

薬剤併用の結核菌耐性発現に及ぼす影響に関する研究

〔第1篇〕 Isoniazid と Pyrazinamide 又は Sulfisoxazole 併用が結核菌の Isoniazid 耐性に及ぼす影響に就いて

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤 益一）
和風会医学研究所附属加茂川病院（院長 西岡 諄）

国 枝 義 治

【内 容 抄 録】

結核菌 $H_{37}R_v$ 株を用いて Isoniazid (INAH) に Pyrazinamide (PZA) 及び Sulfisoxazole (SI) を夫々併用した試験管内実験を行い、両剤の INAH 耐性発現に及ぼす影響を観察した。薬剤濃度を一定にしてその効力低下を防ぐ為に恒量置換培養法を用いた。その結果、PZA は INAH との併用時に INAH 耐性発現を阻止し得ず、SI はそれを遅延せしめるのを認めた。

緒 言

今日結核の化学療法は2剤以上の併用が常識となっており、新しい抗結核剤の発見と併行してその併用法の研究が広く行われている。

Isoniazid (INAH) についてもその強力な抗結核作用にも拘らず耐性発現の速やかな点から、既に発見当時より他剤との併用が考慮され、先づ Para-aminosalicylic acid が用いられたが、最近では Pyrazinamide (PZA) 及び Sulfisoxazole (SI) の INAH に対する併用効果が一般に認められ広く用いられつつある。

PZA 及び SI の INAH 耐性に及ぼす影響に就ては数多くの報告がある。PZA に就いては INAH 耐性発現を阻止するとするもの¹⁻⁸⁾とそれを否定するもの⁹⁻¹⁷⁾とが相半ばする状態であり、SI に関しては大多数がその INAH 耐性阻止効果を認めているが、^{10,18,-25)} 著しい効果を認めていないもの²⁵⁾もある。之等諸家の意見に見られる相違は臨床例に於てはその Background 或は薬剤投与量の相違に、又基礎的実験では種々の実験条件の差違によるものと思われる。著者は試験管内で出来るだけ生体内の状

態に近い環境を得る為に恒量置換培養法を用い、且つ、培地内の薬剤含有量は臨床的に INAH と PZA、又は SI を併用する場合の投与量に基づき常に両剤の比が一定になる様にして試験管内併用実験を行い、PZA 及び SI が INAH 耐性発現に如何なる影響を及ぼすかを観察した。

実 験 方 法

培養基：10%牛血清加 Kirchner 培地

結核菌浮游液：植継後2週位のよく発育した $H_{37}R_v$ 株を使用、硝子玉入肉厚コルベンを用いて均等浮游液を作り試験管内で生理的食塩水で稀釈し、比濁により菌量約 1.0mg/cc の菌浮游液を調製した。

被検薬剤溶液：INAH は蒸留水で所期の濃度に溶解後、100°C 30分間加熱滅菌した。PZA は70%アルコールで僅かに加温溶解後、放置滅菌した。SI は20% Thiasin 注射液を用いた。

実験術式：4個の小三角コルベンに10%血清加 Kirchner 培地を分注し、その1個に INAH : PZA = 1 : 10の割合になる様、所期の濃度に両剤を入れてよく混和し、次いで他のコルベンに順次稀釈して各コルベン内の INAH 濃度が1cc 中各々 5 γ , 0.5 γ , 0.05 γ 0.005 γ となる様にした。同じものを SI についても作り、INAH と SI の割合は同じく 1 : 10 とした。対照として、INAH 単独に就いても各濃度の培地を作った。之等コルベンの内容を夫々5本のガラスキャップ付スピッツグラスに2cc 宛分注、その各々に先に調製した菌液を各2滴ずつ接種し孵卵器内で培養した。なお、実験対照として薬剤

を含有しない培地にも培養を行つた。培養4—5週後、各系列のスピッツグラスの1本を用いて第1代目の耐性検査を行い、他の4本は底部の菌を残して大部分の培養液を捨て、新たに調製した同一薬剤濃度の培養液を注入して再び孵卵器に収めた。同様の操作を4—5週毎に繰返して薬剤濃度の等しい新しい培養液で置換すると同時に、各代の菌の INAH に対する耐性を測定した。

