

δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-Norvaline(HON) の 抗結核菌作用に関する研究

〔第1篇〕 HON の試験管内抗結核菌作用

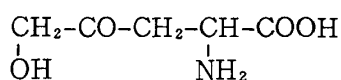
京都大学結核研究所内科学第1部（主任 教授 内藤益一）

蒲 田 迪 子

（受付 昭和42年1月31日）

第1章 緒 言

δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-norvaline は *Streptomyces akiyoshiensis* nov. sp.（中沢¹⁾により命名された新放線菌株）より山口ら²⁾により結晶状に抽出され、三宅^{3,4)}により其の構造式が次の通りに決定された物質である。



其後、土屋ら⁵⁾の細菌学的ならびに薬理学的一連の研究があり、或程度の抗結核菌作用が報告されたが、其他では金井等⁶⁾の動物実験があるのみである。

嗣って結核化学療法は過去20年長足の進歩を遂げたものの今や SM, PAS, INH に耐性となった肺結核患者数は年々増加し⁷⁻¹³⁾、のみならず最近では所謂二次抗結核薬にも耐性となった患者が次第に増加しつつある。したがって他剤との間に交叉耐性をもたない新しい抗結核薬の一つでも多い出現が強く要望され、今後も其の必要性が永く続くであろうと予想される。

勿論 isoniazid の如く効力が強く副作用が少なく、しかも価格の安い薬品の出現こそ理想ではあろうが、種々の点で効果の低いものでも存在する事が望まれる所以は、sulfa 剤や pyrazinamide, cycloserine 等の経験から肯定出来る。

其処で著者は本物質に就いて基礎的ならびに臨床的検討を行ない抗結核薬としての価値を吟

味しようとした次第である。

本篇に於いては試験管内実験の範囲で HON 単独の抗結核作用に就いて各種の培地に於ける静菌最低濃度 (MIC)、之に及ぼす接種菌量、培地 pH ならびに培地中血清濃度の影響、殺菌作用、水溶液の安定性、自然耐性菌の頻度、他剤との交叉耐性の有無等を検索した成績について報告する。

第2章 実 験 材 料

第1節 抗結核薬及びその溶媒

本実験に於ける供試結核薬は δ -hydroxy- γ -oxo-L-norvaline(HONと略称する。以下同様), dihydrostreptomycin (DHSM), p-aminosalicylic acid (PAS), isoniazid—isonicotinic acid hydrazide (INH), kanamycin (KM), cycloserine (CS), ethionamide— α -ethyl-thioisonicotinamide (1314 TH), tibi-on—p-acetylaminobenzaldehyde thiosemicarbazone (TB1), pyrazinamide (PZA), tetracycline (TC), sulfisoxazole (SI), viomycin (VM), capreomycin (CM), ethambutol—2,2'-(ethylenediimino)—di-1-butanol(EB), disoxyl—4,4'-diisoamylloxythiocarbanilide (DAT), sodium methanesulfonate of o-aminophenol (SOM) の16検体である。

此の中 SM, KM, VM 及び CM は夫々の vial に滅菌蒸留水を注入溶解し、HON, PAS, PZA, SOM, EB, 及び TC は粉末秤量の後、少量の70% ethylal-

*Michiko KAMADA, First Department of Medicine (Chairman Prof. Masukazu NAITO), Tuberculosis Research Institute, Kyoto University

kohol を加えて滅菌更に滅菌蒸溜水で溶解, TH, TB1, 及び DAT は秤量した粉末を溶媒 N, N-dimethyl-formamide (DFA) に溶解した。INH は注射用 ampule の Hycozid を, SI は Thiasin 溶液を, CS は ampule 入り原末を滅菌蒸溜水で溶解の後, 夫々所要濃度迄培地を用いて希釈した。

第2節 培 地

0.5% albumin 加硫安培地, 10%牛血清加 Kirchner 液体培地, 10%牛血清加 Kirchner 寒天培地, Tween-albumin 液体培地, 及び1%小川培地を用いた。硫安培地原液の組成は表1に示し, 夫々の培地は成書の記載に基いて作成した。尚 albumin は Armour Pharmaceutical Company 製 bovine albumin powder fraction V を, agar は Bacto Special Agar Noble を用いた。

表 1 硫安培地原液の組成

$\text{Na}_2 \cdot \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.0
KH_2PO_4	4.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6
Na·Citrate	2.5
Glycerol	20.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0
Aq dest.	900.0

第3節 菌 株

当研究室保存の H37Rv 感受性株及び本株から作成した H37RvR-SM, H37RvR-PAS, H37RvR-INH, H37RvR-KM, H37RvR-CS, H37RvR-TH, H37RvR-TB1, H37RvR-VM, H37RvR-EB を用いた。この他に HON 未使用肺結核患者から分離した人型結核菌を実験に供した。使用菌液は次の3種である。

1 Tween-albumin 培養菌液: Tween-albumin 培地に7—10日間深部均等培養した菌液を十分に振盪攪拌して菌を分散させ, 同培地で所要濃度迄希釈した。

2 硝子球に依る磨砕菌液: 10%牛血清加 Kirchner 培地に約2週間表面培養して生じた菌膜を硝子球入り コルベンに採り, 振盪磨砕し乍ら生理的食塩水を加えて菌懸濁液を作成し静置の後, その上清に生理的食塩水の適当量を加えて比濁法に依り約 1.0 mg/ml の菌液濃度とした。患者分離株の場合は小川培地表面によく発育した菌集落を釣り上記と全く同様の手技で磨砕菌懸濁液を作成した。

