

Griselimycine の半合成誘導体 27753RP の抗結核作用に関する試験管内実験的検討

第3編 交叉耐性について

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学一

柴 田 安 宅

(昭和59年2月3日受付)

第1章 緒 言

今日、肺結核の治療において、streptomycin (SM), isoniazid (INH), para-aminosalicylic acid (PAS) の一次抗結核薬のみならず kanamycin (KM), cycloserine (CS), ethionamide (TH), capreomycin (CPM), ethambutol (EB), rifampicin (RFP) 等のいわゆる二次抗結核薬に対しても耐性を有する患者数の増加が、特に憂うべき問題として提起されている。これを解決するために既存の抗結核薬と交叉耐性を有しない新しい抗結核薬の出現が望まれている。

第1編で著者は 27753 R.P. (以下 R.P. と略す) の試験管内抗結核作用について間歇作用、短期間作用及び連続作用の面から検討を行ない、R.P. が SM よりも優れ、RFP より劣るもののそれに近い抗菌力を示すことを報告した。

また、第2編では既存の抗結核薬との併用効果を検討した結果、INH との間にやや相乗作用を示し、我国では余り繁用されない pyrazinamide (PZA) との間にやや拮抗作用を認めたことを報告した。

本編では著者は R.P. が既存の抗結核薬と交叉耐性を有するか否かについて、シリコン被覆スライド培養法 (SSC 法) を用いて試験管内実験を行なったのでその成績を報告する。

第2章 試験管内作製の各種抗結核薬耐性 $H_{37}R_v$ 株に対する R.P. の交叉耐性について

第1節 実験材料及び実験方法

試験管、シリコン被覆スライド (S.S), 菌接種方法、培地などは第1編と同様である。菌株は試験管内で作製した TH, RFP, PAS, INH, EB, CS, SM, viomycin (VM), CPM, KM, enviomycine (EVM) に対する各耐性株及び対照として教室保存の $H_{37}R_v$ 感受性株を使用した。各薬剤に対する耐性度 ($\mu\text{g/ml}$) は表1 (薬剤名横の () 内数字) に示す通りである。

薬剤作用温度: 37°C とした。

薬剤希釈列: R.P. を秤量しプロピレングリコールで溶解し第1管の10倍濃度の希釈液を作製しておく。次に血清加キルヒナー培地を第1管に 5.4 ml を、以後第10管までをそれぞれ 3 ml ずつ分注する。ついで第1管薬剤濃度の10倍に調製した R.P. 希釈液を 0.6 ml 第1管に入れ、第2管から第9管まで順次倍数希釈を行ない、第10管は薬剤非含有培地 3 ml とした。

被検菌株: 各耐性株の菌集落を集めて 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液を作り、池田³⁾の方法によりその菌液中に SS を数秒間浸漬して菌を付着させた。この結核菌付着 SS を前述の薬剤含有培地系列及び薬剤非含有培地に耳鼻科用ピンセットで投入し、 37°C で培養した。

表1 27753RP の交叉耐性 (試験管内作製耐性株)

試験管番号 耐性株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
TH (125)										
PFP (125)										
PAS (125)										
INH (100)										
EB (500)										
CS (62)										
SM (1000)										
VM (1000)										
CPM (1000)										
KM (1000)										
EVM (1000)										
H ₃₇ Rv (感)										
H ₃₇ Rv (感)										

薬液濃度：RP第1管10 μ g/ml以後培数希釈法による。耐性株：()内は耐性度 μ g/ml

判定方法：結核菌発育阻止効果の判定は薬剤作用後3週間目に行なった。肉眼的にSS上に発育した結核菌の集落がSS表面の2/3以上覆う時(卅)，2/3～1/3の時(十)，1/3以下の時(+)，集落数100以下の時はその数は記入した。

第2節 実験成績

表1に示す。各薬剤耐性株に対するR.P.のMICは教室保存のH₃₇Rv感受性株と同様に0.156～0.313 μ g/mlであった。即ち、いずれの耐性株についても交叉耐性を認めなかった。

第3章 患者分離株に対するR.P.の交叉耐性について

第1節 実験材料及び実験方法

培地：1%小川培地

菌株：患者分離株(62株)

被検薬剤：SM, PAS, INH, KM, CS, TH, EB, TUM, RFP及びR.P.とした。その添加濃度(μ g/ml)は表2(薬剤名下方の数字)に示す。

表2 27753RP の交叉耐性 (患者分離株)

実験 回数	NO	患者名	SM				PAS			INH			KM				CS				TH				EB				TUM				RFP				RP																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			K	K	20	200	1	10	0.1	1	5	25	100	20	40	25	50	25	5	10	25	100	10	25	50	10	50	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
第 1 回	1	S.M																22																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</

