

## 各種結核化学療法剤の他剤耐性菌に対する静菌作用

〔第3編〕 Pyrazinamide, Sulfisoxazole, Tetracycline 各耐性菌  
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, 第2編と同様の観点に立つて, 同様の方法で酸性培地に於いて抗菌力が増強すると云われている Pyrazinamide (以下 PZA), Sulfisoxazole (以下 SI), Tetracycline (以下 TC) の3種の抗結核剤に対する耐性菌を作成し, 各耐性菌につ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) PZA 耐性菌は 5,000  $\gamma$  PZA 含有 1%小川培地に, SI 耐性菌は 120  $\gamma$  SI 含有 1%小山培地に増殖可能な菌であり, TC 耐性菌は pH 6.5 の10%血清加 Kirchner 培地を用いた増量継代培養法で分離した菌であるが, pH 6.5 の10%血清加 Kirchner 培地に於いては親株に比し PZA 耐性菌は2倍, SI 耐性菌は4~8倍, TC 耐性菌は4倍と何れも低い耐性しか示さなかつた。

2) 何れの耐性菌も他種抗結核剤に対し親株と同様の感受性を示した。

### 緒 論

著者は第1編, 第2編に於いて2種の化学療法剤併用による薬剤効果増強の作用機構を Streptomycin (以下 SM), para-Aminosalicylic acid (以下 PAS), Isonicotinic-acid-hydrazone (以下 INAH), Cyanacetic-acid-hydrazone (以下 CAH), para-Acetoamino benzaldehydthiosemicarbazone (以下 TBI) 各耐性菌に就いて他種結核化学療法剤に対する感受性の面より検討を加え, 若干の成績を得たが, 本編に於いては酸性培地に於いてその静菌力が増強されると言われている Pyrazinamide (以下 PZA), Sulfisoxazole (以下 SI), Tetracycline (以下 TC) の3種の抗結核剤の耐性菌に就いて検討を加えた次第である。

PZA は Kushner<sup>1)</sup> 等により 1952年始めて発見された Nicotinamide の誘導体である。Mc Dermott<sup>2)</sup> 等によると略々中性の培地では殆んど抗菌性を示さないが, 酸性培地では強い抗菌力を示し, INAH+PZA 併用療法は eradicative な療法である<sup>3)</sup> として非常な注目を浴びたものである。併しながら一方 Wasz-Höckert<sup>4)</sup> 等は動物実験で, Yeager<sup>5)</sup> 等は臨床的立場より速かに耐性菌が生ずる事を報告しているが, 何分にも PZA は中性培地では極めて静菌力が弱いので耐性検査の方法それ自体にも問題があり, 第15回 Veterans Administration (1956) の細菌委員会では pH 5.5 に調製した卵培地で PZA 耐性検査を行う事を示唆している現状である。我国に於いても熊谷<sup>6)</sup> 三方<sup>7)</sup>, 平敷<sup>8)</sup> 等により PZA を投与した症例に於いて耐性検査が試みられているが, 耐性検査に用いられた培地は何れも1%小川培地である。1%小川培地での PZA の静菌力は多くの研究者<sup>9-12)</sup> によれば 1,000  $\gamma$  で完全又は不完全阻止を示し, 我々<sup>13)</sup> も H<sub>37</sub>Rv 感受性株で接種菌量培地あて 0.02 mg で 1,000  $\gamma$  に於いて始めて完全発育阻止を認めている如く極めて弱い。安井<sup>12)</sup> は 5,000  $\gamma$  PZA 含有 1%小川培地で増殖を認めた菌は PZA 耐性菌と云つてよいであろうと述べている。従つて1%小川培地で耐性検査を行う事自体にも難点があり, 耐性培地そのものについて尙検討を要すると云う見解<sup>8), 14)</sup> が多い。

SI は昭和29年結核病学会総会に於いて内藤<sup>15)</sup> により INAH+SI 併用療法が, 又齊藤<sup>16)</sup> により SI 単独療法が, 夫々結核治療に有効な事が報告されて以来, SI の抗結核作用が主とし