3 石油ベンジン菌液: 1%小川培地に3週間培養し斜面上によく発育した菌株の集落を白金耳で釣取し試験管壁で菌塊を磨砕しつつ化学用石油ベンジン中に分散させて2乃至3分静置の後, 粗大菌塊を沈澱せしめ上清を他の試験管に移し 1.0 mg/ml の濃度になる様に石油ベンジンで希釈, Silicone-Coated Slide Culture Method (以下 SSC 法)¹⁴⁻¹⁷⁾に供した。石油ベンジン菌液作成後30分以上経過すると石油ベンジンに依り結核菌が損われ生菌単位が甚しく低下する為に30分以内に菌の接種を完了する事に留意した。

第3章 実験方法並びに実験成績

第1節 各種培地に於ける静菌最低濃度 (MIC) の差違

実験方法

試験管通減倍数希釈法に依り HON の H37Rv 感受性株に対する静菌最低濃度 (minimum inhibitory concentration 以下 MIC) を検討した。但し薬剤の添加は液体培地に於いては菌接種直前に, 卵培地に於いては加熱滅菌凝固前に, 寒天培地に於いては冷却凝固直前に行なった。尚, 1試験管当りの培地量は液体培地では 2.0 ml, 固型培地では 5.0 ml である。Tween-albumin 培養菌液を用いて接種菌量は何れの培地でも1試験管当り0.02mgとした。之等の培地を37°C 孵卵器に収め各週毎に判定した。表示の成績は特にことわりのない限り4週間培養後の判定成績である。判定基準は液体培地(硫安培地及び Kirchner 液体培地)の場合, 試験管底の殆んど全面にわたり菌沈澱がみられる時(卅), 菌沈澱が管底1/2面積に及ぶ時(++) , 菌沈澱が管底1/3面積以下の場合(+) , 極少量の菌発育は硫安培地中に於いては管底に集落状に沈澱する為この場合は集落数を記載した。菌液滴下法に依る実験成績は特にことわりのない場合この判定基準に従った。又, 固型培地(寒天培地及び卵培地)に於ける判定基準は斜面に発育した菌集落が間隙なく全表面積に及ぶ時(卅), 1/2面積を占める時(++) , 1/3面積では(+), 100個未満の集落数はその数を記録した。

実験成績

表2に示す如く0.5% albumin 加硫安培地では 3.13 γ /ml を示したが, 10%牛血清加 Kirchner 液体培地では 31.3 γ /ml, 同寒天培地では 61.25 γ /ml であり, Tween-albumin 培地では 125-250 γ /ml, 1%小川培地では 1000 γ /ml であった。即ち HON の MIC は 0.5% albumin 加硫安培地に於いて示した MIC を1とす

ると Kirchner 液体培地では10倍, Kirchner 寒天培地では20倍, Tween-albumin 培地では80倍, 卵培地では300倍に増大し, 静菌力は低下したのである。

表 2 各種培地に於ける HON の静菌最低濃度 (γ /ml)

使 用 培 地	MIC
0.5% albumin 加硫酸培地	3.13
10%牛血清加 Kirchner 液体培地	31.3
10%牛血清加 Kirchner 寒天培地	62.5
1%小川培地	1000.0
Tween-albumin 培地	125.0 (2週判定)
	250.0 (4週判定)

接種菌量 0.01mg/ml
判定 培養4週後

第2節 接種菌量及び培地 pH による静菌最低濃度 (MIC) の差違

実験方法

東洋濾紙製 pH testpaper に依り, 0.5% albumin 加硫酸培地の pH を測定し研究室伊藤の方法¹⁸⁾に倣って 1 N-HCl 又は 1 N-NaOH を用いて夫々 pH 5.5, 6.5及び7.5に修正し, 此の3種類の培地について通減倍数稀釈法に依り, HON の MIC を検討した。尚0.5% albumin 加硫酸培地は pH 無修正で pH 6.2である。

此の際, 適当濃度の H37Rv 感性株 Tween-albumin 培養菌液を用いて培地 1.0 ml 当りの菌液濃度を夫々 0.1mg, 0.01mg, 0.001mg になる様に接種した。

実験成績

表3に示す如く, 先づ培地 pH の影響に就いて述べると, 接種菌量 0.001mg/ml に於ける pH 5.5 の時0.078 γ /ml, pH 6.5 及び pH 7.5 では何れも 0.156 γ /ml の MIC を示し, 接種菌量 0.01 mg/ml に於ける pH 5.5では 1.56 γ /ml, pH 6.5 及び pH 7.5 の時何れも 3.13 γ /ml であり, 接種菌量 0.1mg/ml の pH 5.5の場合 250 γ /ml, pH 6.5及び7.5の場合何れも 500 γ /ml を示した。1 管の差は誤差の範囲と考えられ, 培地 pH が 5.5から7.5に変化しても HON の静菌力は余り影響を受けないが酸性に比してアルカリ性の場合に少々落ちる傾向を示した。

表 3 HON の静菌最低濃度 (γ /ml) に及ぼす培地 pH 及び接種菌量の影響

接種菌量 (mg/ml)	培地 pH		
	5.5	6.5	7.5
0.1	250	500	500
0.01	1.56	3.13	3.13
0.001	0.078	0.156	0.156

