

INH に対する併用剤としての Sulfisoxazole 並に Pyrazinamide の試験管内効果の検討

〔第4編〕 恒量置換培養法による耐性獲得実験

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

吉 村 百 助

（受付昭和33年12月20日）

〔内 容 抄 録〕

前編迄に著者は INH・PZA 併用, INH・Sulfisoxazole 併用及び INH・PZA・Sulfisoxazole 併用効果を検討した。本編に於ては之等併用に於ける INH の耐性獲得状況を観察せんと試みた。所で著者は実験を可及的生体内現象に近い状態で行うべく教室の今井の考案した恒量置換培養法を応用した。即ち上記の併用組合せ別に夫々の酸性、中性及び塩基性の 10% 血清加 Kirchner 培地で 5 代に亘り薬剤を置換接触せしめた後の結核菌の耐性度を 1% 小川培地を以て検し、INH 単独初代の耐性度を基として比較した処、併用は何れの場合も INH 単独時に比し INH の耐性を遅延せしめているが、この中 INH・Sulfisoxazole 併用が最も優れ次いで INH・PZA・Sulfisoxazole 併用で INH・PZA 併用が最も劣るという成績であり、第2編に於ける併用実験と同一の結果を得た。従つて INH・Sulfisoxazole 併用に PZA を加えて 3 剤併用としても無効である事が注目される。

第1章 緒 言

結核菌が抗結核剤例えば Streptomycin（以下 SM）、p-Aminosalicylic Acid（以下 PAS）、Isonicotinic Acid Hydrazide（以下 INH）等と接触する限りそれが生体内にせよ試験管内にせよ程度の差こそあれ早晚耐性を獲得するという事は当然の事と考えられる。この場合薬剤が単独よりも 2 剤併用した方が菌の耐性獲得度が低いと言う事は今日我々の常識となつている位である。従つて新しい有効な併用の組合せが見出されると必然的に菌の耐性獲得を検討すべく

実験が進められて行く。

著者は前編迄に INH・Sulfisoxazole（以下 SI）、INH・Pyrazinamide（以下 PZA）、INH・PZA・SI の併用効果に就いて試験管内実験を以つて検討して来た。そこで本編に於てはこれらの耐性獲得の状況を教室の今井¹⁾²⁾が考案した恒量置換培養法なる新しい方法を以つて観察せんとした。

第2章 実 験 方 法

1) 培養基

第1編第2章参照。

2) 被検薬物溶液

INH 単独, INH・10 倍量 SI（以下 10SI）併用, INH・10 倍量 PZA（以下 10 PZA）併用の被検液調製は第1編第2章参照。INH・10PZA・10SI 併用即ち 3 者併用のそれは第2編第2章参照。

3) 結核菌浮游液

第1編第2章参照。

4) 実験術式

恒量置換培養法の操作は各 10 本宛の特製ガラスキャップ付スピッツグラスを並列して酸性、中性、塩基性 3 種の 10% 血清加 Kirchner 培地を所定量分注し被検薬剤を夫々稀釈して種々の濃度とした。稀釈倍数は INH 単独, INH・10-PZA, INH・10SI, 及び INH・10PZA・10SI 何れの系列にても同じで INH の濃度は次の通りである。

尚、各 pH（酸性、中性、塩基性）毎に薬剤を全く含まぬ培地（以下 0r 培地）を後述する耐性検査時の対照の意味に於て設けた。

次いで各々に結核菌浮游液を 1 滴/cc 宛滴加してガラスキャップを施し孵卵器内に 4 週間培養した。而して耐地内の菌発育如何を判定したる後滅菌ピペットにて総てのスπιツグラスより上清を除去する。この場合菌はスπιツグラスの管底に残る。そこで他の試験管で新たに作成した薬剤含有量の等しい同組成の培地を夫々のスπιツグラスの注加し再びガラスキャップを施したる後孵卵器内に納める。以上によつて恒量置換培養は第 1 代目より第 2 代目に移つた訳である。以後 4 週毎に同様操作を施こして第 5 代目に至つた。

そこで著者は耐性判定を行うべく、実験第 5 代目に於て各 pH、各系列より 1r/cc 管、0.1 r/cc 管及び 0.01r/cc 管に於ける菌の 3 種と 0r 培地の菌を選出した。この理由は 1r/cc 濃