2) SI 耐性菌(H<sub>37</sub>RvR-SI 株)

SI 100 r, 90 r, 80 r, ....., 10 r 含有1%小川培地の系列を作成し, 第1編[A]I 2)の項で述べた如くにして作成した約 2 mg/cc の H<sub>37</sub>RvS 菌液を駒込ピペットにて2滴宛接種し, 約4週後に増殖して来たコロニーの中 SI 含有濃度の最も高い培地に増殖してきたものを採

取し, 10%血清加 Kirchner 培地に浮游させて菌膜をはらせて増菌した後, 更に SI 含有濃度の高い小川培地に接種する。同様の操作を繰返す事約5回にて 120 r SI 含有1%小川培地に増殖する菌を得たので, 之を SI 耐性菌とした。この菌の耐性度を10%血清加 Kirchner 培地で親株と比較したのが第2表であり, 4~8倍程度の耐性度であつた。

第2表 SI 耐性菌の耐性度

| 実験条件 |                          | 第1表に同じ     |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |          |
|------|--------------------------|------------|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|----------|
| 実験回数 | 菌種                       | SI 濃度 r/cc |     |     |     |      |      |      |     |     |     | 対照  | 発育阻止最小濃度 |
|      |                          | 1000       | 500 | 250 | 125 | 62.5 | 31.3 | 15.6 | 7.8 | 3.9 |     |     |          |
| 第一回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | —          | —   | —   | —   | —    | +    | ++   | +++ | +++ | +++ | +++ | 62.5     |
|      | H <sub>37</sub> RvR-SI 株 | —          | —   | —   | +   | +    | ++   | +++  | +++ | +++ | +++ | +++ | 250      |
| 第二回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | —          | —   | —   | —   | —    | —    | —    | ++  | +++ | +++ | +++ | 31.3     |
|      | H <sub>37</sub> RvR-SI 株 | —          | —   | —   | +   | +    | ++   | +++  | +++ | +++ | +++ | +++ | 250      |

3) TC 耐性菌 (H<sub>37</sub>RvR-TC 株)

我々が報告<sup>13)</sup>した如く, TC は卵培地では加熱凝固操作により静菌力がかなり減退するので, 耐性菌作成にあつては専ら10%血清加 Kirchner 培地を用い増量継代培養法により行つた。その術式は第2編[A]II.3)の項に述べた方法と全く同様である。継代培養3代目頃より耐性の上昇が認められたが, 継代培養10代に於いても 25 r 以上の耐性菌は分離できなかつた。この TC 耐性菌の耐性度を H<sub>37</sub>RvS 株と比較した成績は第3表に示す如くであり, 約4倍の耐性度を示した。

[B] 耐性菌に対する諸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    | } 第1編参照 |
| 被検薬剤溶液 |         |
| 結核菌浮游液 |         |
| 実験術式   |         |
| 成績判定   |         |

II. 実験成績

実験誤差を可及的に避ける為2回実験を行

い, 2回共差のあるものを有意のものとした。

1) H<sub>37</sub>RvR-PZA 株

H<sub>37</sub>RvR-PZA 株の他種抗結核剤に対する感受性を H<sub>37</sub>RvS と株比較した成績は第4表に示した如くである。

即ち著者の作成した PZA 耐性菌は VM, SI に対して1回1管差の感受性の低下又は増強を認めたが, 他の1回については H<sub>37</sub>RvS 株と差が認められず, 感受性の有意の差はないと考えられる。その他, INAH, Kanamycin (以下 KM), Cycloserine (以下 CS) を始め他抗結核剤に対しても感受性の差は認められなかつた。

