

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2篇」 Isoniazid と Viomycin 或は Cycloserine 併用が結核菌の各薬剤に対する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 諱）

国 枝 義 治

【内 容 抄 録】

本篇では Isoniazid (INAH) に Viomycin (VM) 及び Cycloserine (CS) を夫々併用して試験管内恒量置換培養を行い、結核菌 $H_{37}R_v$ 株の之等3剤に対する耐性発現状況を5代に亘り観察した。その結果、INAH 耐性は VM との併用により著明に阻止され、CS との併用でもかなり遅延せしめられること、VM 耐性は INAH 併用によりやや遅延する傾向があること、及び CS 耐性は単独時及び INAH 併用時ともに5代までは発現しないことを認めた。

緒 言

前篇¹⁾に於て著者は Pyrazinamide (PZA) 及び Sulfisoxazole (SI) を夫々 Isoniazid (INAH) に併用した場合、両剤が INAH 耐性発現に如何なる影響を及ぼすか、を恒量置換培養法を用いた試験管内実験で観察した。その結果、PZA は INAH 耐性を殆んど阻止せず、SI はかなりそれを遅延せしめることを認めた。

今回は INAH に対する併用剤として Viomycin (VM) 及び Cycloserine (CS) を用い、同じく恒量置換培養法による試験管内実験を行つて、両剤の INAH 耐性に及ぼす影響及び INAH の両剤耐性に及ぼす影響を観察した。

VM は発見当初は単独毎日注射を行つた為に、腎障害を主とする毒性が全例に見られた。その後、併用法²⁾、間歇法³⁾が始められて、毒性少く且つ VM 耐性発現も阻止されることが認められたが、その後多くの報告⁴⁾⁻¹⁰⁾は VM 1日 2g 週2回注射に Streptomycin (SM), Para-aminosalicylic acid (PAS) 或は INAH を併用

してその何れに於ても効果を認めており、中でも INAH との併用で最もよい成績が得られた、との報告⁵⁾もある。

CS に就いても、その毒性と比較的弱い抗菌力の為に他の抗結核剤との併用がすすめられており、併用剤として INAH を用いた報告¹¹⁾⁻¹⁶⁾が多く、CS 0.5~1.0g に INAH 0.3g を毎日併用してその優秀性を認めている。

之等併用法の有効性を耐性の面から検討したのが今回の試験管内実験である。

実 験 方 法

培養基、結核菌浮游及び実験術式は第1篇¹⁾と同様である。培地内の各薬剤の比は、両剤の臨床使用量に基き INAH: VM = 1:6, INAH: CS = 1:3 となる様にした。

実 験 成 績

第1表は INAH 単独時の成績である。即ち、INAH 5 γ /cc 及び 0.5 γ /cc 培地では2代目より 100 γ /cc 耐性を示し、INAH 0.05 γ /cc 培地では3代目より 10 γ /cc 耐性を示したがそれ以上は耐性上昇を見なかつた。INAH 0.005 γ /cc 培地では耐性上昇は殆んど認められなかつた。

之に対し、VM を併用した場合の INAH 耐性は第2表の如く、INAH 濃度 5 γ /cc 培地では4代目に於ても INAH 0.16 γ /cc 培地に僅か1コロニーの発育が見られただけで、5代目にはもはや増菌せしめることが出来なかつた。又、INAH 濃度 0.5 γ /cc 培地では3代目まで耐性上昇を認めず、4代目に 0.31 γ /cc 耐性、5代目に

第 1 表 INAH 単独時の INAH 耐性の推移

代	耐性検査培地 INAH γ/cc 培地薬剤	200	100	50	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	— — — — + ₂	— — — — —	+ ₁₀₀ — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
I II III IV V	INAH 単独 0.5γ/cc	— — — — —	— — — — —	+ ₁ — — — —	+ ₅ — — — —	+ ₇ — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
I II III IV V	INAH 単独 0.05γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	+ ₈ — — — —	+ ₁₆ — — — —	+ ₁ — — — —	+ ₁ — — — —	— — — — —
I II III IV V	INAH 単独 0.005γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	+ ₁ — — — —	— — — — —
I II III IV V	INAH 単独 0 γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —

