

結核の化学療法研究

(第122報)

P-Aminosalicylic acid hydrazide (PASAH) に 對する人型結核菌の耐性獲得について

金沢大学医学部日置内科教室(主任 日置教授)

坂 井 俊 道

Toshimichi Sakai

(昭和28年12月28日受附)

Chemotherapeutic Studies in Tuberculosis.

Report 122.

The Drug-fastness of *Mycobacterium tuberculosis*, *var hominis*, against p-Aminosalicylic acid hydrazide.

緒 言

曩に吾が教室において合成された p-Aminosalicylic acid hydrazide (PASAH) に関し著者及び三崎¹⁾²⁾の手により管内人型結核菌発育阻止試験並びに Slide-cell-culture 試験が行われ、その著明な抗結核作用が知られるに至つた。

本剤の毒性は INAH よりも少なく、その 1/3 であり、動物の實驗的結核症に対しても可成著

明な抗結核作用が証されたので³⁾臨床への応用が期待せられるが、菌の本剤に対する耐性獲得の問題が取残されていた。本研究はこれを解明するために行われたものである。

なお試験には一般抗結核剤に対し感受性の高い人型結核菌原株は勿論、その他 PAS, SM 及び INAH 耐性の各株が用いられた。

実 験 方 法

供試菌株：人型結核菌 H 37 Rv 株、その PAS (100 γ /ml 耐性)、SM (2,000 γ /ml 耐性) 及び INAH (100 γ /ml 耐性) 耐性株、以上4株が使用された。

菌液調製：初代培養に供するための前記人型結核菌4株の菌浮游液は予めこれらを岡・片倉培地上に発育せしむること約4週のものから20mg 宛をガラス球入り試験管に取り、生理的食塩水に懸濁(手振法による)し、1乃至2時間静置、その上澄液を實驗に供し

た。

2代目からは2週間毎に既に初代の薬液含有培地に充分発育せる菌苔を撮り(メヂウムを吸引し去る)、これにガラス小球を投げ、又新鮮な Kivchner 培地を注加してよく振盪し、同株菌浮游液を作製した。

培地：A) 継代培地：所要濃度に薬剤を含有せしめたる10%血清加 Kirchner 液体培地を使用す。

B) 耐性判定用培地：同じく10%血清加 Kirchner

液体培地を使用。但し何ら薬剤を含有せしめざるものとす。

被検薬剤及び薬液調製：PAS, SM, INAH 及び PASAH について試験し、薬剤原液の調製に当つては SM のみは滅菌生理的食塩水に、他は全部70% Ethanol に溶解せしめた。

継代培養方法：前記4種の薬液を血清非添加 Kirchner 培地にて $1\gamma/ml$ の濃度迄希釈し、その 3cc 宛を更めて同じく血清非添加 Kirchner 培地 24cc と人血清 3cc を夫々加え（この際薬剤含有濃度は $0.1\gamma/ml$ となる）、よく混合し、各薬液別に 12 本の小試験管に 2cc 宛分注した。

なお、PAS と SM, SM と INAH 及び PAS と INAH の如く薬剤を併用せる培地を作製するに当つては、上記 $0.1\gamma/ml$ の薬剤濃度を有する培地 1cc 宛を夫々の組合せに従つて小試験管に容れた。

以上薬剤含有培地夫々に各株の菌浮遊液を添加し、 $37^{\circ}C$ に 2 週間培養した。

なお、培地の薬剤含有濃度は培養が度重なるにつ

れ、菌の薬液に対する耐性度の上昇が招来せられるので、第 2 表右欄に示せる如く、始めは $0.1\gamma/ml$ であっても、後 $1\gamma/ml$ 位に迄漸増した。

耐性獲得度検定試験：3代培養毎に、全く前記の如く、但し別の容器内において作製せる菌浮遊液を夫々の薬剤を逐次的に含有せしめた Kirchner 培地に 1 滴（菌湿重量約 0.1 乃至 0.2mg 相当）宛投じ $37^{\circ}C$ に 4 週間培養した。この際、最高発育濃度を以て耐性を表わし、その濃度比を以て耐性の上昇倍数とした。