度の培地に於ける菌発育如何は勿論系列によつて異なるが、何れの被検系列にても阻止限界点の附近に当り、0.1 r/cc 濃度では或る程度の菌発育を確認しており、0.01r/cc 濃度では全く菌発育を阻止していない。又対照の 0r 培地では単に 10% 血清加 Kirchner 培地そのままの培地であるから菌発育は当然阻止されていない。斯様な濃度の培地に於て著者は前述の如くピベットにて上清を静かに除去したる後、滅菌生理的食塩水を適量加え遠心沈澱 5 分間、之を 2 度繰り返し充分菌を洗滌したる後、該菌を 1% 小川培地を以つて増菌した。次にこの菌を採り 1mg/cc の菌液を作り、予め調製した 100r/cc, 10 r/cc, 1 r/cc, 0.1 r/cc, 0.01 r/cc の割合に INH を含有せしめた 1% 小川培地を使用して夫々の耐性を検査し、4 週後に判定して菌発育を示す最高濃度を以つて耐性値とした。

第 3 章 実 験 成 績

第 1 表 酸性培地

継代 併用組合せ	第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代	5 代目耐性検査			
						1.0r/cc 培地内の菌	0.1r/cc 培地内の菌	0.01r/cc 培地内の菌	0r/cc 培 地内の菌
INH・10 PZA	0.02	10	10	10	10	(—)	100 (10000)	1 (100)	0.01
INH・10 SI	0.01	0.1	1	1	1	(—)	0.1 (10)	<0.01 (<1)	
INH・10PZA・10SI	0.01	1	1	1	1	(—)	1 (100)	<0.01 (<1)	
INH 単独	0.1	10	100	100	100	(—)	>100 (>10000)	1 (100)	

第 2 表 中性培地

継代 併用組合せ	第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代	5 代目耐性検査			
						1.0r/cc 培地内の菌	0.1r/cc 培地内の菌	0.01r/cc 培地内の菌	0r/cc 培 地内の菌
INH・10 PZA	0.01	100	100	100	100	(—)	10 (100)	1 (10)	0.1 [0.1]
INH・10 SI	0.005	0.1	1	1	1	(—)	0.1 (1)	0.01 (0.1)	
INH・10PZA・10SI	0.01	1	1	1	1	(—)	1 (10)	1 (10)	
INH 単独	0.02	10	100	>100	>100	(—)	>100 (>1000)	10 (100)	

第3表 塩基性培地

併用組合せ	継代					5代目耐性検査			
	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代	1.0 γ /cc 培地内の菌	0.1 γ /cc 培地内の菌	0.01 γ /cc 培地内の菌	0 γ /cc 培 地内の菌
INH・10 PZA	1	10	100	100	100	>100 (>1000)	10 (100)	1 (10)	0.1
INH・10 SI	1	10	10	10	10	1 (10)	0.1 (1)	0.01 (0.1)	
INH・10PZA・10SI	1	10	10	10	10	1 (10)	1 (10)	0.01 (0.1)	
IHH 単独	1	10	100	100	100	>100 (>1000)	10 (100)	0.1 (1)	

備考 1) 表中(—)は増菌時菌発育を認めなかつた事を示す。

2) 5代目耐性検査欄中の()内の数字は各 INH 含有培地内菌の耐性度を 0 γ /cc 培地内菌のそれを基準として倍数にて表わしたもの。

3) 0 γ /cc 培地内の菌欄中()内の数字は置換前(最初)の菌発育許容最低濃度を示す。

第1～3表に示す実験成績は INH・10PZA, INH・10SI 及び INH・10PZA・10SI の3種の併用組合せと INH 単独とに行つた恒量置換培養法による各代毎の菌発育許容最高濃度で、各表の右に示せるは各 pH 培地、各系列毎に選出した3種の5代目菌(1, 0.1, 0.01各 γ /cc の濃度に夫々 INH を含有する培地内の菌)と 0 γ 培地内の5代目菌に就き INH 耐性度を調べた成績である。

さてこの耐性検査成績の基準となるのは各 pH 毎の 0 γ 培地にて置換せる5代目菌の発育許容最高濃度であり即ち酸性 0.01 γ /cc, 中性, 塩基性共に 0.1 γ /cc で之に基づいて実験成績全般を観察していくと次の通りである。尙表中備考欄に記載の如く 1 γ /cc 培地内の菌は酸性及び中性培地何れにても増菌時菌発育を認めなかつたので対照と比較し得ない為に省略した。亦著者の実験に使用した結核菌 H₃₇Rv 株の INH 耐性度を予かじめ 1% 小川培地にて検したる処, 0.1 γ /cc であつた事を確認したので表中, 中性培地培地 0 γ 内の欄に記載した。