註： +==集落数が100以下

—==100~200

—==融合を示す

第 2 表 INAH. VM 併用時の INAH 耐性の推移

代	耐性検査培地 INAH γ/cc 培地薬剤	100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	K
I II III IV V	INAH 5γ/cc + VM 30γ/cc	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	(—) (—) (—) (—) (—)	+ ₄ (—) + ₂ (—) + ₁ (—)	(—) (—) + ₂ + ₁ (—)	(—) (—) + ₂ + ₁ (—)
I II III IV V	INAH 0.5γ/cc + VM 3γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	+ ₂ — — — —	+ ₂ — — — —	+ ₂ — — — —
I II III IV V	INAH 0.05γ/cc + VM 0.3γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	+ ₂ — — — —	+ ₃ — — — —	+ ₁ — — — —
I II III IV V	INAH 0.005γ/cc + VM 0.03γ/cc	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	+ ₆ — — — —	+ ₃ — — — —

註： (—)は増菌時菌発育を認めなかつた事を示すもの

第3表 INAH. CS 併用時の INAH 耐性の推移

代	耐性検査培地 INAH γ/cc		100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	K
	培地薬剤													
I IV V	INAH 5 γ/cc + CS 15 γ/cc		(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)
I IV V	INAH 0.5 γ/cc + CS 1.5 γ/cc		- - - + ₉₀	- - + +	- - + +	+ ₃₂ + ₂ + ₃₆ +	++ ++ ++ +	++ ++ ₂₂ ++ ₄₀ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +
I IV V	INAH 0.05 γ/cc + CS 0.15 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - +	- - - +	+ ₃ - + ₃ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +
I IV V	INAH 0.005 γ/cc + CS 0.015 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - +	- - - +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +

第4表 VM. INAH 併用時と VM 単独時の VM 耐性発現状況の比較

代	耐性検査培地 VM γ/cc		2000	1000	500	200	100	50	25	12.5	K	耐性検査培地 VM γ/cc		500	200	100	50	25	12.5	K
	培地薬剤											培地薬剤								
I IV V	VM単独 30 γ/cc		(-) (-) (-) -	(-) (-) (-) -	(-) (-) (-) -	(-) (-) (-) -	(-) (-) (-) -	(-) (-) (-) -	+ ₉ (-) (-) +	++ (-) (-) ++	++ (-) (-) ++	VM 30 γ/cc + INAH 5 γ/cc		(-) (-) (-) (-)	(-) (-) (-) (-)	(-) (-) (-) (-)	(-) (-) (-) (-)	+ ₁₃ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ (-) (-) (-)
I IV V	VM単独 3 γ/cc		- - - -	- - + ₉₇ -	- + ₅ ++ +	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	VM 3 γ/cc + INAH 0.5 γ/cc		- - - -	- - - +	- - - ++	- - - ++	++ ₆ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
I IV V	VM単独 0.3 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - +	- ++ ++ +	- ++ ++ +	- ++ ++ +	+ ₄ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	VM 0.3 γ/cc + INAH 0.05 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - -	- - - +	+ ₆₀ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
I IV V	VM単独 0.03 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - +	- ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	VM 0.03 γ/cc + INAH 0.005 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ ++ ++ +	++ ₉₂ ++ ₆₀ ++ ++	++ ++ ++ ++
I IV V	VM単独 0 γ/cc		- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ ₁₀ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++									

10 γ /cc 耐性を示したが、INAH 単独時に比して遥かに遅延しているのがわかる。INAH 濃度 0.05 γ /cc 培地では、INAH 耐性の発現は 5 代目まで全く認められなかった。

第 3 表は INAH, CS 併用時の INAH 耐性の推移である。即ち、INAH 濃度 5 γ /cc 培地では 2 代、3 代及び 5 代に於て発育力弱く増菌出来なかつたが、4 代目の INAH 耐性は 0.08 γ /cc で殆んど上昇を示していない。INAH 濃度 0.5 γ /cc 培地では初代より 3 代まで 5 γ /cc 耐性が続き、4 代目に 50 γ /cc、5 代目には 100 γ /cc 耐性に達しているが、INAH 単独時に比してやや遅延の傾向が見られる。INAH 濃度 0.05 γ /cc 培地では 4 代目で 0.16 γ /cc、5 代目で 0.31 γ /cc 耐性に留まり、INAH 単独時より明かに遅延している。