なお、これら試験に先立ち 10% 血清加 Kirchner 液体培地を使用して前記 4 株に対する SM, PAS, INAH, TB-I, Sulzolin, Sulfathiazol, PASAH の発育阻止最大希釈濃度を前記実験方法に準じ、検査した。この際、菌液は固型培地に生えた集落より作製し、薬剤原液の調製に当つては TB-I は Propylenglycol と等量の 70% Ethanol に溶解せしめ、SM は滅菌生理的食塩水に、他は全部 70% Ethanol に溶解せしめた。

実験成績

A) H37 Rv 株及びその諸耐性株に対する PASAH の管内発育阻止作用：第 1 表に示す如く H37 Rv 株そのものに対しては PASAH は INAH に等しきか又はこれよりも優性な阻止力を示し、これに次ぐ強力なものを SM, PAS 続いて Sulzolin なりとする。但し PAS 耐性株に対しては PASAH の発育阻止力は甚だ低下する。即ち PASAH の構造は Hydrazine

基を持つけれども、耐性を獲得せしめる点では PAS と態度を等しくする如くである。

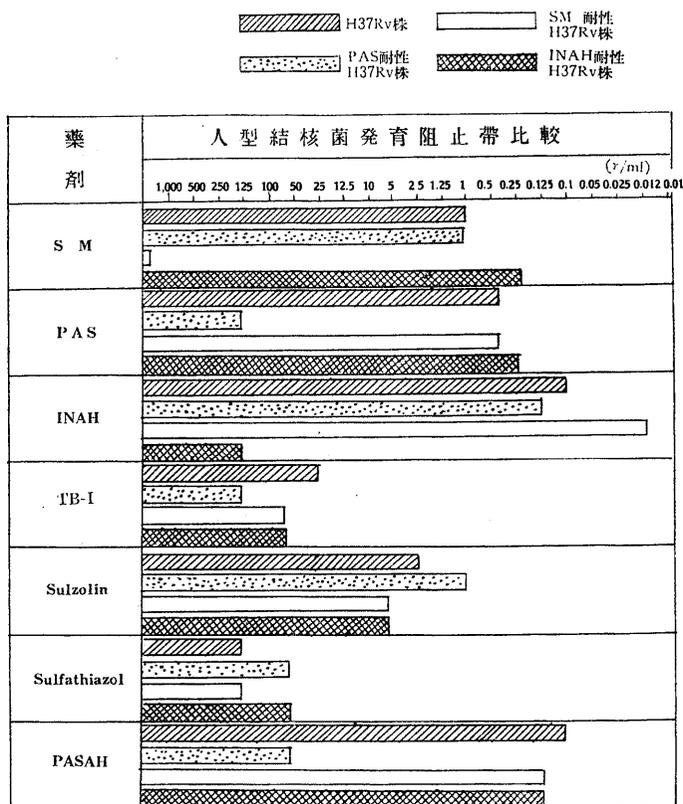
PAS 耐性株に対しては INAH が依然最も強力で、Sulzolin, SM がこれに次ぐことは予が嘗て報じた如くである⁶⁾。

次いで SM 耐性株並びに INAH 耐性株に対しては PASAH は何れも $0.12\gamma/ml$ でその発育を阻止し得る。INAH 耐性株に対して PAS

第 1 表 H37Rv 株並びに各種耐性株に対する
諸抗結核剤の発育阻止作用

薬 剤	結核菌発育阻止最大希釈濃度 (γ/ml)			
	H37Rv 株	PAS 耐性 H37Rv 株	SM 耐性 H37Rv 株	INAH耐性 H37Rv 株
S M	1	1	4.000	0.25
P A S	1	125	0.5	0.25
INAH	0.1	0.12	0.012	125
T B-I	25	125	50	50
Sulzolin	2.5	1	5	5
Sulfathiazol	125	50	125	50
PASAH	0.1	50	0.125	0.12

