

人型結核菌における PAS の INAH 耐性阻止機作

三浦幸二・安保 孝・東村道雄

国立療養所大府荘（指導：荘長 勝沼六郎博士）

（昭和 31 年 8 月 27 日受付）

耐性上昇の機序は、LURIA⁽¹⁾、DEMEREK⁽²⁾⁽³⁾ 等により、mutation and selection に依つて説明されている。しかし、耐性上昇の機序を、単に mutation and selection'のみで解釈出来ない場合もあつて、薬物の mutagenic effect によつて、induced mutation が起り、これが耐性上昇の主要であるとする説もある⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

GAESSLE & PIETROWSKI⁽⁶⁾ は、人型結核菌を使用し、*in vitro* における streptomycin (以下、SM と記載) 耐性阻止に対する PAS の作用について、SM 耐性菌は併用の PAS によつて阻止されるといつている。又東村⁽⁷⁾は、青山 B 株を使用し、SM の selection に生存した少数の菌の増殖は、少量の添加された PAS により阻止され、又 PAS は、SM の mutagenic effect に拮抗する (SM の存在において、SM 耐性への mutation に拮抗する) のを認めた。

KLEIN & KIMMELMAN⁽⁸⁾⁽⁹⁾ は、penicillin, sulfadiazine, 及び SM の *in vitro* における *Staphylococcus aureus* に対する単独及び併用した場合の阻止作用をしらべて、観察された synergism における重要な因子は penicillin の test された薬剤濃度で生残した少数の菌の増殖を、併用として少量加えられた sulfonamide の作用であつたと云つている。又使用薬剤の濃度が低いことは、その薬剤に対する耐性を上昇させぬためには必要であると云つている。MOUNT, *et al.*⁽¹⁰⁾ は、PAS-INAH 併用の有効なことを認めている。AITOFF⁽¹¹⁾ は、isoniazid と PAS の併用効果としての synergism をみとめ、SM と isoniazid は単に additive effect であると述べている。

しかるに、SZYBALSKI & BRYSON⁽¹²⁾ は、*B. megaterium* において、isonicotinylhydrazine 及び sodium-p-aminosalicylate に対する mutation rate per bacterium per generation をしらべ、2重耐性への mutation rate は、PAS 及び INAH への mutation rate よりも理論的に期待される値よりも高い価を示したと云つている。そして、SZYBALSKI は、(1) 1種の薬剤への耐性菌が他の薬剤への mutation rate が高いか、(2) premutational phase があるのか、(3) 2つの薬剤への、2重耐性菌が1度に生ずるものがあるのかもかもしれないと考えた。又薬剤併用については、その単

独使用にまさる理由としては、第1に、KLEIN & KIMMELMAN⁽⁸⁾は、薬剤 A の selection によつて耐性が生じ、其の後与えられた薬剤 (A) 濃度に対する resistant variants が増殖する。菌の増殖を阻止する薬剤 B が加えられた場合、その薬剤 B は、薬剤 A の作用に対し、生存した variants の迅速な増殖を阻止する。このようにして、耐性上昇の rate を加減する。第2に、東村⁽⁷⁾は、*M. tuberculosis* において、SM 耐性への mutation が、PAS の存在により影響されると云つている。

第1の場合、当然考えられるが、isonicotinic acid hydrazide (以下、INAH) 耐性への mutation が、PAS により影響されると云う可能性が考えられる。そこで、われわれは、PAS による INAH 耐性阻止の mechanisms を解明するべく実験した。

実験材料

菌株：人型結核菌青山 B 株を使用した。

培地：1% 小川 (辰次) 培地 (無精卵を使用) を各中試験管に 10 ml づつ分注し、INAH 及び PAS の種の濃度の組合せをつくり、90°C 1時間凝固滅菌して斜面に仕上げた。

