycloserine に対し多少共低下する傾向が見られた。一方 catalase 陽性菌に於いては PAS に対して多少共増強する傾向, Streptomycin に対して多少共低下の傾向を認めた。

2) CAH 耐性菌は10%血清加 Kirchner 培地を用いた増量継代培養法で 125γ/cc 以上耐性の菌は分離し得なかつたが, この INAH 菌はに対し軽度の感受性低下を認められ, 他の抗結核剤に対しては親株と同様の感受性を認められた。

結 論

各種結核化学療法剤の併用により治療効果が増強される作用機構の一つとして, 第1編に於いて記載した如く, Perry, 石上, 貝田等の報告よりして著者は耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性が親株の感受性菌より増強されると云う機構の存在を想像し, それがどの程度の普遍性をもつて働いているものかを Streptomycin (以下 SM), para-Aminosalicylic-acid (以下 PAS), para-Acetoaminobenzaldehyde-thiosemicarbazone (以下 TBI) 各耐性菌について実験検討を加えたが, 今回は前編に引続い

て H₃₇R_v 感受性菌 (以下 H₃₇R_vS 株) より得た Isonicotinic-acid-hydrazide (以下 INAH), Cyanacetic-acid-hydrazide (以下 CAH) 各耐性菌に就いて検討を加えた次第である。

1952年 Steenken,¹⁾ Elmendorf²⁾ 等により報告された INAH は試験管内抗菌力が SM より遙かにすぐれ副作用が極めて少い事から非常な注目を浴び, その後各国研究者は各種の誘導体に就いても研究を進め, 今日種々の誘導体が INAH と共に臨床方面にも使用されるに至つたのである。ここにあげた CAH は INAH 誘導体とは云えないが, 一種の Hydrazide であり, このものはスペイン, スイス方面でとりあげられ, その後主として欧洲諸国で試みられ, 我国に於いても一部の研究者により基礎的, 臨床的研究がなされているが, Seymour³⁾, Vischer⁴⁾, 高尾⁵⁾, 河崎⁶⁾等によると, 試験管内抗菌力は INAH より著しく劣る様である。

INAH はその後基礎的, 臨床的研究が進むにつれ, 各研究者により速かに耐性菌を生ずる事が分り, 且つその耐性菌によつて動物実験が行われるに及び, INAH 耐性菌は多くの場合マウスに対する毒力が減弱している事が報告され⁷⁾, Mitchison¹⁰⁾ は INAH の耐性度と毒力の強弱間に一定の関係があり, 高度耐性菌となるに従い毒力が減弱する傾向ありと述べている。この事は又臨床的立場より INAH 耐性菌を排出している患者に於いて INAH 投与後或は投与中に於いても高度耐性菌が屢々消失すると云う多くの報告¹¹⁻¹⁴⁾ と共に多くの研究者の注目する所となつたのである。INAH に耐性を獲得すると毒力が減弱する一因として Fisher¹⁵⁾ は INAH 耐性菌は感受性菌と異なり hemin を

親株と比べ200倍程度の耐性を示している。

2) H₃₇RvR-INAH ⊖株

前述の H₃₇RvR-INAH ⊕ 菌で作成した約 2 mg/cc の菌液を駒込ピペットにて2滴宛 10r INAH 含有小川培地に接種し、約4週後に増殖してきた単一コロニーを採取し、10%血清加Kirchner 培にて菌膜をはらせて増菌後、この菌を用いて約 2mg/cc の菌液を作成し、駒込ピペットにて2滴宛 50r INAH 含有小川培地に接種した。約4週後に菌の増殖を認めたので単一コロニーを5株程度別々に採取し、10%血清加Kirchner 培地で増殖後、前項と同様の方法で夫々の株について catalase 反応を検査し、catalase 陰性なる事を確認した菌を得たので之を H₃₇RvR-INAH ⊖株とした。この耐性度は第1表に示した如くであつて、親株と比べ800倍濃度の耐性を示した。

3) CAH 耐性株 (H₃₇RvR-CAH 株)

CAH は卵培地に於いては加熱凝固操作によ

り阻止力が著しく低下する事が Christensen²⁴⁾, M. Barnett²⁶⁾ 等により報告され、私共²⁷⁾ も之を確認している。従つて著者は増量継代培養法²⁸⁻²⁹⁾により耐性菌の作成を試みたのである。即ち第1編〔B〕Ⅰの項に述べた如くにして CAH 含有10% Kirchner 培地培数稀釈列を作成し、H₃₇RvS 株より作成した約 0.5mg/cc の菌浮游液を2滴宛滴下し孵卵器に納めた。培養4~5週後に判定して菌発育を認めた最高濃度の培地より菌をとり、この菌により新しく菌液を作成し次代に植継いだ。かくの如く同様操作を以て実験を繰返し、4~5週毎に順次高濃度の薬剤を含有する培地に継代培養しこ。