所で単独並びに併用群の成績をみるに酸性培地では 0.1 γ /cc 内の菌(以下 0.1 γ 菌)に関しては、併用の3種は何れも単独に比し耐性度は低いが特に INH・10SI は 0.1 γ cc で耐性度は10倍にすぎない。0.01 γ 菌では INH・10PZA 時は単独と同様 100 倍耐性度であるが INH・10SI

及び INH・10PZA・10SI 時では5代目菌に拘らず 0 γ 菌よりも耐性度が低いという成績を示している。中性培地では 0.1 γ 菌に関しては酸性培地同様、併用3種は何れも単独より耐性度は遙かに低く就中 INH・10SI は 0 γ 菌と同等の成績であり、亦 0.01 γ 菌では逆に 0 γ 菌以下という低い成績を示した。塩基性培地では 1 γ 菌にて INH・10PZA は単独時と同程度の耐性を示したが INH・10SI, INH・10PZA・10SI では共に10倍の耐性であつた。0.1 γ 菌でも同様の傾向を示し亦 0.01 γ 菌では 0 γ 菌に於けるよりも耐性度は低い。

第4章 考 按

結核菌の抗結核剤に対する耐性獲得状況を観察した試験管内実験は現在迄に非常に多く^{3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10) 11) 12)} 就中著者の実験項目に関連したものの中 INH・PZA に就いては夫々若干見解の相違を認めるのであるが、それらの実験方法は多くは増量継代培養法に依つてゐる。しかも INH・SI・PZA 3者併用の効果を検索したものは無い。著者は実験を可及的生体内現象に近い状態で行ないたいという目的の為に恒量置換培養法なる実験方法を応用した次第である。これなれば結核菌が生体内で薬剤に対して耐性を獲得する模型の実験と見做して差支えないものと思ふ。

そこで実験成績に於いて増菌時菌発育を認めなかつた酸性及び中性培地の 1r 菌を除き INH 耐性度を比較検討すると各併用は単独時に比し明らかにその効果を発現している事を知つた。そして併用 3 種の中 INH・10SI が最も優れており、INH・10PZA・10SI の 3 剤併用が之に次ぎ INH・10PZA が最も劣つている。之を前篇に於ける試験管内阻止実験の成績とあわせ考えると INH・10SI に PZA を加えて 3 者併用としても阻止効果の上からも亦耐性獲得の上からも余り有利なものと考えられない。次に培地の INH 濃度別に見ると 1r 菌よりも 0.01r 菌即ち低い INH 濃度の培地に浸した菌の方が INH に対する耐性獲得度が低い。培地 pH では中性が酸性及び塩基性よりも耐性獲得度が高い傾向にある。

第5章 結 論

INH・SI 併用、INH・PZA 併用、INH・PZA・SI 併用の耐性獲得状況を恒量置換培養法なる新しい方法を以て観察した結果、

1) 何れも INH 単独よりも耐性獲得遅延を認めたが、INH・SI 2 剤併用が最も作用が強

く、次いで INH・PZA・SI 3 剤併用、最後に INH・PZA 2 剤併用の順であつた。

2) 培地の INH 濃度別に見ると高濃度 INH 培地に浸した菌の方が、又 pH では中性培地の方が耐性獲得度が高い傾向を示した。

(欄筆するに当り御援助を賜つた渡辺林造博士に深甚の謝意を捧げます。)

文 献

- 1) 今井節朗；胸部疾患，**1**，25，1957
- 2) 同上；同上，**1**，214，1957
- 3) 内藤益一；結核の臨床，**3**，458，1955
- 4) 同上；日本臨床結核，**15**，674，1956
- 5) 染谷四郎他；Chemotherapy，**4**，154，1956
- 6) 芳賀敏彦；結核，**30**，611，1955
- 7) 中院孝門他；Chemotherapy，**4**，166，1956
- 8) 芦野芳久；抗酸菌病研究雑誌，**8**，238，1953
- 9) Solotorovsky et al；Tr. 13 th Conf. on the Chemo. Tbc. (p. 172)，1954
- 10) Karlson et al；Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic，**27**，239，1952
- 11) Feldman et al；Am Rev. Tbc. **57**，162，1948
- 12) 国枝義治；京大結研紀要，**6**，1958