使用培地 0.5% albumin 加硫酸培地

次に接種菌量の影響に就いて述べると培地 pH 5.5 の場合の 0.001 mg/ml の接種菌量に於ける MIC を 1 とすると, 0.01 mg/ml では20倍に, 0.1mg/ml では3,000倍に増大し, pH 6.5 及び7.5の場合は何れも20倍, 3,000倍に増大し, HON の静菌力は接種菌量に依り著明に影響される事が示された。

第3節 培地中血清の含有濃度による静菌最低濃度 (MIC) の差違

実験方法

志保田の方法¹⁹⁾を改良した恒村の変法²⁰⁾に準じて培地内血清濃度を10%, 30%, 50%, 70%及び90%に変えた牛血清加 Kirchner 培地ならびに硫酸培地を用意した。此の他, 牛血清に磷酸二水素カリウムを 7.0mg/ml の濃度に加える事に依り pH を略々6.8に修正した全血清培地を作成した。表4に基き作成した11種類の培地に就いて常法の通減倍数稀釈法を試みた。菌液は Tween-albumin 培養稀釈菌液を用い, 接種菌量を培地 1.0 ml 当り約 0.01 mg とした。

表 4 各種濃度血清加培地組成

培 地 中 の 血 清 濃 度	培 地 組 成			
	Kirchner培地		硫 安 培 地	
	牛血清	10 倍 濃 厚 Kirchner 原液	10倍濃厚 硫安原液	滅 菌 蒸 溜 水
10%牛血清加	1	1	1	8
30%牛血清加	3	1	1	6
50%牛血清加	5	1	1	4
70%牛血清加	7	1	1	2
90%牛血清加	9	1	1	0
100%牛血清加	10	0	0	0

実験成績

成績は表5に示す如く, 10%牛血清加硫酸培

表 5 HON の静菌最低濃度 (γ /ml)
に及ぼす牛血清加培地中の血清
濃度の影響

培地中血清濃度	硫 安 培 地	Kirchner 培地
10%	3.13	31.3
30%	6.25	62.5
50%	12.5	62.5
70%	31.3	62.5
90%	62.5	125.0
100%	125.0	

接種菌量 0.01mg/ml

判定 培養4週後

地に於ける静菌力を1とすると、培地内の血清濃度が30%の場合には1/2, 50%含有で1/4, 70%で1/10, 90%で1/20に減弱した。一方 Kirchner 培地では血清濃度が10%の場合に比し, 30%及び70%では1/2に, 90%及び100%培地では1/4に低下した。硫安培地と Kirchner 培地の各濃度に於いて比較すると, Kirchner 培地で

の静菌力は硫安培地のそれに比し血清濃度が10%及び30%では1/10, 50%では1/5, 70%及び90%では1/2の静菌力を示した。即ち血清濃度の増加に伴う静菌力の低下は Kirchner 培地に比して硫安培地では極めて著明であった。

第4節 HON 水溶液の安定性

実験1 HON 水溶液の保存と静菌作用の関係

実験方法

溶液の pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0), 保存温度 (氷室, 室温, 孵卵器), 保存日数 (1 週, 2 週, 3 週, 4 週) の条件を変える事に依り, HON の静菌力が変化するか否かを観察した。即ち HON 原末に pH 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 の 1/15 M 磷酸緩衝液を用いて 10^4 g/ml になる様に溶解し, 更に夫々を 3 本の試験管に分注し, 各々を氷室 (ca 5°C), 室温 (ca 20°C) ならびに孵卵器 (37°C) に保存した。同様にして毎週 1 回上記の操作を繰返し, 4 週間にわたり合計 48 種の HON 溶液 (pH, 保存温度, 及び保存期間の異なる) を作成し, これらに就いて各々の静菌作用を検討した。別に対照として

表 6 HON 水溶液の保存と

0.12	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅		
0.24	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅		
0.48	卅	卅	卅	+	+	+	+	+	+	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	+	+	+	+	+	+	+	+		
0.97	卅	+	卅	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	卅	卅	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1.95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3.9	C6	C7	C5	C8	C8	C3	C5	C8	+	C8	C10	C10	C8	C3	C10	+	C4	C10	+	C5	C10	+	C5	C10		
7.8	C5	C5	-	C3	C3	-	C3	-	C6	C5	+	C3	C5	C3	C8	C5	C2	C3	+	C2	C5	C10	C3	C3	C15	C2
15.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C2	-	C2	C13	-	C5	C8	C3	C3	C10	-
31.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C3	-	
62.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10 ³ γ/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
濃 度 温度 保存 日数	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	対 照	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	対 照
	1 保	週 間 存		2 保	週 間 存		3 保	週 間 存		4 保	週 間 存			1 保	週 間 存		2 保	週 間 存		3 保	週 間 存		4 保	週 間 存		
PH	PH 5.0													PH 6.0												

pH 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 HON 10^4 γ/ml の溶液を静菌力検査直前に作成し実験に供した。培地は 0.5% albumin 加硫酸培地, 菌液は Tween-albumin 培養稀釈菌液, 接種菌量 0.01 mg/ml である。高濃度域の HON 溶液は何れの pH に於いても保存日数の増加に伴い変色し黒褐色の色調を帯び, その程度は保存温度の高い程高度である。即ち氷室保存に比べ孵卵器保存 4 週から 8 週に及ぶと黒褐色の着色甚しく, 管底に発育した結核菌の沈澱状態が肉眼的に不明瞭である。故に第 1 管, 第 2 管の 4 週以後の培養成績は 3 週判定成績をとった。