増量継代培養3代目より耐性の上昇が認められ、以後引続き7代迄継代培養を続けたが、125r/cc 以上の耐性菌は得られなかつた。その耐性度は表2の如く親株に比べ4倍程度の耐性であつた。

第2表 CAH 耐性菌の耐性度

実験条件 第1表に同じ、4週判定												
実験回数	CAH 濃度 γ/cc	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	対照	MIC
	菌種											
第一回	H ₃₇ RvS 株	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	62.5γ
	H ₃₇ RvR-CAH 株	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	250γ
第二回	H ₃₇ RvS 株	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	62.5γ
	H ₃₇ RvR-CAH 株	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	250γ

〔B〕 耐性菌に対する諸種抗種抗結核剤の静菌作用に関する実験

Ⅰ. 実験材料及び実験方法

培養基
被検薬剤溶液
結核菌浮游液
実験術式
成績判定

第1編参照

Ⅱ. 実験成績第

1編にも述べた如く、可及的実験誤差を避ける為実験を2~3回繰返し、2回以上差が認められたものを有意とした。

1) INAH 耐性菌の感受性検査成績

その成績を示すと第3表の如くである。

之によると H₃₇RvR-INAH ⊕株と H₃₇RvR-INAH ⊖株とに於いて、感受性に若干の差が認められる。即ち Pyrazinamide (以下 PZA), Sulfisoxazole (以下 SI), Kanamycin (以下 KM) の3種の薬剤に対しては H₃₇RvR-INAH ⊖株は1~2管差で H₃₇RvS 株より感受性が増加しているが、H₃₇RvR-INAH ⊕株に於いては有意の差を認めない。PAS に対しては RH₃₇Rv-INAH ⊕株に於いて僅か1管差程度であるが3回共感受性を増加する成績を得たが、

第3表 INAAH 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

実験条件 10%牛血清加 Kirchnre 培地 (pH6.5), 接種菌量 0.01mg/cc 4週判定

実験回数	菌種	薬 剤									
		SM	PAS	TBI	VM	PZA	SI	CAH	CS	TC	KM
第一回	H ₃₇ RvS 株	1.25	0.5	25	6.25	125	62.5	62.5	6.25	12.5	0.625
	H ₃₇ RvS-INAH ⊕株	2.5	0.125	25	6.25	125	62.5	62.5	6.25	12.5	0.625
	H ₃₇ RvR-INAH ⊖株	2.5	0.25	25	12.5	62.5	31.3	250	12.5	12.5	0.313
第二回	H ₃₇ RvS 株	1.25	0.25	12.5	3.13	250	125	31.3	6.25	12.5	1.25
	H ₃₇ RvR-INAH ⊕株	2.5	0.125	12.5	3.13	250	125	31.3	6.25	12.5	0.625
	H ₃₇ RvR-INAH ⊖株	2.5	0.25	12.5	6.25	125	62.5	125	12.5	12.5	0.313
第三回	H ₃₇ RvS 株	1.25	0.5	25	3.13	250	125	31.3	12.5	12.5	1.25
	H ₃₇ RvR-INAH ⊕株	1.25	0.25	25	3.13	250	62.5	31.3	12.5	12.5	1.25
	H ₃₇ RvR-INAH ⊖株	2.5	0.5	25	3.13	125	62.5	62.5	25	12.5	0.625

〔註〕 表の数値は発育阻止最小濃度 (γ/cc) を示す。

H₃₇RvR-INAH ⊖株に於いては1回かかる傾向を認めたのみであつた。所が逆に CAH に対しては H₃₇RvR-INAH ⊖株は H₃₇RvS 株に比し感受性が1~2管差で低下していたが、H₃₇RvR-INAH ⊕株に於いては有意の差は認められなかつた。Viomycin (以下 VM), Cycloserine (以下 CS) に対しても幾分かかかる傾向