成績判定：1ヶ月毎に1本のスピッツグラス内の菌を生理的食塩水を用いて3回洗滌し、それを1%KH₂PO₄培地に接種増菌後、夫々の菌について1.0mg/ccの菌浮游液を作り、その0.1cc宛を予め INAH を種々の濃度に含有せし

めた1%KH₂PO₄培地に接種し、4週間培養後その耐性を判定して菌発育を認めた最高濃度を以て耐性値とした。

実 験 成 績

第1表は INAH 単独の場合に於ける成績である。即ち、INAH 単独では5γ/cc及び0.5γ/ccの濃度に於ては2代目より、又0.05γ/ccの濃度では3代目より100γ/cc耐性を示したが、5代目でもなお100γ/cc耐性に留つた。INAH濃度が、0.005γ/cc、即ち INAH の結核菌に対する発育阻止最低濃度以下の場合には耐性上昇は僅かで、5代目でもなお0.31γ/cc耐性であつた。

第 1 表 INAH 単独時に於ける INAH 耐性発現状況

代	耐性検査培地 INAH γ/cc 培地 薬剤	200	100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	K
I II III IV V	INAH 単独 5γ/cc	— — (—) — —	— ++ (—) ++ +35	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	— ++ (—) ++ ++	+2 ++ (—) ++ ++	+2 ++ (—) ++ ++	++ ++ (—) ++ ++
I II III IV V	INAH 単独 0.5γ/cc	— — — — —	— +3 +1 ++ +20	+30 +10 +3 ++ ++	+42 +7 +20 ++ ++	+32 ++ ++ ++ ++	+35 ++ ++ ++ ++	+20 ++ ++ ++ ++	+43 ++ ++ ++ ++	+25 ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++
I II III IV V	INAH 単独 0.05γ/cc	— — — — —	— — ++ ++ +9	— — ++ ++ ++	— — ++ ++ ++	— — ++ ++ ++	— — ++ ++ ++	— +1 ++ ++ ++	— +1 ++ ++ ++	— +2 ++ ++ ++	— +5 ++ ++ ++	+3 ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++
I II III IV V	INAH 単独 0.005γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — +1	— — — +2 +1	— — — +2 +1	— — — +4 +2	+5 +2 +2 +2 +2	++ ++ ++ ++ ++
I II III IV V	INAH 単独 0γ/cc											— — — —	— +2 +1 +2	+4 +2 ++ ++	++ ++ ++ ++

註：(—) は増菌時菌発育を認めなかつた事を示す

+ = 集落数が 100以下

++ = 100~200

+++ = 融合を示す

第2表は INAH. PZA 併用時の INAH 耐性の発現状況である。即ち、この場合は INAH の濃度が5γ/cc及び0.5γ/ccでは2代目より、

0.05γ/ccでは4代目より100γ/cc耐性を示した。即ち、INAH 単独時と殆ど差が認められなかつた。

第 2 表 INAH. PZA 併用時の INAH 耐性発現状況

代	耐性検査培地 INAH γ/cc 培地 薬剤	200	100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	K
I II III IV V	INAH5γ/cc + PZA50γ/cc	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	+ ² (—) —	— (—) —
I II III IV V	INAH0.5γ/cc + PZA5γ/cc	— — — —	— — — —	+ ² — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
I II III IV V	INAH0.05γ/cc + PZA0.5γ/cc	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+ ⁵⁰ — — —	— — — —	+ ⁶ — — —	— — — —
I II III IV V	INAH 0.005γ/cc + PZA0.05γ/cc	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+ ¹ + ³ + ³ —	— — — —