添加濃度の単位： μ g/ml

数字→コロニー数

薬剤作用温度：37°C とした。

実験操作：間接法を用いた。患者から分離された菌集落をガラス玉磨砕フラスコに入れ磨砕する。菌が均等にひきのばされたら、冷却滅菌蒸留水を加え、標準バリウム液を用いて、1 mg/ml 菌液の標準濁度に補正する。これを冷却滅菌蒸留水で100倍に希釈を行ない 0.01 mg/ml の菌液とし、これを各薬剤を含有した耐性検査用小川培地に 0.1 ml ずつ流し込み、37°C で4週間培養した。

判定：4週間後、肉眼的に行なった。

第2節 実験成績

表2～表5に示す。既知の抗結核薬に感受性を示す分離株及び他剤耐性分離株に対して1%小川培地における R.P. の MIC は、Niacin test 陰性である5例を除く57例中1例が 10 μ g/ml であったが、残りの56例では 50～100 μ g/ml であり、教室保存の H₃₇Rv 株と同様であった。また交叉耐性を示さなかった。尚、Niacin test 陰性である5例はすべて R.P. 100 μ g/ml にま

で耐性を示した。

第4章 総括及び考按

結核化学療法の理想は生体内の結核菌を一掃することである。長期化学療法後にも、しばしば病巣内に結核菌が検出されているが、この結核菌が新しい抗結核薬に対して耐性があるか、感性があるかは、その後の治療を続けてゆく上で大きな問題である。

豊原⁴⁾は R.P. の抗結核作用を10%血清加キルヒナー液体培地、Dubos 液体培地、1%小川培地を用いて検討している。それによると、R.P. の抗菌力はこれら培地によって異なり、1%小川培地では低下し 50 μ g/ml で結核菌の発育を阻止した。また、RFP を含む耐性株にも感受性を示し、交叉耐性を認めなかった。

著者は試験管内作製耐性株に加え、患者分離株(62株)を使用して、R.P. との交叉耐性の有無を検討した。しかし、いずれの場合も他の薬剤と交叉耐性を示さなかった。これらの成績か

表3 27753RP の交叉耐性(患者分離株)

実験回数	NO	患者名			SM		PAS		INH			KM		CS		TH			EB			TUM			RFP			RP		
			K	K	20	200	1	10	0.1	1	5	25	100	20	40	25	50	25	5	10	25	100	10	25	50	10	50	100		
第3回	1	T.A																												
	2	I.N																												
	3	A.K																												
	4	T.Y										4																		
	5	N.M																												
	6	Y.S										4																		
	7	T.M			1																									
	8	K.A																			8									
	9	M.M																												
C	H37Rv													20																
第4回																														
	1	K.K																												
	2	J.M																												
	3	H.N																												
	4	K.Y																							30					
	5	T.N																												
	6	S.S																												
	7	Y.W																												
C	H37Rv																													

添加濃度の単位： μ g/ml

数字→コロニー数

ら, RFP 以後, 新抗結核薬の出現をみない今日, R.P. は興味ある新薬というよう。

第5章 結 語

試験管内で作製した TH, RFP, PAS, INH, EB, CS, SM, VM, CPM, EVM, の各耐性 H₃₇Rv 株及び患者分離株 (62株) に対する R.P. の交叉耐性について検討した。

1) R.P. の MIC は10%血清加キルヒナー液体培地では 0.156 µg/ml~0.313 µg/ml であった。1%小川培地では 50 µg/ml~100 µg/ml であった。

2) 試験管内作製耐性株及び患者分離株のいずれも R.P. と交叉耐性を示さなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり, 終始御懇篤な御指導, 御鞭撻を賜った川合満講師, 池田宣昭講師に深甚なる謝意を表する。また終始御協力頂いた山鳥英世博士, 研究室の西尾貞子, 本間トキエの各氏に心から感謝する。そしてこの研究の機会を与えてくださった医療法人医仁会武田病院の武田隆男理事長と武田保秀院長に厚く御礼致します。

参 考 文 献

- 1) 東向一郎: 京大結研紀要, 7: 461, 1959.
- 2) 東向一郎: 京大結研紀要, 7: 22, 1959.
- 3) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12: 21, 1963.
- 4) 豊原希一: 結核, 55: 473, 1980.

EXPERIMENTAL STUDIES IN VITRO ON THE ANTITUBERCULOUS ACTIVITIES OF 27753RP (R.P), A SEMISYNTHETIC DERIVATIVE OF GRISELIMYCINE

III. Cross Resistance of R.P

Ataka SHIBATA

*The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan*

The H₃₇Rv strains, which were made resistant to each of TH, RFP, PAS, INH, EB, CS, SM, VM, CPM and EVM, were used. The cross resistance against R.P was investigated using these strains as well as resistant strains isolated from patients.

The results obtained are as follows:

1. In Kirchner's liquid medium with 10% bovine serum, MIC of R.P against the resistant H₃₇Rv strains in vitro were from 0.156 to 0.313 mcg/ml.
2. There was no cross resistance against R.P with other antituberculous drugs tested.
3. The MIC of R.P against the resistant strains isolated from patients as well as sensitive H₃₇Rv strain, around 50 mcg/ml in Ogawa's egg medium.