が見られた。SM に対しては INAH 耐性は両者共幾分感受性低下の傾向があつた。

TBI, Tetracycline (以下 TC) に就いては有意の差は認められなかつた。

2) CAH 耐性菌の感受性検査成績

その成績を示すと第4表の如くである。

第4表 CAH 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

実験条件 第3表と同じ, INAH のみ2週判定, 他は4週判定

実験回数	菌種	薬 剤									
		SM	PAS	INAH	TBI	VM	PZA	SI	CS	TC	KM
第一回	H ₃₇ RvS 株	1.25	0.5	0.06	25	3.13	250	125	6.25	12.5	0.625
	H ₃₇ RvR-CAH 株	1.25	0.5	0.25	25	6.25	250	125	6.25	12.5	0.625
号二回	H ₃₇ RvS 株	2.5	0.5	0.06	25	6.25	250	62.5	6.25	12.5	1.25
	H ₃₇ RvR-CAH 株	2.5	0.5	0.125	25	6.25	250	62.5	6.25	12.5	1.25

〔註〕 表の数値は第3表と同じ

即ち INAH に対して CAH 耐性菌は1~2管差で感受性が低下する成績を得たが、他の薬剤に対しては何れも感受性の変化を示さなかつた。

総括並びに考按

先ず INAH 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性を調べた諸家の報告を一括してみると以下の如くである。

Middlebrook³⁰⁾ は SM, 石上³¹⁾ は PAS, Szybalski³²⁾ は SM, PAS, VM, TC, Hobby³³⁾ 等は TC, Ehrlich,³⁴⁾ 河盛³⁵⁾ 等は VM について実験し、INAH 耐性菌は何れも感受性菌と略々同様の感受性を示すと報告している。高階³⁶⁾ は SM, PAS, TBI, VM について実験し、INAH 耐性菌は SM, PAS に就いてはやや感受性が低下し、TBI では同様、VM ではやや増強する成績を得ているが、その差は倍数稀釈列の1

管差と云う軽度のものである。又 Cummings³⁷⁾, Barclay³⁸⁾, 堂野前³⁹⁾等は CS に対して略々同様の感受性を示すと述べ、Yeager⁴⁰⁾等は INAH 耐性菌はやや感受性が低下すると報告している。以上諸家の報告では SM, PAS, TBI, VM, CS TC に就いては感受性菌と比べて INAH 耐性菌は研空者により多少の差はあるも略々同様の感受性を示す様であり、著者の作成した H₃₇RvR-INAH ⊖株の実験成績も SM, VM, CS に就いて幾分感受性低下の傾向を認めたが、その差は僅か 1 管差であり、他の PAS, TBI に対しては有意を認めなかつた。

一方 H₃₇RvR-INAH ⊕株の感受性の報告は諸家の報告が殆んどすべて著者の H₃₇RvR-INAH ⊖株に属する所謂 Catalase 陰性株についての報告であるので、その成績をそのまま H₃₇RvR-INAH ⊕株に属する所謂 catalase 陽性株の感受性成績とするわけには行かない。著者の行つた H₃₇RvR-INAH ⊕株の感受性成績は TBI, VM, CS, TC に就いては感受性菌と有意の差は見られなかつたが、SM に対しては幾分の感受性低下の傾向が見られた。PAS に対しては H₃₇RvR-INAH ⊕株は 1~2 管差ではあるが毎回感受性が軽度増強する成績を得たが、H₃₇RvR-INAH ⊖株では 3 回実験を行い 1 回かかる傾向を認めたのみであつた点興味ある成績と云えよう。

CAH に対しては Hartl⁴¹⁾, Barnett⁴²⁾, Seymour³⁾, 河崎⁴³⁾ 等が高度耐性株で何れも軽度の交叉耐性を認めている。著者も H₃₇RvR-INAH ⊖株では同様の成績を得たが、H₃₇RvR-INAH ⊕株では有意の差を認めないので、catalase 陰性菌に於いて始めて軽度の交叉耐性が生ずるものと考えられる。

PZA に就いては Perry⁴⁴⁾ が Tween-Albumin 培地を用い一定の耐性 (5~15r INAH 耐性) を有する INAH 低耐性菌は PZA に対し感受性が増強すると報告して以来、注目されたのであるが、岡野⁴⁵⁾ はかかる傾向は認め難いと報告している。高度 INAH 耐性菌の感受性については神頭⁴⁶⁾ は 10% 血清加 Kirchner 培地を用い感受性菌と略々同程度の感受性であつた

と報告し、安井⁴⁷⁾ は Frankfurt 株の INAH 耐性菌でむしろ感受性低下を報告している。著者の成績は H₃₇RvR-INAH ⊕株では岡野と同様感受性菌と同様の感受性を示したが、H₃₇RvR-INAH ⊖株では 1 管差の僅少差ではあるが感受性が高まる成績を得た。