薬剤：INAH は、Isonicotinic acid hydrazide で武田製薬会社製、PAS は、田辺製薬会社製のものを使用した。

実験方法並びに実験成績

(1) 培地は、1% 小川培地を使用し、INAH の倍数稀釈列は、1.0 mcg/ml より 0.00011 mcg/ml までとして、これに INAH を含まぬ対照 15 本目を加えた。人型結核菌青山 B 株を、ガラス玉とともに、ナス型コルペン中にて振盪し、生理的食塩水にて均等浮遊液 (約 1 mg 湿菌量) となし、10 進法にて稀釈して、 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} の菌液を渦巻型大白金耳にて、それぞれの濃度の菌液を、INAH 稀釈列に等量接種 37°C 6 週培養した。

この株の population の individual cells の発育を全然阻止しない INAH の濃度を検したのであるが、表 1 の如き成績を得たが、INAH 0.00345 mcg/ml であつた。同様実験を 2 回繰返えし、同一の結果を得た。

(2) 別に、1% 小川培地を使用し INAH の稀釈列を 1 mcg/ml より 0.00011 mcg/ml までの倍数稀釈列と

表 1

試験管系列	接種量	INAH mcg/ml														
		対照	.00011	.00022	.00045 [Ⓢ]	.0009	.0017	.0035	.007	.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0
1	10 ⁻⁴	≡	723	302	391	278	207	201	63	0	0	0	0	0	0	0
2	10 ⁻³	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	347	0	0	0	0	0	0	0
3	10 ⁻²	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	127	0	0	0	0	0	0
4	10 ⁻¹	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	298	5	3	5	5	1
5	10 ⁰	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	71	19	19	29	20	9

表 2

試験管系列	PAS mcg/ml	INAH mcg/ml														
		対照	.00011	.00022	.00045	.0009	.0017	.0035	.007	.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0
1	0.25	400	cont.	cont.	137	63	104	54	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.10	384	239	211	193	111	227	179	132	0	0	0	0	0	0	0
3	0.05	319	cont.	319	189	163	187	230	97	0	0	0	0	0	0	0
4	0.01	380	436	cont.	296	390	383	363	271	0	0	0	0	0	0	0
5	0	452	417	314	414	340	256	194	67	0	0	0	0	0	0	0

し、これに INAH を含まぬ対照 15 本目を加え、(a) PAS を加えないもの、(b) PAS 0.01mcg/ml 添加、(c) PAS 0.05mcg/ml 添加、(d) PAS 0.1mcg/ml 添加、(e) PAS 0.05mcg/ml 添加、の 5 種類を作った。そして、これに上述と同様の操作にて調製した 10 進法による菌稀釈液を、等量づつ接種、37°C 6 週培養し、表 2 の如き成績を得た(本実験も、2 回繰返し行い同様の成績を得た。即ち、PAS, INAH に著明な併用効果を認め得なかつた)。9 本目の系列には、INAH の select のない濃度は、上述の実験によれば、0.00045 mcg/ml であるので、この濃度の INAH (0.035 mcg/ml) 株の population の individual cells の発育を一部分では、この阻止しているものと思われるので、この INAH の select に対する PAS の作用を検査する目的後述のごとき実験(3)を行つた。又 12 本目の系列にて、では、INAH の select のない濃度であるが、その場合 INAH の mutagenic effect の存否を確かめ、もし存在すれば、その INAH の mutagenic effect に対する PAS の作用をしらべる目的にて、実験(4)を行つた。

(3) 即ち、各稀釈列の 9 本目をとり、各々別々に菌液を作り、その 10 進法による稀釈液を、薬剤を含まぬ培地 10 本に接種し、同時に、もとの菌液を、INAH 1mcg/ml を含有する培地 20 本に等量づつ接種し、生菌数当りの INAH 1mcg 耐性菌出現率を検査したところ、表 3のごとく、対照に比し、PAS 濃度の増大につれ INAH 耐性菌の出現率の低下の傾向を認めた。