第 4 表は VM, INAH 併用時と VM 単独時との VM 耐性発現状況の比較である。VM 濃度 30 γ /cc 培地では、両者とも増菌不能の場合が多く比較が困難であるが、何れも耐性上昇は著し

くない。ただ、併用時 VM 濃度 30 γ /cc 培地の 4 代目で VM 100 γ /cc 耐性を示している。VM 濃度 3 γ /cc 培地では、単独時の 2 代目で 500 γ /cc、4 代目で 1.000 γ /cc 耐性を生じているのに対し、併用時は 2 代目から 4 代目まで 50 γ /cc 耐性、5 代目に於ても 200 γ /cc 耐性に留つている。VM 濃度 0.3 γ /cc 培地でも、単独時 2 代目以後 200 γ /cc 耐性を示しているのに対して併用では 25 γ /cc 耐性に留まり、INAH による VM 耐性発現の遅延効果が認められた。VM 濃度 0.03 γ /cc 培地では、単独時、併用時共に VM 耐性の発現を認めなかつた。

第 5 表は CS, INAH 併用時と CS 単独時との CS 耐性発現状況の比較である。即ち、CS は単独時に於ても 5 代目まではすべての濃度の培地に於て耐性発現を来さず、菌発育最高濃度は対照と同じく 12.5 γ /cc に留つた。併用時は CS 濃度 15 γ /cc 培地では菌の発育力弱く増菌出来ない場合が多かつたが、それ以外ではすべて CS 単独時と同様であつた。

第 5 表 CS, INAH 併用時と CS 単独時の CS 耐性発現状況の比較

代	耐性検査培地 CS γ /cc	50	25	12.5	6.25	3.13	K	耐性検査培地 CS γ /cc	50	25	12.5	6.25	3.13	K
	培地 薬剤							培地 薬剤						
	CS单独	—	—	++	+++	+++	+++	CS 15 γ /cc + INAH5 γ /cc	—	—	+ ⁶⁰ (—)	++ (—)	+++ (—)	+++ (—)
	15 γ /cc	—	—	++	+++	+++	+++		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
		—	—	++	+++	+++	+++		(—)	(—)	(—)	++	+++	+++
		—	—	—	++	+++	+++		(—)	(—)	+ ² (—)	++	+++	+++
		—	—	—	++	+++	+++		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
	CS单独	—	—	++	+++	+++	+++	CS 1.5 γ /cc + INAH0.5 γ /cc	—	—	++ + ⁸	++	+++	+++
	1.5 γ /cc	—	—	+ ¹⁰ + ¹⁵	+++	+++	+++		—	—	+ ¹⁰	+++	+++	+++
		—	—	+ ⁶⁶	+++	+++	+++		—	—	+ ¹¹	+++	+++	+++
		—	—	—	++	+++	+++		—	—	—	++	+++	+++
		—	—	—	++	+++	+++		—	—	—	++	+++	+++
	CS 单独	—	—	+ ⁷⁵	+++	+++	+++	CS 0.15 γ /cc + INAH0.05 γ /cc	—	—	++	+++	+++	+++
	0.15 γ /cc	—	—	+ ⁵⁰	+++	+++	+++		—	—	++	+++	+++	+++
		—	—	+ ²⁰	+++	+++	+++		—	—	—	++	+++	+++
		—	—	+ ⁴⁰	+++	+++	+++		—	—	+ ³⁰	+++	+++	+++
		—	—	—	++	+++	+++		—	—	+ ¹²	+++	+++	+++
	CS 单独	—	—	+ ⁶⁰	+++	+++	+++	CS0.015 γ /cc + INAH 0.005 γ /cc	—	—	+ ²	++	+++	+++
	0.015 γ /cc	—	—	+ ¹	+++	+++	+++		—	—	+++	+++	+++	+++
		—	—	+ ⁴³	+++	+++	+++		—	—	—	++	+++	+++
		—	—	+ ⁹⁸	+++	+++	+++		—	—	+ ⁹⁶	+++	+++	+++
		—	—	—	++	+++	+++		—	—	—	++	+++	+++
	CS 单独	—	—	+ ⁵⁶	+++	+++	+++							
	0 γ /cc	—	—	+ ⁴²	+++	+++	+++							
		—	—	+ ¹¹	+++	+++	+++							
		—	—	+ ⁸⁰	+++	+++	+++							
		—	—	—	+ ⁴⁴	+++	+++							