實驗成績

表 6 に示された如く pH 5.0 及び 6.0 の HON 溶液は何れの保存日数、保存温度でも対照と略々同様の 3.9 γ /ml の静菌力を示したが、pH 7.0 では氷室保存の場合のみ保存期間に関係なく略々対照と同様の静菌力を示し、室温保存では保存日数 1 週間で 3.9 γ /ml, 2 週間で 7.8 γ /ml, 3 週間及び 4 週間何れも 31.25 γ /ml であり、

孵卵器内保存では保存日数が 1, 2, 3 及び 4 週間で夫々 3.9 γ /ml, 31.25 γ /ml, 500 γ /ml, 10³ γ /ml <を示した。即ち HON の静菌力は溶液の pH 7.0 の場合は保存温度が高くなるに伴い、又、保存日数が延長するに従い静菌力の低下を認めた。pH 8.0 では此の傾向が少々増強された。

実験2 HON 水溶液の加熱 (100℃) と静菌作用との関係

実験方法

前項と同様に pH 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 の 1/15M 燐酸緩衝液に HON を 10^{-7} g/ml になる様に溶解し各々を 6 本の試験管に分注し 6 群を編成した。此の中 1 群は加熱操作を加えずそのまま対照として静菌作用を検討した。他の 5 群は沸騰水中に浸し 5 分, 10 分, 15 分, 30 分ならびに 60 分後に 1 群宛取出し, その各々に就いて静菌力を検討した。培地は 0.5 % albumin 加硫安培地, 菌液は Tween-albumin 培養稀釈菌液, 接種菌量は培地 1.0 ml 当り 0.01 mg とした。

實驗成績

静菌作用との関係

++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++
+	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	+	+	++	++	+	++	++	+	++	++	+	+
+	+	+	+	+	++	+	++	++	+	++	++	+	+	+	++	+	++	++	+	++	++	+	+
C13	C10	C8	C10	+	++	C8	+	++	+	++	++	C5	C5	C8	++	C3	+	++	C15	++	++	+	++
C10	C8	C7	C7	C15	+	C5	+	++	C10	+	++	C3	C3	C2	+	C7	+	++	C10	+	++	C15	++
C2	C5	C3	-	C10	+	C3	+	++	C5	+	++	C2	-	-	+	C7	C10	++	C2	+	++	C3	++
-	-	-	-	-	C15	-	C10	++	-	C5	++	-	-	-	C5	C5	C5	++	-	C10	++	-	+
-	-	-	-	-	C5	-	C2	++	-	-	++	-	-	-	C4	-	-	++	-	-	++	-	C10
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	C5
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	C15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	C15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	对 照	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温	37° C	0° C	室 温
1 保	週 間 存	2 保	週 間 存	3 保	週 間 存	4 保	週 間 存	1 保	週 間 存	2 保	週 間 存		3 保	週 間 存	4 保	週 間 存	1 保	週 間 存	2 保	週 間 存	3 保	週 間 存	4 保
PH 7.0												PH 8.0											

表 7 HON 溶液の 100°C 加熱に伴ふ
HON の静菌最低濃度 (γ/ml)

100°C 加熱 持続時間 (分)	溶液の PH			
	5.0	6.0	7.0	8.0
対 照	3.9	3.9	3.9	3.9
5	3.9	3.9	31.25	125.0
10	3.9	3.9	62.5	500.0
15	3.9	7.8	125.0	>500.0
30	3.9	7.8	>500.0	>500.0
60	3.9	15.6	>500.0	>500.0

表 7 に示す如く pH 5.0 の場合は 100°C 加熱持続時間が60分に及ぶも静菌作用は不変、肉眼的に結核菌の発育状態が少々増強する程度で比較的安定である。pH 6.0 の場合は加熱 100°C 10分後でも略々完全に加熱前の静菌作用を保持するが、加熱30分後では1/2、60分後では 1/4 になった。pH 7.0 に於いては 100°C 加熱 5 分

後に既に静菌力が1/8に低下、pH 8.0では100°C 加熱 5 分後に静菌力が約1/40に落ち、著明に抗菌力が減弱した。尚、本実験に於いて加熱した高濃度溶液を含んだ培地では HON の変色甚しく黒褐色を呈した。

実験 3 培地置換培養法に於ける HON の静菌作用

実験方法

神田の方法²¹⁾に準じて行なった。即ち 0.5 % albumin 加硫酸培地を用いて第1管の HON 濃度を 10³ γ/ml とする20管1系列の通減倍数希釈列を2系列作成した。菌の接種には 1.0 mg/ml 濃度の石油ベンジン菌浮游液にスライド¹⁴⁾を瞬時浸漬して菌を附着させ (1 スライド当りの附着生菌単位数は凡そ10⁶ である) 石油ベンジンの蒸発するのを待ち、先に調製した培地の第1系列の第1管、第2系列の第1管、第1系列の第2管、第2系列の第2管と交互に第20管迄スライドを投入した。之は時間経過に伴う石油ベンジンの菌障

表 8 培地置換培養法に依る HON の静菌作用

成 績 I																				
4 週 判 定	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	K
培地置換せず	—	—	—	—	—	—	—	—	<+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
週2回培地置換	—	—	—	—	—	—	—	—	<+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
成 績 II																				
4 週 判 定	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	K
培地置換せず	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
週2回培地置換	—	—	—	—	—	—	—	—	+	>+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
成 績 III																				
4 週 判 定	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	K
培地置換せず	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
週2回培地置換	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
成 績 IV																				
4 週 判 定	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	K
培地置換せず	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
週2回培地置換	—	—	—	—	—	—	C1	C2	C1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