表 3

試験管系列	INAH mcg/ml	PAS mcg/ml	各試験管当り接種菌数	試験管当り INAH 1 mcg 耐性菌数	生菌数当り INAH 1 mcg 耐性菌出現率
1	0.0035	0	3.10×10 ⁵	5.03	1.62×10 ⁻⁶
2	"	0.05	5.66×10 ⁵	20.00	3.56×10 ⁻⁶
3	"	0.01	3.33×10 ⁶	8.65	2.59×10 ⁻⁷
4	"	0.10	3.31×10 ⁶	8.00	2.41×10 ⁻⁷

表 4

試験管系列	INAH mcg/ml	PAS mcg/ml	試験管当り接種菌数	試験管当り INAH 1 mcg 耐性菌数	生菌数当り INAH 1 mcg 耐性菌出現率
1	0.00045	0	14.1×10 ⁵	4.88	3.44×10 ⁻⁷
2	"	0.05	10.6×10 ⁵	29.16	27.50×10 ⁻⁷
3	"	0.01	46.0×10 ⁵	6.33	1.37×10 ⁻⁷
4	"	0.10	31.6×10 ⁵	20.20	6.05×10 ⁻⁷
5	"	0.25	34.7×10 ⁵	3.40	9.78×10 ⁻⁸

(4) 次に各稀釈列の、12 本目を使用し、同様実験を行つた結果は、表 4のごとくで、対照に比較し、INAH 1mcg 耐性菌出現率に有意の差を見出すことは出来なかつた。

(5) 上述の実験とは別に、人型結核菌青山 B 株を使用し、37°C 6 週培養し、生菌数当りの INAH 1mcg 耐性菌出現率を検したところ 6.78×10⁻⁷ の成績を得た。

考 案

INAH に、mutagenic effect があれば、INAH の

select されぬ濃度で処理した場合は、INAH 耐性菌が増大する筈であるが、表4のごとく INAH 1mcg 耐性菌出現率は、 3.44×10^{-7} で、上述の対照 6.78×10^{-7} に比較して、有意の差は見られなかつた。この場合、6週培養を使用したか、DEMERE⁽⁸⁾ の云うごとく、mutant は stable なものであるから、4~5週に出現率が增大していたものが、6週では減少したとは思われない。この実験のみで直に断定はなし得ないが、われわれの行つた実験条件下では、INAH の mutagenic effect は証明できなかつた。

次に、青山B株の population の individual cells の發育を全然阻止しない濃度の INAH を使用した場合、PAS の添加は、INAH 1mcg 耐性菌出現率に有意の差を示さなかつた。然るに、INAH が、この株の population の individual cells の發育を一部分阻止している場合には、INAH 1mcg 耐性菌出現率にたいし、PAS 濃度の増大につれ、出現率減少の傾向をみとめた。Selection のない濃度の INAH を使用した場合、resistant mutants は、少くとも、元の株に比し高いことが考えられる。従つて、その場合、INAH 1mcg 耐性菌出現率は、INAH を含まぬ培地に發育した菌株に比し高く出ることが当然考えられる。しかるに、本実験の条件下においては、対照の 6.78×10^{-7} に比し、 3.44×10^{-7} と、むしろ減少の傾向さえ示した。これから考えると、第1に、selection のない濃度の INAH を使用した場合に、resistant mutant を対照に比し多く含んでいないのか、第2に、そこに含まれた resistant mutant が、対照より多く含まれていたかも知れないが、INAH により selection され、出現率が高く現れなかつたのかも知れない。