第 1 図



乃至 SM が感受性株に対するより強力にその発育を阻止するが、PASAH のそれは一層強力であることは注目し値する。

B) H37 Rv 株及びその諸耐性株の PASAH (及びその他諸抗結核剤)に対する耐性獲得：各株の耐性獲得状況を一括して第2表に掲げた。

1) H37 Rv 株の場合

本株は PASAH に対して容易に耐性を獲得し難く、15代後に漸く 2.5γ/ml の耐性を示す程度で、その耐性度は比較的耐性を獲得せしめ難いといわれる PAS よりも遙かに低位にあつた。

これに反し SM, INAH に対しては幾多の業績⁴⁾⁵⁾に示された如く、容易に、且つ早期に耐性を獲得し、15代後には SM に対し 500γ/ml, INAH に対し 100γ/ml 程度の耐性を示した。

た。

2) PAS 耐性株の場合

本株は A) の項に述べたように継代前既に PASAH に対し 25γ/ml 耐性を有し、15代後には SM, INAH と同じく高度の耐性を獲得した。(第2図, 第4図参照)

又、本株は H37 Rv 株と同様に SM, INAH に対し9代迄急速に耐性を獲得したが、以後なお漸増して15代目には両者等しく 100γ/ml 耐性を示した。

3) SM 耐性株の場合

PASAH に対しては H37 Rv 株と同様、容易に耐性を獲得せず、15代後に漸く 5γ/ml 耐性を示すに過ぎなかつた。(第3図, 第5図参照)

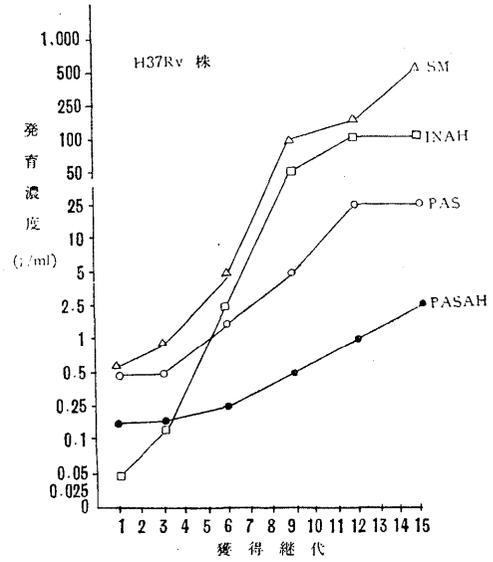
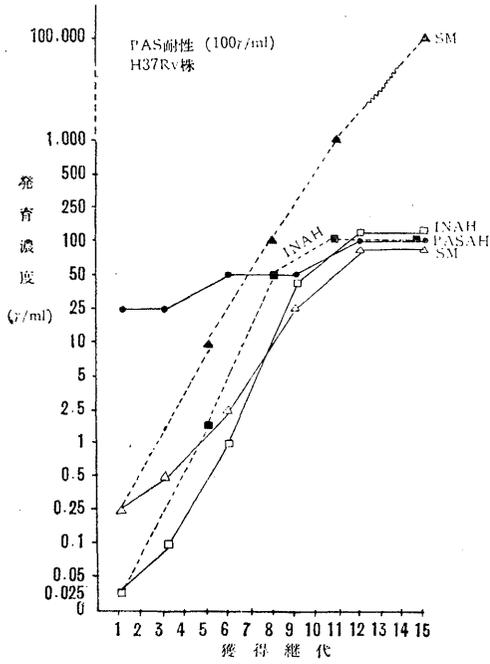
これは同株が同数の継代培養において PAS に対し 50γ/ml, INAH に対し 125γ/ml の耐