2) H<sub>37</sub>RvR-SI 株

H<sub>37</sub>RvR-SI 株の感受性検査成績は第5表の如くである。

即ち SI 耐性菌は PAS を始め10種の抗結核剤に対して H<sub>37</sub>RvS 株と同様の感受性を示す成績を得た。

第3表 TC 耐性菌の耐性度

| 実験条件 |                          | 第1表に同じ             |    |    |      |      |      |      |      |      |    |          |      |
|------|--------------------------|--------------------|----|----|------|------|------|------|------|------|----|----------|------|
| 実験回数 | 菌種                       | TC 濃度 $\gamma$ /cc |    |    |      |      |      |      |      |      |    | 発育阻止最小濃度 |      |
|      |                          | 100                | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 対照 |          |      |
| 第一回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | —                  | —  | —  | —    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅  | 卅        | 12.5 |
|      | H <sub>37</sub> RvR-TC 株 | —                  | —  | 卅  | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅  | 卅        | 50   |
| 第二回  | H <sub>37</sub> Rvs 株    | —                  | —  | —  | —    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅  | 卅        | 12.5 |
|      | H <sub>37</sub> RvR-TC 株 | —                  | —  | 卅  | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅    | 卅  | 卅        | 50   |

第4表 PZA 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 Kirchner 培地 (ph 6.5), 接種菌量 0.01 mg/cc INAH のみ 2 週判定, 他剤は 4 週判定 |      |       |     |      |      |     |      |      |      |       |
|------|---------------------------|--|------|-------|-----|------|------|-----|------|------|------|-------|
| 実験回数 | 菌種                        | 薬剤   |      |       |     |      |      |     |      |      |      |       |
|      |                           | SM   | PAS  | INAH  | TBI | VM   | SI   | CAH | CS   | TC   | KM   |       |
| 第一回  | H <sub>37</sub> RvS 株     | 1.25   | 0.25 | 0.06  | 25  | 6.25 | 62.5 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 0.625 |
|      | H <sub>37</sub> RvR-PZA 株 | 1.25   | 0.25 | 0.06  | 25  | 12.5 | 31.3 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 0.625 |
| 第二回  | H <sub>37</sub> RvS 株     | 2.5  | 0.25 | 0.125 | 25  | 6.25 | 62.5 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 1.25  |
|      | H <sub>37</sub> RvR-PZA 株 | 2.5  | 0.25 | 0.125 | 25  | 6.25 | 62.5 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 1.25  |

註 表の数値は発育阻止最小濃度 MIC ( $\gamma$ /cc) を示す。  
以下の表も同じ。

第5表 SI 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

| 実験条件 |                          | 第4表に同じ |      |       |     |      |     |     |      |      |      |       |
|------|--------------------------|--------|------|-------|-----|------|-----|-----|------|------|------|-------|
| 実験回数 | 菌種                       | 薬剤     |      |       |     |      |     |     |      |      |      |       |
|      |                          | SM     | PAS  | INAH  | TBI | VM   | PZA | CAH | CS   | TC   | KM   |       |
| 第一回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | 1.25   | 0.25 | 0.06  | 25  | 6.25 | 125 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 0.625 |
|      | H <sub>37</sub> RvR-SI 株 | 1.25   | 0.25 | 0.06  | 25  | 6.25 | 125 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 0.625 |
| 第二回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | 2.5    | 0.25 | 0.125 | 25  | 6.25 | 250 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 1.25  |
|      | H <sub>37</sub> RvR-SI 株 | 2.5    | 0.25 | 0.125 | 25  | 6.25 | 250 | 125 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 1.25  |