第1管濃度 HON 1000γ/ml

碍作用から実験上の誤差を僅少に止める様に計ったのである。次いで 37°C で培養を開始し、此の中の1系列は毎週2回宛新たに作成した同様の薬剤含有培地系列にスライドを置換し新鮮な HON を菌に作用させ、他の1系列は培地を置換せずに培養を続け、4週後に両系列の菌発育状態を肉眼的に比較判定し、HON の培地内に於ける安定性を検討した。判定基準は1スライド全表面積に菌集落が密集せる場合 (卅), 菌集落が1スライドの1/2面積を占める場合 (++)、1/3面積を占める場合 (+), 菌集落が100個に充たない場合にその集落数を記入した。SSC 法に依る実験成績は特にことわりのない場合は此の判定基準に依った。

実験成績

肉眼的判定に依る4週培養成績を表8に掲げた。非置換培養成績を対照として置換培養成績をみると極く軽度ながら置換培養に比して非置換培養に於ける静菌作用が少々強い傾向を示した。此の程度の差は実験誤差とも考えられる。

第5節 患者分離株に対する HON 静菌作用

実験方法

被検菌株は京都大学結核研究所及び関係諸施設に入院した未治療肺結核患者より分離した結核菌69株で、これ等を1%小川培地に増菌の後、小川硝子球入りコルベンに依る磨砕法で0.5 mg/ml の菌液を作成し、接種菌量を0.01 mg/ml とし0.5% albumin 加硫安培地に依る通減倍数希釈法で HON に対する感受性を検討した。

実験成績

表9に示した。既知抗結核薬未治療患者69例の喀出菌のうち5株は HON 0.78 γ /ml で阻止 (7.2%), 7株は 1.56 γ /ml で阻止 (10.1%), 28株は 3.13 γ /ml で阻止し (40.6%), 14株は 6.25 γ /ml で阻止 (20.3%), 4株は 12.5 γ /ml で阻止 (5.8%), 25.0 γ /ml で阻止したもの10株 (14.5%) 及び 100 γ /ml で阻止したもの1株 (1.4%) であった。即ち患者分離株の中、HON 3.13 γ /ml 感性株は 57.9%, 6.25 γ /ml 感性株は 78.2%, 6.25 γ /ml 耐性株は 21.8%, 12.5 γ /ml 耐性株は 15.9% となった。然し前節に述べた如く HON は接種菌量の差に依る MIC の変動が激しい為菌液濃度を一定にする事に留意したが、

卵培地集落からの磨砕菌液である為²²⁾、接種生菌量に或程度の相違があり、これに依る影響も無視し得ぬものがあると思われる。

表 9 HON 未使用患者より分離した69株に対する HON の静菌最低濃度

MIC (γ /ml)	菌 株		百 分 率	
	発育阻止 株 数	累積株数	発育阻止 株百分率 (%)	累 積 百 分 率 (%)
0.78	5	5	7.2	7.2
1.56	7	12	10.1	17.3
3.13	28	40	40.6	57.9
6.25	14	54	20.3	78.2
12.5	4	58	5.8	84.0
25.0	10	68	14.5	98.5
100.0	1	69	1.4	99.9

使用培地 0.5% albumin 加硫安培地
接種菌量 0.01mg/ml

第6節 HON の殺菌作用

実験方法

0.5% albumin 加硫安培地を用いて第1管濃度を HON 10³ γ /ml とする通減倍数希釈列 (1系列20管) 4系列を作成し、別に対照として INH の希釈列を上述と全く同様にして4系列準備し、1.0mg/ml の石油ベンジン菌浮游液を用いて SSC を行ない、1週1回培地を置換しつつ培養開始7日、14日、21日及び28日後に HON 及び INH の各希釈列のうち1系列宛取出し、その培養中のスライドを滅菌生理的食塩水で2回静かに洗滌し薬剤非含有培地中に移し、更に 37°C で4週間培養しスライド表面に発育してくる菌集落を観察した。

実験成績

薬剤作用終了後、薬剤非含有培地にスライドを移し4週間培養後肉眼的に集落を全く認めない場合を完全殺菌、集落数が対照に比して著しく少ない場合を不完全殺菌と仮定し、夫々の殺菌最低濃度 (minimum sterilizing concentration 以下 MSC) を完全殺菌濃度及び不完全殺菌濃度と定義し、その成績を表10に示した。即ち対照としての INH の殺菌効果は薬剤作用期間の延長に従い著明に増加するが、HON 殺菌作用は極めて弱い。しかし、不完全殺菌濃度に

於いては作用期間の延長に伴って若干の殺菌効果の増強が認められた。

表 10 HON 殺菌最低濃度 (γ/ml)

薬剤作用 期 間 (日)	HON		INH	
	完全殺菌 濃 度	不 完 全 殺菌濃度	完全殺菌 濃 度	不 完 全 殺菌濃度
7	>1000.0	500.0	>1000.0	0.24
14	1000.0	62.5	500.0	0.06
21	1000.0	31.25	0.24	0.015
28	250.0	7.8	0.06	0.0075