第 2 表

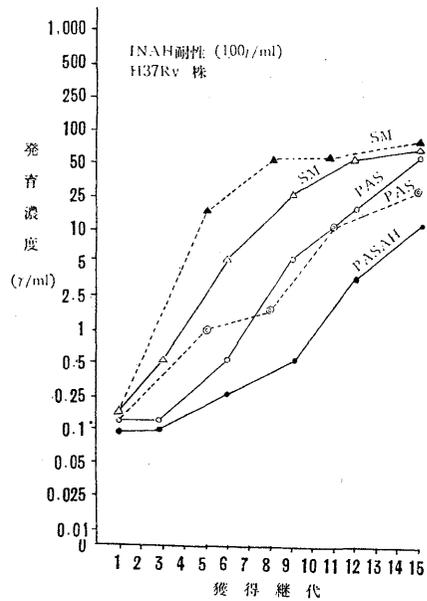
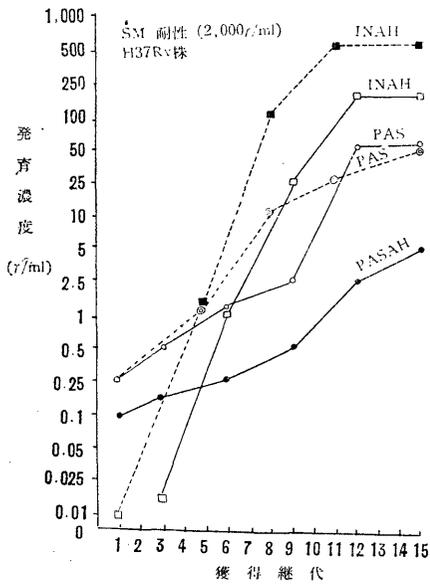
薬 剂	継 代	結核菌発育最小稀釈濃度 (γ/ml)				継代培地の 薬剂含有濃度 (γ/ml)	
		H37Rv 株	PAS 耐性 H37Rv 株	SM 耐性 H37Rv 株	INAH 耐性 H37Rv 株		
PAS	1	0.5	100	0.25	0.125	0.1	
	3	0.5		0.5	0.125	0.1	
	6	1.25		1	0.5	0.5	
	9	5		2.5	5	0.5	
	12	25		50	12.5	1	
	15	25 (50)		50 (200)	50 (400)	1	
S M	1	0.5	0.25	2.000	0.125	0.1	
	3	1		0.5	0.5	0.1	
	6	5		2.5	5	0.5	
	9	100		25	25	0.5	
	12	125		100	50	1	
	15	500 (1.000)		100 (400)	50 (400)	1	
INAH	1	0.05	0.025	0.01	100	0.1	
	3	0.125		0.125	0.1		
	6	2.5		1	0.5		
	9	50		25	0.5		
	12	100		125	1		
	15	100 (2.000)		125 (12.500)	1		
PASAH	1	0.125	25	0.1	0.1	0.1	
	3	1.125		0.125	0.1		
	6	0.25		0.25	0.1		
	9	0.5		0.5	0.1		
	12	1		2.5	0.5		
	15	2.5 (20)		5 (50)	10 (100)	1	
S M INAH	1	/	SM	INAH	/	SM	INAH
	5		0.25	0.025		0.05 + 0.05	
	8		10	1.25		0.05 + 0.05	
	11		100	50		0.5 + 0.5	
	15		1,000	100		0.5 + 0.5	
PAS INAH	1	/	PAS	INAH	/	PAS	INAH
	5		0.25	0.01		0.05 + 0.05	
	8		1	1		0.05 + 0.05	
	11		10	100		0.5 + 0.5	
	15		25	500		0.5 + 0.5	
PAS S M	1	/	PAS	SM	/	PAS	SM
	5		0.125	0.125		0.05 + 0.05	
	8		1	12.5		0.05 + 0.05	
	11		1.25	50		0.5 + 0.5	
	15		10	50		0.5 + 0.5	
			25	50	1 + 1		