総括並びに考按

試験管内で VM と INAH を併用した場合に、VM は INAH 濃度 $5\gamma/\text{cc}$, $0.5\gamma/\text{cc}$ 及び $0.05\gamma/\text{cc}$ の各培地に於て、INAH 単独時に比し著明に INAH 耐性上昇を阻止した。

VM と INAH の併用効果に就いては上述の如く若干の報告があるが、その INAH 耐性に及ぼす影響に就いて試験管内実験で、或は臨床的に追求した報告は見当らない。VM が INAH 耐性発現を阻止する機序は明らかでないが、INAH 耐性菌が VM に対して特に強い感受性をもつものでないことは神尾¹⁷⁾により報告されている。

VM 耐性の発現に関しては、Youmans 等¹⁸⁾は有毒人型株が in vitro でかなり速やかに VM 耐性を獲得することを認め、Steenken 等¹⁹⁾は同じく増量継代法により 4 代までは耐性上昇は極めて少くそれ以後急速に上昇し、8 代以後には $1.000\gamma/\text{cc}$ 耐性が得られたと述べている。又、高階²⁰⁾は VM 耐性は単独では SM, Tibion と同様に段階的に上昇するが、SM 或は PAS との併用、殊に PAS との併用はその遅延に効果的であることを報告している。

著者の実験では、VM 単独で $3\gamma/\text{cc}$ 培地に培養した場合、2 代で $500\gamma/\text{cc}$ 、4 代で $1.000\gamma/\text{cc}$ の耐性を得た。VM $0.3\gamma/\text{cc}$ 培地では 2 代より $200\gamma/\text{cc}$ 耐性となつたが、5 代目には $25\gamma/\text{cc}$ 耐性に低下している。VM $30\gamma/\text{cc}$ 培地では菌の発育力低下し、僅かに初代と 5 代に於て増菌出来たが、耐性検査の結果は対照培地の菌と同じく $25\gamma/\text{cc}$ がその発育許容最高濃度であつた。さて、VM, INAH 併用時の成績を見ると、VM 濃度 $3\gamma/\text{cc}$ 及び $0.3\gamma/\text{cc}$ 培地では、5 代目で耐性は夫々 $200\gamma/\text{cc}$ 及び $25\gamma/\text{cc}$ でやや遅延傾向が見られ、VM 濃度 $30\gamma/\text{cc}$ 培地では単独時同様増菌困難で比較し難いが、4 代で $100\gamma/\text{cc}$ の VM 耐性を示している。なお VM 濃度 $0.03\gamma/\text{cc}$ 培地では単独、併用時共に 5 代目まで耐性発現は認められなかつた。

次に、CS は INAH と併用した場合、INAH 濃度 $5\gamma/\text{cc}$, $0.5\gamma/\text{cc}$ 及び $0.05\gamma/\text{cc}$ の各培地でかなり INAH 耐性発現を遅延せしめた。即ち、INAH 濃度 $5\gamma/\text{cc}$ 培地では増菌不能の場合が多

かつたが、初代及び 4 代では共に耐性獲得は認められなかつた。INAH 濃度 $0.5\gamma/\text{cc}$ 培地では 3 代まで $5\gamma/\text{cc}$ 、4 代で $50\gamma/\text{cc}$ 、5 代で $100\gamma/\text{cc}$ 耐性と、INAH 単独時に比べてやや遅延している。INAH 濃度 $0.05\gamma/\text{cc}$ 培地では、5 代まで $0.31\gamma/\text{cc}$ 耐性と INAH 単独時よりかなり遅延している。