第 3 表 INAH. SI 併用の時の INAH 耐性発現状況

代	耐性検査培地 INAH γ/cc 培地 薬剤	200	100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	K
I II III IV V	INAH5γ/cc + SI 50γ/cc	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —	— (—) —
I II III IV V	INAH0.5γ/cc + SI 5γ/cc	— — — —	— — — —	+ ⁸ — — —	+ ¹⁰ — — —	+ ²² — — —	+ ⁴⁶ — — —	+ ⁵⁰ — — —	+ ⁵⁰ — — —	+ ⁸ — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
I II III IV V	INAH0.05γ/cc + SI 0.5γ/cc	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+ ³ — — —	+ ³⁰ — — —
I II III IV V	INAH0.005 γ/cc + SI 0.05γ/cc	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+ ² + ¹ — —	— — — —

一方, INAH, SI 併用では, 第 3 表の如く INAH の濃度が 5γ/cc の場合, 3 代目でもなお 0.16γ/cc 耐性に留まり, 4 代以後は増菌時に菌増殖を認めなかつた。INAH 濃度が 0.5γ/cc では 2 代目より, 50γ/cc, 4 代目より 100γ/cc

耐性を示し, INAH 単独時に比べてやや遅延効果が認められる程度であつたが, INAH 濃度 0.05γ/cc では 4 代目で 5γ/cc, 5 代目でも 25γ/cc 耐性に留まり, 著しい遅延効果を示した。

INAH 濃度 0.005γ/cc では INAH 単独の場合

と同様、殆んど耐性の上昇を認めなかつた。

総括並びに考按

1) INAH, PZA 併用の場合には、各培地に於ける INAH 耐性の上昇は INAH 単独時のそれと同程度があつた。即ち、PZA の INAH 耐性発現に対する阻止効果は認められなかつた。Solotorovsky 等⁷⁾ 及び染谷等³⁾ は INAH, PZA 併用による試験管内実験で、PZA は INAH 耐性発現を防止したと報告しているが、彼等は何れも各種濃度の INAH 含有培地に 50 γ /cc の濃度になる如く PZA を添加して継代培養を行つて居り、INAH と PZA の比を臨床使用量に応じて常に一定にし、且つ同濃度の薬剤を含有する培地で置換した著者の実験とは条件が異つている。今井⁶⁾ は INAH と PZA の比を 1:10 にして増量継代培養を行い、PZA の INAH 耐性発現に対する阻止効果を認めなかつたと報告している。Perry²⁸⁾ は PZA は INAH に対して一定の耐性度を持つた耐性菌に対して特に抗菌作用が強いと述べており、又 Mc Dermott²⁾ は PZA は何らかの変化をうけた菌に効力があると云つているが、神頭は³⁰⁾ INAH 耐性菌を用いた試験管内実験で PZA のそれに対する静菌力は INAH 感受性菌に対する静菌力と同程度であつたと述べている。しかし最近、神尾³¹⁾ の報告では、INAH 感受性菌に対するよりも同耐性菌に対する方が PZA の静菌力は多少強いと云う事実を認めている。それは兎も角、著者の実験では PZA は INAH 耐性発現に対して阻止効果を示さず、上述の今井の成績を裏書することになつた次第である。

2) INAH と SI 併用の場合には、SI の INAH 耐性遅延効果が見られた。それは INAH 濃度 5 γ /cc 及び 0.05 γ /cc の培地に於て著しかつたが、INAH 濃度 0.5 γ /cc 培地でもやや遅延の傾向が認められた。

SI については試験管内実験の場合、INAH 耐性発現の阻止効果を認めた報告が多い。即ち、東村等²³⁾ は各種の Sulfonamide の中で、Sulfathiazol 及び SI が SM 及び INAH 耐性発現に対する阻止作用が最も強かつたと述べ、その機作として SM 又は INAH のある濃度に於ける

感性菌は、SM 又は INAH により阻止され、少数の残存した耐性菌は、少数である為に単独では著明な阻止力を認めない濃度の SI によつて阻止されるためと思われると述べている。因みに内藤等³³⁾ は、SI の菌発育阻止濃度に及ぼす種々の因子を検討し、その中接種菌量に就いては、菌量が 0.001mg/cc の場合は 0.1mg/cc の場合に比し、その発育阻止力が著しく増強し 7.8 γ /cc と約 1/128 以下となる事があると報告している。又、伊庭²¹⁾ は、増量継代法及び恒量置換法の両者を用いて INAH, SI の試験管内併用実験を行い、その何れに於ても SI が INAH 耐性を著明に阻止したと報告しているが、恒量置換培養法の場合も、管底に菌発育を認めた最高濃度を INAH 耐性度としている点で著者の実験方法と異つている。即ち、著者の実験では、管底に発育を認めた培地内の菌は勿論、発育を認めなかつた培地内の菌についても、増菌を行つた後耐性検査を行つて真の耐性度を測定したのである。