註 () 内は耐性上昇倍数。

第 2 図



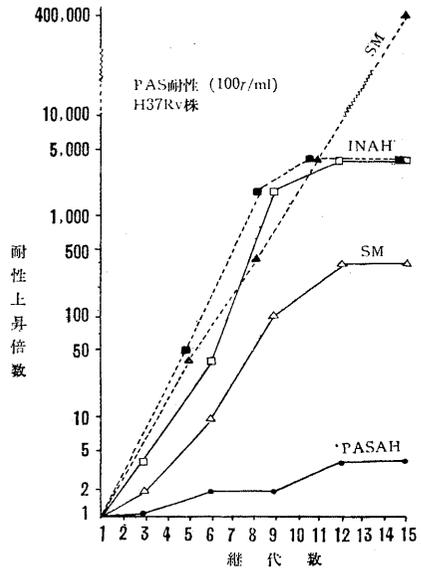
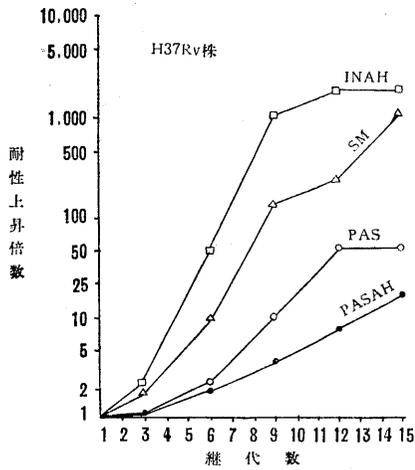
第 3 図



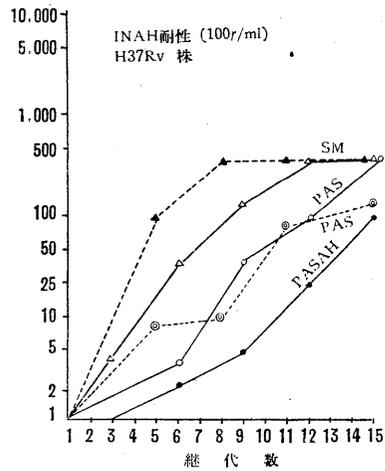
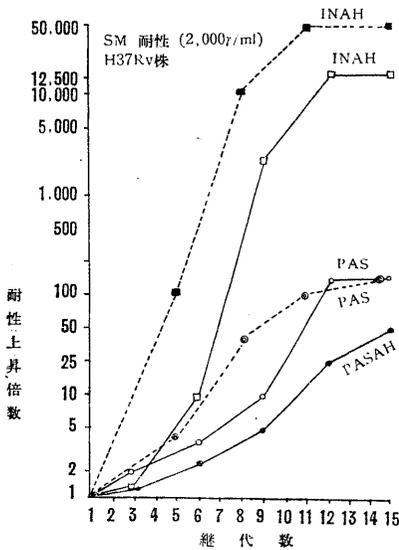
性を得たことと比較すると遙かに低い耐性を示すものである。

なお、しかし更にこれを詳細に検するに INAH に対しては前2株と同様に早期に高度

第 4 図



第 5 図



の耐性を獲得しており、9代後に既に 257/ml の耐性を示したが、PAS に対しては 9 代迄徐々に、以後急速に耐性を得ていることが注目される。

4) INAH 耐性株の場合

本株の SM に対する耐性獲得は PAS に対

するそれよりも早く、15 代後には 507/ml の耐性を示した。しかし H37 Rv 株及び PAS 耐性株に比べるとその SM 耐性度はこれらの 1/10 乃至 1/2 であつた。(第 3 図、第 5 図参照)

然るに PASAH に対する本株の耐性は、H37 Rv 株及び SM 耐性株に比し比較的高度の耐性

を獲得したとはいうものの、なお 107/ml で、PAS, SM に対するよりも耐性度はその 1/2 に過ぎない。

C) 薬剤併用培地使用における耐性獲得同じく第 2 表にその結果を掲げた。

1) PAS 耐性株を SM と INAH 併用培地に継代培養せる場合、SM 耐性は早期に獲得され、耐性度は非常に高度で、15 代後に 100,007/ml でも菌の発育を示し、INAH に対しても 1007/ml 耐性を得た。H 37 Rv 株を SM と INAH 併用培地に継代せし場合、INAH に対する耐性度は INAH 単独培地に継代せし場合と変らなかつたと堂野前教授⁹⁾は報告しているが、PAS 耐性株においても両剤の併用により耐性の防止作用は全く認められず、寧ろ促進されたようである。