CS 耐性の発現に関しては、Epstein 等²¹⁾は臨床的にも in vitro でも認められなかつたと言ひ、Wollinsky 等¹³⁾も in vitro で CS 耐性菌を認めなかつたと述べている。一方、Steenken 等²²⁾は in vitro で増量的に 2 週間隔で継代培養すると、5 代までは変化なく 6 代で 2 倍、7—10 代で 4 培の耐性が獲られ、その獲得状況は PAS に似ており、SM, INAH の様に急速ではないと述べている。Yeager 等²³⁾は、CS 耐性は人体内、in vitro 共に割合速やかに生じ、特に重症の場合に著明であると述べている。我国では海老名等²⁴⁾は in vitro で比較的容易に耐性菌を作ると言つてゐるが、東村等²⁵⁾は継代培養で 2 代以後 $20\gamma/\text{cc}$ 耐性菌は容易に獲られ、3 代で 73% の $20\gamma/\text{cc}$ 耐性菌を含む株を得たが、 $50\gamma/\text{cc}$ 耐性菌は得られなかつたと述べ、堂野前等²⁶⁾も継代培養で $50\gamma/\text{cc}$ 以上の耐性菌は容易に出現しないと報告している。

著者の実験では CS 単独の場合、5 代まではすべての濃度の培地に於て CS 耐性発現を認めず、INAH と併用した場合も単独時同様、菌の発育許容最高濃度は $12.5\gamma/\text{cc}$ で、耐性発現は認められなかつた。

結 論

臨床使用量に応じ INAH と VM 或は CS を併用して試験管内恒量置換培養を行い、5 代に亘つて観察し次の結果を得た。

1) INAH 耐性は VM 併用により著明に阻止され、又 CS 併用にてかなり遅延効果が認められた。

2) VM 耐性は緩やかに上昇し 4 代で $1.000\gamma/\text{cc}$ に達したが、INAH 併用によりやや遅延の傾向が認められた。

3) CS 耐性は単独時 5 代までは認められず、

INAH 併用時も同様であつた。

(欄筆するに当り終始御援助を賜つた津久間博士、
今井博士に深甚なる謝意を表します。)

文 献

- 1) 国枝義治：京大結研紀要：7-2, 105, 1959
- 2) Pitts, E. W. et al : Disease Chest, 23, 241, 1953.
- 3) Moyer, J. H. et al : Am Rev. Tbc., 68, 541, 1953.
- 4) Tucker, W. B. : Am. Rev. Tbc., 70, 812, 1954.
- 5) Phillips, S. et al : Am, Rev. Tbc., 72, 843, 1955.
- 6) Hackney, R. L. et al : Disease Chest, 24, 591, 1953.
- 7) 梶田昭他：結核の臨床, 2—6, 63, 1954.
- 8) 笹本浩他：結核診療, 6—5, 299, 1954.
- 9) Schutz, I. : Beitr. Klin. Tbc., 114, 436, 1955.
- 10) Bariéty, M. et al : Rev. Tbc., 21, 7, 1957.
- 11) Tacon, J. L. et al : Rev. Tbc., 21, 1241, 1957.
- 12) Epstein, I. G. et al : Am. Rev. Tbc., 75, 553, 1957.
- 13) Wollinsky, E. et al : Am. Rev. Tbc., 75, 510, 1957.
- 14) Martin-Lalande, J. et al : Poumon, 13, 339, 1957.
- 15) 室来善次他：呼吸器診療, 12—11, 890, 1957.
- 16) 堂野前維摩郷他：最新医学, 12—5, 43, 1957.
- 17) 神尾彰：京大結研紀要, 7-2, 1959
- 18) Youmans, G. P. et al : Am. Rev. Tbc., 63, 25, 1951.
- 19) Steenken, W. et al : Am. Rev. Tbc., 63, 30, 1951,
- 20) 高階二郎：抗酸菌病研究雑誌, 10—2, 108, 1954.
- 21) Epstein, I. G. et al : Disease Chest, 29, 241, 1956.
- 22) Steenken, W. et al : Am. Rev. Tbc., 73, 539, 1956.
- 23) Yeager, R. L. et al : Am. Rev. Tbc., 75, 1016, 1957.
- 24) 海老名敏明他：呼吸器診療, 12—11, 873, 1957.
- 25) 東村道雄他：医学と生物学, 43—79, 3, 1957.
- 26) 堂野前維摩郷他：日本臨床結核, 15—4, 59, 1957.