註 表4に同じ

### 3) H<sub>37</sub>RvR-TC 株

H<sub>37</sub>RvR-TC 株の感受性検査成績は第6表の如くである。

表の如く TC 耐性菌は KM に対して1回1管差で感受性増加の成績を得たが, 他の1回は同様の感受性を示しているので有意のものとは

云い難い。他の9種の抗結核剤に対しても感受性の変化は認められなかつた。

### 総括並びに考按

著者は PZA, SI, TC 3種の抗結核剤に対する耐性菌を作成し, 他種抗結核剤に対する感受性について検討を加えた。

第6表 TC 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

| 実験条件 |                          | 第4表に同じ |      |       |     |      |     |      |      |      |       |  |
|------|--------------------------|--------|------|-------|-----|------|-----|------|------|------|-------|--|
| 実験回数 | 菌種                       | 薬剤     |      |       |     |      |     |      |      |      |       |  |
|      |                          | SM     | PAS  | INAH  | TBI | VM   | PZA | SI   | CAH  | CS   | KM    |  |
| 第一回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | 2.5    | 0.25 | 0.06  | 25  | 6.25 | 250 | 125  | 62.5 | 6.25 | 1.25  |  |
|      | H <sub>37</sub> RvR-TC 株 | 2.5    | 0.25 | 0.06  | 25  | 6.25 | 250 | 125  | 62.5 | 6.25 | 0.625 |  |
| 第二回  | H <sub>37</sub> RvS 株    | 1.25   | 0.25 | 0.125 | 25  | 6.25 | 250 | 31.3 | 125  | 12.5 | 1.25  |  |
|      | H <sub>37</sub> RvR-TC 株 | 1.25   | 0.25 | 0.125 | 25  | 6.25 | 250 | 31.3 | 125  | 12.5 | 1.25  |  |

註 表4に同じ

併しながら緒論に於いても述べた如く、PZA 耐性菌そのものについて今日尙検討を要する多くの問題があり、我国に於いても PZA 耐性培地そのものの検討が行われている<sup>26)</sup> 状態であり、PZA 耐性菌の他剤に対する感受性の報告が Wasz-Höckert<sup>4)</sup> 等により行われているのみであるのもこの為と考えられるのである。著者は前述した如く、1%小川療地を用い、安井<sup>12)</sup> に従つて 10,000 r, 5,000 r PZA 含有 1% 小川培地を用いて耐性菌の分離を試みたのである。その結果 10,000 r 培地よりは耐性菌を分離し得ず、5,000 r 培地より分離した菌も pH 6.5 の 10% 牛血清加 Kirchner 培地では原株に比し 2 倍程度の耐性を獲得しているにすぎない。一方 Wasz-Höckert<sup>4)</sup> 等が動物実験より得た PZA 耐性菌は pH 5.0 の Tween-Albumin 培地で原株に比し数十倍の耐性を獲得しているが、pH 6.0 以上となると原株、耐性菌共に第 1 管の 400 r PZA 含有培地から増殖を認めている。中性培地ではこの様にさしたる感受性差は認めにくいのに酸性培地それも pH 5.5 以下の培地に於いて著しい感受性差を示す点については従来の耐性菌の概念では律しきれない所であり、今後の検討がまたれる次第である。従つて PZA 耐性菌の他剤に対する感受性については前述の Wasz-Höckert 等が INAH について行い、原株と同様の感受性を示したとの報告に止まる様である。著者の作成した耐性菌に於いても 10 種の抗結核剤に対し感受性の変化を認めていない。

SI についても今日の所では未だ SI が臨床

上結核治療に用いられるのが一部の研究者に限られている関係もあつて、SI 耐性菌と云う問題は小川<sup>18)</sup> 等の報告に見られるのみのようである。従つて目下の所 SI 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性を系統的に調べた報告に接しない。著者の得た SI 耐性菌は pH 6.5 の 10% Kirchner 培地で原株に比し 4~8 倍の耐性を示し、同じく酸性培地で抗菌力を増す薬剤であつてもこの点 PZA 耐性菌と態度を異にするようである。著者の得た SI 耐性菌は PAS を含む 10 種の抗結核剤に対して感受性の変化を示さなかつた。

TC についても SM+TC 併用法が<sup>21-22)</sup> 一部米国で、TBI+TC 併用法<sup>23)</sup> が当教室に於いて試みられているが未だ一般に用いられる迄には至らず、而も Hobby<sup>24)</sup> 等により TC に対する耐性菌が生じにくいとの報告がある為か、TC 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性の報告に接しない。著者は pH 6.5 の 10% Kirchner 培地で約 4 倍の耐性を有する耐性菌を得たので、この菌について実験を行つたが、いづれの抗結核剤に対しても感受性の変化は認められなかつた。

以上要するに著者の作成した PZA, SI, TC 耐性菌は何れも pH 6.5 の 10% Kirchner 培地に於いて 2~8 倍程度の耐性を獲得した菌であり、この点耐性菌と云つても極めて耐性度の低いものであるが、3 種の耐性菌何れも他種抗結核剤に対して感受性の変化を示さなかつた。