培養法 SSC 法

第7節 HON に対する結核菌の耐性獲得

実験方法

HON に対して結核菌が示す耐性上昇形式を見る為の実験として、0.5% albumin 加硫安培地に依る1代3週間の増量継代培養法を行なった。

即ち HON 稀釈列に Tween-albumin 培養菌液を接種、培養開始3週後に菌の発育状態を肉眼的に観察した。対照の発育を(++)で表現した場合に(++)の程度に発育した最高濃度を示す試験管の薬剤含有濃度をもって HON 耐性値とし、この試験管に等量の Tween-albumin 培地を加えて菌を攪拌分散させ第2代の菌液として使用した。

各代の接種菌量は概ね1試験管当り 0.2mg 乃至0.3mg である。

実験成績

表11に示す如く第1代及び第2代の HON 耐性値が 1.95 γ/ml であり、第3代耐性値はこれらの約15倍、第4代は約60倍、第5代は125倍となり耐性上昇は比較的速い事が示された。

表 11 HON 耐性値 (γ/ml) の推移

継代数	I	II	III	IV	V
耐性値	1.95	1.95	31.25	250	500
耐性化培数	1	1	16	128	256

第8節 諸種抗結核薬との交叉耐性

実験1 各種抗結核薬耐性株 に対する HON の静菌作用

実験2 HON 耐性株に対する各種抗結核薬の静菌作用

実験方法

実験1に於いては H37Rv 感性株及び前章に記載した当研究室保存の SM, PAS, INH, KM, CS, TH, TB1, VM 及び EB 耐性株に対する HON の静菌作用を 0.5% albumin 加硫安培地を用いて通減倍数稀釈法に依り検討した。菌液は硝子球に依る菌膜磨砕菌液、接種菌量は培地 1.0 ml 当り 0.01 mg である。

実験2に於いては H37RvR-HON の Tween-albumin 菌液を用い、此の菌株に対する各種抗結核薬の静菌作用を通減倍数稀釈法に依り検討した。菌液は Tween-albumin 培地に約10日間培養した H37RvR-HON 及び対照としての H37RvS 夫々の培養菌液を Tween-albumin 培地で10倍に稀釈し作成した結核菌浮游液である。接種菌量は 0.5% albumin 加硫安培地 1.0 ml 当り約 0.01 mg である。

実験成績

表12に示した成績から、HON は H37Rv株から分離した SM, PAS, INH, KM, CS, TH, TB1, VM 及び EB 耐性株に対しても感性株と略々同程度の静菌作用を示す事を知り得た。

表 12 各種抗結核薬耐性菌に対する HON の静菌最低濃度 (γ/ml)

使 用 菌 株	耐性値*	MIC
H37RvS		3.13
H37RvR-HON	250.0 *	250.0
H37RvR-SM	10000.0<	1.56
H37RvR-PAS	25.0	3.13
H37RvR-INH Catalase(-)	25.0	3.13
H37RvR-KM	10000.0<	3.13
H37RvR-CS	25.0	3.13
H37RvR-TH	25.0	1.95
H37RvR-TB1	50.0<*	3.9
H37RvR-VM	25.0	3.13
H37RvR-EB	25.0	3.9

* TB1 は1%小川培地、HON は0.5% albumin 加硫安培地、その他の薬剤は10%血清加 Kirchner 培地に於ける H37Rv 耐性値を示す。

接種菌量 0.01mg/ml

表13に示す通り、HON 耐性株は諸種抗結核薬の何れに対しても感性株の示す MIC と略々同程度の値を示した。

表 13 0.5% albumin 加硫安培地に於ける H37Rv 感性株及び HON 耐性株に対する各種抗結核薬の静菌最低濃度 (γ/ml) の比較

供試抗 結核薬	菌 株	
	H37RvS	H37RvR-HON
HON	6.25	500.0
DHSM	3.125	3.125
PAS	0.313	0.313
INH	0.0313	0.0313
KM	1.56	1.56
CS	6.25	6.25
TH	0.625	0.625
TB1	31.25	31.25
PZA	62.5	62.5
TC	3.125	3.125
SI	31.25	31.25
VM	6.25	6.25
CM	3.125	3.125
EB	3.125	3.125
DAT	1.56	3.125
SOM	6.25	6.25

第4章 総括並びに考按

さきに武田薬品研究所から HON が結核治療に使用し得る可能性のある事が発表²³⁾された。難治肺結核をかかえ数少い抗結核薬に頼っている現状から、著者は此の物質に注目し、武田薬品工業株式会社より提供された HON に就いて一連の試験管内実験を行なった。通常新しい抗結核薬に対しては先づ in vitro に於ける screening test に依り静菌作用の検討がなされる。もとより生体内に於ける薬剤の作用環境は極めて複雑であり、かかる場に於ける薬剤の作用を in vitro で正確に知る事は不可能であるが、その効果を知るには先づ出来るだけ in vitro で多角的に検討する必要がある。この為著者は in vitro に於ける HON の抗結核菌作用を種々の観点から検討した。

HON は一種のアミノ酸^{3~5)}であり、その効果は窒素源として培地中に含まれるアミノ酸の asparagine, glutamine, aspartic acid 及び sodium glutamate 等に依り拮抗される²⁴⁾が、硫酸アンモンは結核菌の窒素源として利用³²⁾さ