SI に対する感受性検査に就いては小川⁴⁸⁾, 齊藤⁴⁹⁾ 等が卵培地を用い略々同様の感受性を示すと報告しはいるが、石上³¹⁾ は 10% 血清加 Kirchner 培地で INAH 耐性菌 (50r 以上耐性) で感受性が増強すると報告している。SI の抗菌力は種々の因子により動揺しやすい⁵⁰⁾ ので実験条件を可及的に一定にし検討を加えた著者の成績でも H₃₇RvR-INAH ⊖株では 1 管程度の差ではあつたが感受性の増加を認めた。併しながら H₃₇RvR-INAH ⊕株では有意の差はみられず、前述した PAS の成績と比べると多少とも反対傾向が見られた。

KM に対する感受性に就いては目下の所当教室の行つた報告⁵¹⁾ の他には報告がみられない。著者の成績では H₃₇RvR-INAH ⊖株は軽度の感受性増加を認めたが、H₃₇RvR-INAH ⊕株に就いては有意の差は認められなかつた。

以上の成績を総括すると、H₃₇RvR-INAH ⊖株は PZA, SI, KM に対し、H₃₇RvR-INAH ⊕株は PAS に対し夫々多少共感受性増加の増向が見られたが、之は INAH+PZA, INAH+SI 併用法の作用法の作用機構の一端を示すものとして PZA, SI が何れも酸性培地で静菌力が増強される点と共に興味ある成績と云える。それと共に KM+INAH 併用法に就いても考慮の余地を残したと云えよう。尚 PAS もむしろ INAH 低耐性菌に対して静菌力が強い成績を得た事は INAH+PAS 併用法の作用機構に就いて今後尚検討する余地がある事を示したものと云えよう。

之に反し SM, VM, CS に対しては同等もしくはやや感受性の低下を見ているので之等の薬剤と INAH との併用は著者の実験成績からは特に有利ではない様に思われる。

次に CAH 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性の報告は諸論で述べた如く見かけない様で

ある。従つてここでは著者の成績を検討して見る事とする。

CAH は Hydrazide 誘導體と考えられ、前述の如く catalase 陰性 INAH 耐性菌は CAH に対し感受性が低下するので、CAH 耐性菌の INAH に対する態度が注目されたが、何分 CAH 耐性菌と云つても耐性度が極めて低いものしか得られない点に難点がある。併し実験を行つてみると1~2管差ではあるが INAH に対し感受性低下傾向を認めたので、CAH, INAH は互に軽度ではあるが交叉耐性がある事が出て来よう。この事は将来更に種々の化学治療剤ができた時、その化学構造式が互に一部類似している時は多少共交叉耐性を生ずる怖れがある事を暗示する興味ある所見と云える。尙 INAH 以外の薬剤に就いては耐性度の低い関係もあり、感受性に有意の差が認められなかつた。

結 論

著者は第1編に引続き H₃₇R_v 感受性菌より作成した INAH, CAH 各耐性菌に就いて10%牛血清加 Kirchner 培地 (pH6.5) を用い、接種菌量 0.01 mg/cc の条件で他種抗結核剤夫々10種に対する感受性を親株と比較検討した結果、次の結論を得た。尙 INAH 耐性菌は catalase 陰性菌と陽性菌とに分けて考え、夫々の菌株について感受性検査を行つた。

I) INAH 耐性菌

catalase 陽性菌と陰性菌とに於いて若干感受性の差がある事が分つた。即ち

1) Catalase 陰性菌は PZA, SI, KM に対し多少共感受性が増強する傾向がみられるが、陽性菌では有意の差は認められない。然るに PAS に対しては陽性菌は感受性が多少共高まる傾向を示したのに反し、陰性菌ではむしろかかる傾向は認め難い。

2) Catalase 陰性菌は SM, CAH, VM, CS に対し多少共感受性低下の傾向が見られたが、陽性耐では SM に対して認められたのみであつた。この中 CAH との交叉耐性に就いては catalase 陰性菌では1~2管差で認められる

が、陽性菌では認められなかつた。従つて高度耐性菌に於いてはじめて軽度の交叉耐性をみると云えよう。

3) TBI, TC に対しては2種の耐性菌共親株と感受性の差は認められない。

II) CAH 耐性菌

1) 10%牛血清加 Kirchner 培地に於いて 125 r/cc 以上の耐性菌は得られず、親株に比し4倍程度の耐性度であつた。

2) CAH 耐性菌は INAH に対し軽度感受性の低下を認める。

3) INAH 以外の9種の抗結核剤に対しては親株と同様の感受性を有する。

(欄筆するに当り終始御指導、御援助を賜つた津久間博士に深謝の意を表します。)