### 結 論

著者は第 1 編、第 2 編に引続き H<sub>37</sub>Rv 感受

性菌より得られた PZA, SI, TC 各耐性菌について10%牛血清加 Kirchner 培地 (pH 6.5) を用い、接種菌量 0.01 mg/cc の条件で夫々他種抗結核剤10種に対する感受性を原株と比較検討した結果、次の結論を得た。

### 〔I〕 PZA 耐性菌

1) 1%小川培地を用いて耐性菌の分離を試み5,000 $\gamma$  PZA 含有培地に増殖する菌を得たが、10,000  $\gamma$  PZA 含有培地に増殖する菌は遂に得られなかつた。而して 5,000  $\gamma$  PZA 含有培地に増殖した菌は pH 6.5 の10% Kirchner 培地に於いて原株に比し2倍程度の耐性を示した。

2) PZA 耐性菌は他種抗結核剤10種に対し感受性の変化を認めなかつた。

### 〔II〕 SI 耐性菌

1) 120  $\gamma$  SI 含有1%小川培地に増殖する菌を SI 耐性菌としたが、この菌は pH 6.5 の10% Kirchner 培地に於いて原株に比し4~8倍程度の耐性を示した。

2) SI 耐性菌も他種抗結核剤10種に対し感受性の変化を認めなかつた。

### 〔III〕 TC 耐性菌

1) 増量継代培養法による10代継代によつても25  $\gamma$  以上の耐性菌は分離できなかつた。この菌は pH 6.5 の10% Kirchner 培地に於いて原株に比し4倍程度の耐性を示した。

2) TC 耐性菌も他種抗結核剤に対し感受性の変化を認めなかつた。

(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) Kushner, S., et al. : J. Amer. Chem. Soc., 74 : 3117, 1952

2) Mc Dermott, W. and Tompsett, R. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 748, 1954  
 3) Mc Dermott, W., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 313, 1954  
 4) O. Wasz-Höckert, R., Mc Cune, R., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 74 : 572, 1956  
 5) Yeager, R. L., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 65 : 523, 1952  
 6) 熊谷岱蔵, 他 : 日本医事新報 No. 1646 : 3, 1955  
 7) 三方一沢, 他 : 治療薬報, 536号 : 14, 1956  
 8) 平敷安正, 他 : 日本臨床結核, 15, 308, 1956  
 9) 柳沢謙, 他 : 結核治療の評価 (医学書院), 268頁, 1956  
 10) 中村隆, 他 : 新薬と臨床, 4巻, 8号, 7頁, 1955  
 11) 長村重之, 他 : 新薬と臨床, 5巻, 2号, 23頁, 1956  
 12) 安井雅典 : 神戸医科大学紀要, 9 : 604, 1957  
 13) 津久間俊次, 他 : 胸部疾患発表予定  
 14) 長沢潤, 他 : 最新医学, 10 : 897, 1955  
 15) 内藤益一, 他 : 結核, 増刊号, 1954  
 16) 齊藤紀仁, 他 : 結核, 増刊号, 1954  
 17) 内藤益一 : 日本臨床結核, 15 : 674, 1956  
 18) 小川政敏, 他 : 日本臨床結核, 15 : 778, 1956  
 19) Steenhen, W. Jr. and Wolinsky, E. : Amer. Rev. Tuberc., 59 : 221, 1949  
 20) Rake, G. and Donovan, R. : Amer. Rev. Tuberc., 60 : 143, 1949  
 21) Frank, L. Miller, et al. : Amer. Rev. Tuberc., 66 : 534, 1952  
 22) Emil Rothstein and Maurine Johnson. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 65, 1954  
 23) 内藤益一, 他 : 第33回結核病学会総会 (1958) にて発表  
 24) Hobby, G. L. and Lenert, T. F. : Amer. Rev. Tuberc., 63 : 435, 1951  
 25) Hobby, G. L. and Lenert, T. F. : Amer. Rev. Tuberc., 72 : 367, 1955  
 26) 岡野正光, 他 : 結核研究の進歩, 第22号, 47頁, 1958