SI の場合も石上³²⁾ は、INAH 感性菌に対するよりも INAH 耐性菌に対して強い抗菌力を認めているが、神尾³¹⁾ は INAH 耐性菌の中、カタラーゼ陰性菌は SI によりやや強く発育を阻止されるが、カタラーゼ陽性菌に於ては SI の発育阻止濃度は、感性菌に対する値と同程度であつたと述べている。

SI の INAH 耐性発現阻止効果の機序はなお不明であり、INAH 耐性獲得機序の究明と共に今後に残された課題である。

結 論

結核菌 H₃₇R₇ 株を用いて恒量置換培養法により、INAH と PZA 又は SI との試験管内併用実験を行い、その INAH 耐性発現に及ぼす響を観察し、次の結果を得た。

1) PZA は INAH との併用時に、INAH 耐性発現を阻止しなかつた。

2) SI は INAH との併用時に、INAH 耐性発現を遅延せしめた。

擱筆するに当り終始御援助を賜つた津久間博士、今井博士に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 熊谷謙二：日結, 16—8, 578, 1957
- 2) 島本多喜雄：日本医事新報1695, 13, 1956
- 3) 高橋文雄他：新薬と臨床, 6—8, 707, 1957
- 4) 三上次郎他：日結, 16—3, 203, 1957
- 8) Livings, G: Tr. 15th Conf. on the Chemoth of Tbc 1956.
- 6) Yeager, R. L. et al: Am. Rev. Tbc., 75, 1012, 1957.
- 7) Solotorovsky, M. et al: Tr. 13th Conf. on the Chemoth. of Tbc 1954.
- 8) 染谷四郎他：日本細菌学雑誌, 11—11, 985, 1956
- 9) 熊谷岱藏他：日結, 14—10, 839, 1955
- 10) 平敷安正他：日結, 15—4, 308, 1956
- 11) 田坂定孝他：結核, 30—12, 747, 1955
- 12) 長村重之他：結核, 30—12, 748, 1955
- 13) 旗野脩一他：最新医学, 11—12, 2862, 1956
- 14) 芳賀敏彦：結核, 30—10, 611, 1955
- 15) 中院孝門他：Chemotherapy, 4-3, 166, 1956.
- 16) 今井節朗：胸部疾患, 1, 214, 1957
- 17) Steenken, w. et al: Am. Rev. Tbc., 76, 643, 1957.
- 18) 内藤益一他：綜合臨床, 3—4, 496, 1954
- 19) 斎藤紀仁他：日結, 15—10, 694, 1956
- 20) 牛場大蔵他：日結, 15—10, 664, 1956
- 21) 小川政敏他：日結, 15—11, 778, 1956
- 22) 小川辰次他：最新医学, 12—1, 39, 1957
- 23) 桜井宏他：綜合臨床, 6—10, 1987, 1957
- 24) 伊庭一男：京大結研紀要, 6—1, 13, 1957
- 25) 東村道雄他：J. Antibiotics Ser. B., 8-9, 409, 1955.
- 26) 江波戸欽弥：呼吸器診療, 12—2, 157, 1957
- 27) 今井節朗：胸部疾患, 1, 25, 1957
- 28) Perry, C. R. et al.: Am. Rev. Tbc., 72, 840, 1955.
- 29) McDermott, W. et al: Am. Rev. Tbc., 74, 100, 1956.
- 30) 神頭勝太：胸部疾患, 1, 198, 1957
- 31) 神尾彰：京大結研紀要, 7-2, 1959
- 32) 石上敏幸：京大結研紀要, 6—2, 233, 1958
- 34) 内藤益一他：胸部疾患, 2—5, 232, 1958