文 献

- 1) Steenken, W. Jr. and Wolinsky, E. : Amer. Rev. Tuberc., 65 : 365, 1952
- 2) D. F. Elmendorf, Jr., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 65 : 429, 1952
- 3) Davin, E. M. and Seymour, D. E. : Lancet, 267 : 338, 1954
- 4) Vischer, W. A. : Beit. Klin. Tub., 116 : 609, 1957
- 5) 高尾泰 : 結核, 32 : 76, 1957
- 6) 河崎弘 : 京大結研紀要, 5 : 111, 1956
- 7) Peizer, L. R., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 66 : 290, 1953
- 8) Steenken, W., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 68 : 548, 1953
- 9) Morse, W. C., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 464, 1954
- 10) Mitchison, D. A. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 640, 1954
- 11) 照谷岱藏, 他 : 日本臨床結核, 12 : 609, 1953
- 12) 宝来善次, 他, 日本臨床結核, 13 : 672, 1954
- 13) 佐藤直行 : 結核, 29 : 393, 1954
- 14) Johnston, R. N., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 442, 1952
- 15) Fisher, M. W. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954
- 16) Cohn, M. L., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954

- 17) Alfred G. Karlson and William H. Feldman : *Amer. Rev. Tuberc.*, 66 : 477, 1952
- 18) 柳沢謙 : 日本医事新報,
- 19) 金井興美, 他 : 結核, 27 : 42, 1952
- 20) 橋本達一郎 : 結核, 26, 238, 1951
- 21) 築山明 : 医学研究, 25 : 169, 1955
- 22) 小酒井望 : 医学の動向, 第2集 ; 29頁, 1935
- 23) Peron O. Johns, et al. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 47 : 417, 1956
- 24) O. Christensen, et al. : *Acta tuberc. scand.*, 32 : 132, 1956
- 25) 伝染病研究所学友会編 : 細菌学実習提要 (丸善) ; 161頁, 1956
- 26) M. Barnett, et al. : *Brit. Med. J.*, 4940 : 647, 1955
- 27) 津久間俊次, 他 : 胸部疾患発表予定
- 28) Feldman, W. H. et al. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 57 ; 162, 1948
- 29) 芦野芳久 : 抗酸菌病研究雑誌, 8 : 238, 1953
- 30) Middlebrook, G. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 65 : 765, 1952
- 31) 石上敏幸 : 京大結研紀要, 6 : 233, 1958
- 32) Szybalski, W. and Bryson, V. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 65 : 768, 1952
- 33) Hobby, G. L. and Lenert, T. F. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 72 : 367, 1955
- 34) Ehrlich, J., et al. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 63 : 7, 1951
- 35) 河盛勇造, 他 : 診療, 7 : 904, 1954
- 36) 高階二郎, 他 : 抗酸菌病研究雑誌, 10 : 108, 1954
- 37) Cummings, M. M., et al. : *Antibio. & Chemother.*, 5 : 198, 1955
- 38) Barclay, W. R. and Russe, H. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 72 : 236, 1955
- 39) 堂野前維摩郷, 他 : 日本臨床, 15 : 59, 1957
- 40) Robert, L. Yeager, et al. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 75 : 1016, 1957
- 41) Hartl, W. : *Schweiz. Zschr. Tuberk.*, 11 : 65, 1954
- 42) Barnett, M., et al. : *Brit. Med. J.*, No. 4940 ; 643, 1955
- 43) 河崎弘 : 京大結研紀要, 5 : 111, 1956
- 44) Perry, C. R. and Morse, W. C. : *Amer. Rev. Tuberc.*, 72 : 840, 1955
- 45) 岡野正光他 : 結核研究の進歩第22号, 47頁, 1958
- 46) 神頭勝太 : 胸部疾患, 1 : 198, 1957
- 47) 安井雅典 : 神戸医科大学紀要, 9 : 604, 1957
- 48) 小川政敏, 他 : 日本臨床結核, 15 : 778, 1956
- 49) 齊藤紀仁, 他 : 日本臨床結核, 15 : 694, 1956
- 50) 内藤益一, 他 : 胸部疾患, 2 : 232, 1958
- 51) 内藤益一, 他 : 第6回日本化学療法学会総会にて発表, 1958