れ且 HON と拮抗しないと云われている²⁴⁾。一方、一般に抗結核薬は接種菌量²⁵⁾、培地の pH²⁵⁾、培地の種類^{26~28)}、培地に含まれる血清濃度の変化^{19,29,30,31)}に依りその静菌作用及び殺菌作用に影響を受ける場合が多い。即ち HON の MIC と使用培地との関係に就いては土屋ら²³⁾が抗菌力は使用培地に依り著明に異なり Kirchner 培地で 20 γ/ml, 硫安培地で 2-4 γ/ml, Dubos 培地で 200-400 γ/ml で発育阻止作用を示したと報告しているが、著者の成績でも 0.5% albumin 加硫安培地で 3.13-6.25 γ/ml で、この MIC を 1 とすると 10% 牛血清加 Kirchner 液体培地で 10 倍、10% 牛血清加 Kirchner 寒天培地で 20 倍、Tween-albumin 培地で 80 倍、卵培地で 300 倍になり培地差に依りかなりの変動を示した。

又、一般に静菌力は接種菌量の大きな程低下する傾向にあり、一方 DHSM, TB1, VM 及び KM は培地 pH がアルカリ性で、PZA, SI 及び PAS は酸性で静菌力が増強される²⁶⁾。HON に就いては培地 pH に依り抗菌力が変化しないと土屋ら²³⁾が報告した。著者の実験でも接種菌量 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml 及び 0.1 mg/ml の場合のアルカリ性、酸性に於ける夫々の MIC の動きが僅かに 1/2 に過ぎず pH の影響を余り受けない成績を示した。一方、生体内病巣の pH は酸性からアルカリ性迄広範囲にわたっている^{33,34)}が HON の此の性質は一つの利点とも考えられる。然し乍ら接種菌量の変化 (0.1 mg → 0.001 mg) による MIC の動きは著明であり、接種菌量の増加に伴い静菌力が著るしく低下した事は注目に値する。

次に培地中の血清濃度による MIC の変化に就いて検討した。さきに研究室山下²⁹⁾、井本³⁰⁾及び田中³¹⁾が一般に抗結核薬の静菌作用及び殺菌作用は培地内血清濃度の増加にしたがい減弱するものが多い事を報告しているが、この傾向が HON に於いては特に著明に認められた。しかも基礎培地に Kirchner 培地を用いるよりも硫安培地を用いた場合の方が血清濃度の増加に伴う静菌力の低下が一層顕著であった。かかる静菌力の低下は恐らく血清蛋白との結合と言う

様な単なる物理化学的原因の他に、血清中に含まれるアミノ酸及び鉄イオンの影響も大きいものと想定され、従って生体内の静菌力は常用の試験管内成績よりもかなり減弱するのではないかと思われる。

HON の安定性に就いて検索した結果、酸性で比較的安定であるが、アルカリ性では速やかに抗菌力が減弱した。又、神田²¹⁾の培地置換培養法に依る静菌力の検討の結果、HON の静菌作用は使用培地の環境では比較的安定した力価を保つ薬剤であると言える。ただし実験を数回反復して検索し、非置換培養に於ける静菌作用が置換培養に比して極軽度ながら優れた成績を示す場合が多く、これが若し実験誤差でないとする HON が分解する事により或はより強力な静菌効果を示す物質に変わるのではないかと考えさせる。

さて抗結核薬としての理想は生体内で結核菌を殺菌する能力を有し、且、人体に無害である物質の発見にある。土屋ら²³⁾は HON の殺菌作用は弱い事を認めている。著者は INH を対照として HON の殺菌効果を検討したのであるが不完全殺菌効果は作用期間の延長に伴って若干認められ、その強さは INH に比肩すべくもない成績であった。

更に患者分離株に対する HON の静菌作用に就いては土屋ら²³⁾が Kirchner 培地及び硫安培地を用いて調査した結果、実験室保存菌株と同様の発育阻止作用を示したと述べたが、著者の 69 株に就いての検討では HON 6.25 γ 感性が 78.2% で耐性は 21.8% であった。本実験に於ける症例数が少なくこれのみで HON 自然耐性菌の分布状態に就いて論及する事が出来ないにしても、自然界の人型結核菌株の大半は 0.5% albumin 加硫安培地では 6.25 γ の濃度で発育が阻止されるものと思われる。

一方、土屋ら²³⁾は 0.02% Tween 80 加 Kirchner 培地を用いて H37RvS の菌量を 0.1 mg とし 37°C、2 週間の増量継代培養を行ない耐性値の推移を検討し、HON に対する H37RvS の耐性獲得が極めて緩徐であると述べている。然し Kirchner 培地では HON の抗菌力が弱くなる

ので HON の耐性上昇実験にこの培地を用いる事はあまり適当であるとは思えない。又 Tween-albumin 培地を用いれば均等菌液が容易に得られるが Tween-albumin 培地中に含まれるアミノ酸に依り HON の抗菌作用が拮抗され、Kirchner 培地と同様に著るしく MIC が増大する為やはり不適当である。一方、0.5% albumin 加硫安培地を用いると HON の静菌力は強く現われるが結核菌の発育状態は大部分が試験管底に沈澱し、一部表面に菌膜を形成する為に継代培養に不便である。そこで菌の継代に際して著者は 0.5% albumin 加硫安培地を培地として用い、薬剤耐性値を示した 0.5% albumin 加硫安培地菌液に等量の Tween-albumin 培地を加え充分攪拌して均等菌液を作成し、これを用いて 1 代 3 週間培養の増量継代法を行なった。第 1 代及び第 2 代に於いて感性株の示した薬剤耐性度が 1.95 γ /ml、第 3 代に於いては 31.25 γ /ml、第 4 代では 125-250 γ /ml、第 5 代は培養 1 週後に既に 10³ γ /ml に菌の微量発育を認め薬剤耐性度は 250-500 γ /ml であった。同様の手技で第 6 代増量継代実験を試み 250-500 γ /ml 耐性菌を得た。かくの如く著者の実験で比較的速やかに高度耐性菌を得たのは、各代毎の接種菌量がかかなり多いこと (0.2~0.3mg/ml) に依るのかも知れない。

