

Mycobacterium tuberculosis に於ける Streptomycin 及び Isonicotinic acid hydrazide 耐性菌出現に対する Pyrazinamide の作用について

三浦幸二・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 5 月 24 日受付）

緒 言

MALONE¹⁾ は, mice に於ける experimental tuberculosis に, DESSAU²⁾ は, guinea pigs における experimental tuberculosis に Pyrazinamide (以下, PZA) が, 有力に作用をすることを認め, YEGGER³⁾ 等は active pulmonary tuberculosis の患者に症状の好転を認めたが, 尙薬剤耐性菌の迅速な出現を指摘した。しかし, 其の後, MCDERMOTT⁴⁾ 等により, PZA と他の薬剤の併用が検討され, PZA-isoniazid の併用が, 最もよい antituberculous activity を示すと云い, CAMPAGNA⁵⁾ 等は, 臨床的に PZA 及び isoniazid の併用を検討し, 有効なことを認めている。

しかるに, *in vitro* にて, TARSHIS⁶⁾ は, 中性培地で, 100~1,000 mcg/ml PZA にて, partial な inhibition を示すのみであることを示している。SOLOTOROVSKY⁷⁾ 等は, PZA には, PAS の如く, Isonicotinic acid hydrazide-(以下, INAH) 耐性菌の出現を遅延させる作用があると云っている。しかし, 著者等⁸⁾ の実験では, 1% 小川培地を使用したのであるが, SM 耐性菌出現率に対する PZA の影響をみとめることは出来ず, むしろ出現率増大の傾向をみとめた。

尙, MCDERMOTT⁹⁾ 等は, PZA は, H₃₇Rv に対し中性培地では, 200~500 mcg/ml で抗菌性を示すが, 培地を酸性にすると, 著明な inhibition を示すと云っている(特に, pH 5.5 で最も強い)。尙, 本邦¹⁰⁾ でも, *in vitro* では, 中性培地を用いた場合, 結核菌の発育抑制作用はほとんど認められず, 100~1,000 mcg/ml で, ようやく発育抑制作用があると云っている。

われわれは, 中性培地において inhibition をほとんど示さず, 酸性培地において, 著明なる inhibition を示すと云われる PZA の作用機作を明らかにし, 且つ, PZA-INAH, PZA-SM の併用効果を, 検討する目的にて実験した。

実験材料

菌 株 :

使用した菌株は, *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, strain Aoyama B を使用した。

培 地 :

1% 小川培地 (その組成は, 第 1 磷酸加里, 1.0 g; グルタミン酸ソーダ, 1.0 g; 蒸溜水, 100 ml; 鶏卵, 200 ml; 2% マラヒット緑, 6.0 ml; グリセリン, 6.0 ml にて, 中試験に 10 ml づつ分注, 85°~88°C 50 分凝固滅菌。pH 7.0 である。)

3% 小川培地。(上述の組成の中, 第 1 磷酸加里のみ 3.0 g とした。pH 6.5 であつた。)

5% 小川培地。(上述の組成の中, 第 1 磷酸加里のみ 5.0 g とした。pH 6.0 であつた。)

デュボス液体培地。日本栄養化学株式会社より寄贈されたものを使用した。その組成は, クエン酸鉄アンモニウム, 0.01 g; 硫酸マグネシウム, 0.1 g; 塩化カルシウム, 0.0005 g; 硫酸亜鉛, 0.0001 g; ペプトン, 5.2 g; アスパラギン, 2.0 g; 磷酸ナトリウム, 2.2 g; 磷酸 2 水素カリウム, 1.3 g; ポリソルベート 80 (Tween 80), 0.5 g; 硫酸銅, 0.0001 g; マラカイトグリーン, 0.002 g; の合計 11.3 g の培地粉末を 900 ml の蒸溜水に溶解し, 滅菌試験管に 4.5 ml 宛分注して高圧滅菌し 50°C 以下に冷却後 0.5 ml (即ち 1/10 量) の結核培地用アルブミン溶液 “栄研” を無菌的に添加した。其の後, 24 時間無菌試験を行い, 無菌培養基のみを培養に用いた。pH は 6.8 に修正された。

使用薬剤

SM は, Dihydrostreptomycin sulfate で, 協和醸酵株式会社製のものであつた。INAH は, Isonicotinic acid hydrazide で, 田辺製薬株式会社製のものであつた。尙 PZA は, 三共製薬株式会社より, 研究用として寄贈されたものである。

各薬剤は, 凝固滅菌に先だち所定の濃度に加えられた。但し, SM の場合のみ力価を 1/2 として添加された。

実験方法及びに実験成績

実験方法及び成績は, その都度記載する。

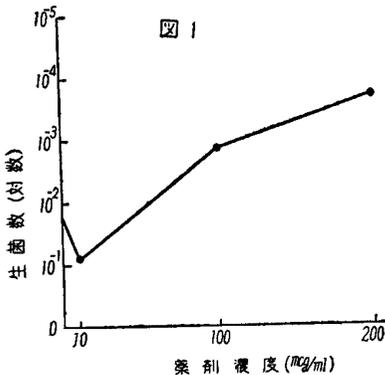
(1) 青山 B 感性株の PZA に対する感受性

1% 小川培地を使用し, PZA を 400 mcg/ml, 200 mcg/ml, 100 mcg/ml, 10 mcg/ml 含有する培地と, PZA を含有しない対照の培地を 1 系列とした。別に, 青山 B 株の適宜量を, ナス型コルベンにて, 10 分間振盪

し、生理的食塩水にて均等浮游液となし、10進法による稀釈系列をつくり、その10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴の各菌液を、大型渦巻白金耳にて、1白金耳づつ上述の系列に、別々に等量接種、37°C 4週間培養後判定した。その成績は、表1、図1の如くである。