2) SM 耐性株を PAS と INAH 併用培地に継代せしめた場合、INAH 耐性は PAS 併用により反つて促進せられ 5007/ml の高度耐性を獲得した。

3) INAH 耐性株を PAS と SM 併用培地に継代せしめた場合、感受性株については、Grassle⁸⁾等により SM 耐性防止には PAS を併存せしめた培地中での継代が著明な効果を示すということが報告されているが、本実験にて INAH 耐性株の SM 耐性出現を PAS 併存により遅延或いは防止し得ず、単独同様に 15 代後に 507/ml 耐性を示し、同時に PAS に対しても 257/ml 耐性を獲得することを知つた。

なお以上 1) 2) 3) 三つの経路により PAS, SM, INAH 三者全部に耐性を有する株(全耐性株と仮称する)を実験的に作る事が出来たが、就中、PAS 耐性株を SM, INAH 併用培地に継代培養して得たものが、何れの場合におけるよりも両剤に対し速に且つ高度に耐性を獲得することが判明した。斯くて得られた全耐性株は 1007/ml PAS 耐性、100,0007/ml SM 耐性、1007/ml INAH 耐性を示した。これが病原性の有無に関しては目下同僚により追及されつつある。

総括並びに結論

人型結核菌 H37 Rv 株とその PAS, SM 及び INAH 耐性株を p-Aminosalicylic acid hydrazide (PASAH), 外各種抗結核剤を含有せる培地に継代培養し、各薬剤に対する耐性獲得状況を検査し、次の如き結果を得た。

1) PASAH に対し PAS 耐性株が継代前、既に中等度耐性を示す以外、H37 Rv 株、SM 耐性株、INAH 耐性株何れも継代前には高度の感受性を有し、PASAH 含有培地に 15 代継代せる後にもその耐性獲得度は極めて軽微であつた。

2) PAS に対して諸菌株は一般に耐性を獲得し難いというものの、本実験において示されるようになお中等度耐性を獲得する。

3) SM に対し、INAH 耐性菌が中等度耐性を得、他の株は何れも高度耐性を早期から獲得

した。

4) INAH に対し何れの株も 15 代継代後 1007/ml 以上の高度耐性を獲得し、耐性上昇は何れの薬剤に対するよりも早期に認められた。

5) PAS 耐性株、SM 耐性株及び INAH 耐性株を夫々 SM と INAH, PAS と INAH 及び PAS と SM 併用培地に継代培養せしめた場合、何れも併用による耐性獲得速度の遅延は認められず、寧ろ促進されたものさえ認められた。殊に PAS 耐性株を SM と INAH 併用培地に継代せしめた場合、最も迅速に PAS, SM 及び INAH 3 剤共に対し耐性を獲得し、その耐性度も最も著明であつた。

撰筆するに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を辱うせる恩師日置教授に深甚なる謝意を表す。

文

- 1) 三崎・坂井 : 医学と生物学, 25, 28, 1952.
- 2) 三崎 : 十全医学会雑誌へ, 55, 1059 & 1065, 1953.
- 3) 安井 : 十全医学会雑誌, 54, 514, 1953.
- 4) Steeken, Tr. M. a, o. : Am. Rev. Tbc., 65, 759, 1952.
- 5) Ruck, M. & Schnitzer, R. T. : Am. Rev. Tbc., 65, 759, 1952.

献

- 6) 坂井 : 金大結核年報, 11, 1, 39, 1953.
- 7) 田中 : 金大結核年報, 8, 1, 67, 1949.
- 8) Grassle, O. E. & Pietrowski, J. J. : Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Tuberculosis, 527, 1949.
- 9) 堂野前 : 臨床, 5, 9, 843, 1952.