次に各種抗結核薬耐性株に対する HON の静菌作用をみると何れも感受性株に対すると略々同程度の MIC を示し、HON 耐性株も各種抗結核薬に対して感性株に対すると略々同様の感受性を示した。土屋ら²³⁾は DHSM, INH, VM, KM, CS 及び TH 耐性菌に感受性菌と同様な発育阻止力を示し、HON 耐性菌は既知抗結核薬に対し感受性菌と同様な態度を示し、既知抗結核薬と交叉耐性を示さなかったと報告した。今日新しい抗結核薬に望まれる条件の一つは既存の薬剤と交叉耐性をもたない点であり、此の点に関して結核再化学療法剤として HON は期待の持てる薬剤である事を示唆している。

以上の如く、HON 単独の試験管内実験成績から優秀な抗結核薬であるとは云い難いが、既存の抗結核薬と交叉耐性をもたない点から他剤

と併用する事に依り抗菌作用を増強し治療効果が期待出来るのではなかろうかと考えられる。

第5章 結 論

新抗生物質 δ -hydroxy- γ -oxo-L-norvaline (HON) 単独の試験管内抗結核作用を検討し次の如き結論を得た。

1. HON の MIC は0.5% albumin 加硫安培地に於いて3.13~6.25 γ /ml を示すが、この価は培地の種類及び接種菌量によって著明な影響を受ける。然し培地 pH (5.5~7.5) の影響は殆んど受けない。

2. HON の静菌力は培地中の血清濃度の増加に伴ない著明に低下する。

3. HON の殺菌力は微弱である。

4. 患者より分離した HON 未使用人型結核菌株の約80%は HON 6.25 γ /ml の濃度で発育阻止が認められた。

5. HON の耐性は5代の継代で250 γ /ml に上昇したが、これは接種菌量が大きかった為かも知れない。

6. HON は既存の抗結核薬と交叉耐性をもたない。

謝辞：稿を終るに臨み御指導を賜りました前川暢夫助教授、吉田敏郎博士、津久間俊次博士をはじめ当研究室の各位に深く感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) 中沢鴻一, 他: 特許公報, 昭和36—5799, 特285975号
- 2) 山口剛志, 他: 特許公報, 昭和36—3900, 特282061号
- 3) Miyake, A.: Chem. Pharm. Bull., 8 : 1071, 1960
- 4) Miyake, A.: Chem. Pharm. Bull., 8 : 1075, 1960

- 5) Kanazawa, K., Tsuchiya, K., Araki, T.: Amer. Rev. Resp. Dis., 81 : 924, 1960
- 6) 金井興美, 他: 結核, 39 : 69, 昭和39年
- 7) 厚生省: 結核実態調査, III 昭和35年
- 8) 厚生省: 結核実態調査IV 昭和36年
- 9) 療研: 日本医事新報, No. 1900 : 3, 昭和35年
- 10) 療研: 日本医事新報, No. 1979 : 3, 昭和37年
- 11) 療研: 日本医事新報, No. 2064 : 9, 昭和38年
- 12) 内藤益一, 他: 京大結研紀要, 9 : 129, 昭和36年
- 13) 内藤益一, 他: 京大結研紀要, 11 : 38, 昭和37年
- 14) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3増刊1 : 461, 468, 昭和34年
- 15) 東向一郎: 京大結研紀要, 7-3増刊2 : 22, 昭和34年
- 16) 内藤益一, 他: 京大結研紀要, 12 : 112, 昭和39年
- 17) Higashi, K., et al: Amer. Rev. Resp. Dis., 85 : 392, 1962
- 18) 伊藤 篤: 京大結研紀要, 7 : 143, 昭和31年
- 19) 志保田明: 京大結研紀要, 1 : 135, 昭和26年
- 20) 恒村俊郎: 京大結研紀要, 7-3増刊3 : 338, 昭和34年
- 21) 神田瑞雄: 京大結研紀要, 7-3増刊1 : 328, 昭和34年
- 22) 吉原宣方: 京大結研紀要, 12 : 130, 昭和39年
- 23) 土屋皖司, 他: 武田研究所年報, 22 : 148, 昭和38年
- 24) 土屋皖司: 武田研究所年報, 22 : 167, 昭和38年
- 25) 河田利延: 京大結研紀要, 7-3増刊3 : 13, 昭和34年
- 26) 内藤益一: 学研報告, 昭和33年
- 27) 川合 満: 京大結研紀要, 13 : 184, 昭和40年
- 28) 津久間俊次, 他: 胸部疾患, 2 : 522, 昭和33年
- 29) 山下直二郎: 京大結研紀要, 8 : 5, 昭和34年
- 30) 井本伍平: 京大結研紀要, 7-3増刊3 : 306, 昭和34年
- 31) 田中健一: 京大結研紀要, 13 : 45, 昭和39年
- 32) Shockoman, G. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 101 : 693, 1961
- 33) 永井純太, 他: 結核, 32 : 609, 昭和32年
- 34) 安平公夫: 日本血液学会雑誌, 18 : 568, 昭和20年