Selection のない濃度の INAH を使用した場合に、PAS を添加しても、INAH 1mcg 耐性菌出現率には、有意の差はなかつた。上述のごとく、INAH は selection のない濃度を使用したか、PAS の濃度も、同じく selection のない濃度及びそれより濃度を順次高くした。KLEIN & KIMMELMAN の併用の理論⁽⁶⁾によれば、INAH の selection により耐性が生じ、其の後与えられた INAH 濃度に対する resistant variants 即ち、INAH 1mcg 耐性菌が増殖しているはずはない。そして、KLEIN & KIMMELMAN⁽⁶⁾ は、更に、菌の増殖を阻止する薬剤は、前の薬剤作用に対し、生存した variants の迅速な増殖を阻止すると云つてゐる。しかし、この場合増殖がみとめられなかつたのであるから、即ち阻止すべき variants の増殖がないのであるから有意の差をみとめなかつたものと思われる。

しかし、1部分 selection のある INAH を用いた場

合、当然そこには、mutation and selection により、生存した variants の増殖が考えられ、これに PAS が阻止作用を示したものと思われる。

尚、PAS, INAH の併用の場合、著明な併用効果はみとめなかつた。これは、PAS, INAH の間に synergisms の存在は、否定してよく、単に additive effect と考えられる。

結 論

人型結核菌青山B株を用い、培地は1%小川培地(無精卵のみ使用)を使用したか、selection のない、INAH の濃度 0.00045 mcg/ml と PAS 0/ml, 0.05 mcg/ml, 0.01 mcg/ml, 0.1 mcg/ml, 0.25 mcg/ml のそれぞれの併用と、同じく selection のない INAH の濃度 0.0035 mcg/ml と PAS 0/ml, 0.05 mcg/ml, 0.01 mcg/ml, 0.1 mcg/ml を使用し、4週培養の後、生菌数当りの INAH 1mcg 耐性菌の数を比較して、前者の併用の組合せの場合には、 3.44×10^{-7} , 27.5×10^{-7} , 1.37×10^{-7} , 6.05×10^{-7} , 0.978×10^{-7} となり、後者の組合せの場合には 1.62×10^{-7} , 35.6×10^{-7} , 2.59×10^{-7} , 2.41×10^{-7} の結果を得た。尚、上述の如く、PAS の添加によりて、INAH 耐性菌出現率減少の傾向をみとめ得た。

更に、われわれの実験条件下では、直ちに断定することは出来ぬが、INAH の mutagenic effect を認めることは出来なかつた。

本稿を終るに当り、御指導、御校閲を賜つた国立療養所大府荘荘長 勝沼六郎博士、名古屋大学医学部内科第一講座 日比野進教授に感謝する。

参 考 文 献

- (1) LURIA, S. E. Recent advances in bacterial genetics. *Bact. Revs.*, 2: 1~40, 1947.
- (2) DEMERE⁽⁸⁾, M. *J. Clin. Inv.* 28(5): 891~893, 1949
- (3) DEMERE⁽⁸⁾, M.: *J. Bact.* 56(1): 63~74, 1948.
- (4) 秋葉, 横田 *医学と生物学* 24: 218~222, 1952
- (5) 君野, 都築: *J. Antibiotics*, Ser. B 7: 62~65, 1954.
- (6) GRAESSLE, O. E. & PIETROWSKI, J. J.: *J. Bact.*, 57: 459~464, 1949
- (7) 東村: *J. Antibiotics*, Ser. A 9: 186~190, 1956
- (8) KLEIN, M. & KIMMELMAN, L. J.: *J. Bact.*, 54(1) 8~9, 1947
- (9) KLEIN, M., & KIMMELMAN, L. J. *J. Bact.*, 54: 363~370, 1947.
- (10) MOUNT, F. W. & FEREBEE, S. H.: *Am. Rev. Tuberc.*, 70: 521~526, 1954
- (11) AITOFF, M. & SALAS, A.: *Pasteur*, (*Am. Rev. Tuberc.* 83: 273, 1952. 抄録引用)
- (12) 東村, 野田, 三浦・結核, 31(2): 107~110, 1956.
- (13) SZYBALSKI, W. & BRYSON, V.: *J. Bact.*, 66(4) 468~469, 1953