表 1

添加薬剤	PZA mcg/ml	0	10	100	200	400
試験管 当り接 種菌数	66.5×10 ⁴	卍	卍	卍	卍	卍
	66.5×10 ³	卍	卍	593	423	349
	66.5×10 ²	652	580	3	0	0
	66.5×10 ¹	136	69	0	0	0
	66.5	49	0	0	0	0



即ち、接種菌数によりPZAのinhibitionに著差を認める。大量接種の場合には、PZAはinhibitionを示さないが、少量接種の場合には、接種菌の中には、相当PZAにsensitiveなものを含んでいると思われる。

(2) PZAの青山B株のlag phaseに対する作用
PZAを含有せぬDUBOS液体培地及びPZA 50mcg/ml、PZA 100mcg/mlを含有するDUBOS液体培地100mlに、それぞれ上述と同様にして調製した青山B株10mg菌(湿菌量)を、それぞれ1mlづつ加え、充分振盪して均一となし、各々中試験管に5.0mlづつ分注し、対称として接種直後及び其の後、毎日18日目まで、LeizのRouy-Photometer、Filter 610mμにて比濁し、あらかじめ作製した標準曲線により各試験管中の発育菌量を測定し、培地にPZAを含まぬ場合と、PZA 50mcg/ml、100mcg/mlの存在する場合における発育曲線を比較した。

その結果は、図2の如く、A(Aは、DUBOS液体培地に、青山B株を接種したものである。)に比し、A+PZA 50(但し、+PZA 50とは、前述のものにPZA 50mcg/mlを添加せるものである。)、A+PZA 100(前述と同様、PZA 100mcg/mlを添加せるものである。)では、それぞれlag phaseの遅延が考えられ、log phaseを示す直線の横座標に

対する角度が、A+PZA 100、A+PZA 50、Aの順で、Generation timeの延長が、この結果から想像される。

(3) 培地pHを変えた場合に於けるPZAの作用

1, 3, 5% 小川培地に1本目をPZA 1,000mcg/mlとし、倍数稀釈にて9本目

まで加え、最後の1本には対照として水を加えた。

このPZAの稀釈系列に、上述と同様にして作った青山B株の10進法による稀釈均等菌浮游液を、大型渦巻白金耳にて、等量づつ接種37°C 4週間培養した。

その結果は、表2の如く、1%、3%、5%において、pHの変るにつれPZAの作用に著明な相違があるのを、みとめることは出来なかつた。

(4) PZA-SM併用効果について

1%、3%、5%小川培地を使用し、それぞれの%の小川培地につき、1本目をSM 20mcg/mlとし、倍数稀釈法により、最後の1本は対照としてSMを加えなかつた。これを1系列として、PZAを含まぬ系列、PZAをそれぞれ10mcg/ml、50mcg/ml、100mcg/mlを、更に、この系列に添加し、前述と同様にして作った菌液を等量づつ接種、37°C 6週間培養して判定した。

その結果は、表3の如くで、3%、5%小川培地においては、SM-PZA併用効果を認めることは出来なかつたが、むしろ1%小川培地において、併用効果をみとめた。

(5) PZA-INAH併用効果について

1本目を、INAH 0.2mcg/mlとし、あとは、(4)と全く同様の実験方法にて併用効果をしらべてみた。その結果は、表4の如くで、1%、3%、5%小川培地、いずれにおいても、併用効果をみとめることは出来なかつた。

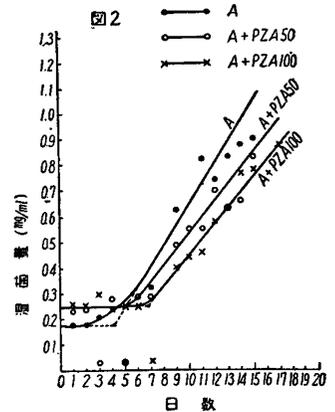


表 2

PZA mcg/ml	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	水	
1%	test (1)	0	0	1	1	2	0	0	18	48	130
	test (2)	0	0	1	3	3	13	43	42	63	132
3%	test (1)	1	2	2	2	3	14	15	42	38	55
	test (2)	0	1	3	2	6	13	25	37	64	79
5%	test (1)	1	4	4	3	8	30	39	51	71	121
	test (2)	3	4	1	1	0	4	12	40	39	78

(6) PZA 単独使用における INAH 耐性菌出現率及び SM 耐性菌出現率に及ぼす影響

1% 小川培地を使用し、予かじめ PZA を含まぬ培地及び PZA 10 mcg/ml, 100 mcg/ml, 200 mcg/ml に青山 B 株を接種, 37°C 4 週培養して, 発育せる菌株を使用し, それぞれの菌株をとりナス型コルベンにてガラス玉とともに 10 分間振盪, 生理的食塩水にて均等浮游液となし, INAH 1 mcg/ml 含有せる培地と, SM 20 mcg/ml を含有せる培地に大型渦巻白金耳にて 1 白金耳づつ等量接種し, 尚菌液の 10 進法による稀釈液を, 薬剤を含まぬ培地に接種, 37°C 6 週培養後生菌数当りの INAH 1 mcg 耐性菌出現率及び, SM 20 mcg 耐性菌出現率を検した結果, 表 5 に示すごとく, INAH 1 mcg 耐性菌出現率, SM 20 mcg 耐性菌出現率ともに, 著明な差違をみとめることは出来なかつた。

(7) One step selection の場合における INAH 単独及び INAH-PZA 併用, SM 単独, SM+PZA 併用の場合の INAH-及び SM-耐性菌出現率

青山 B 株を使用し, 前述と同様にナス型コルベンにて, 均等菌浮游液となし, その 1 白金耳づつを, INAH 1 mcg/ml, INAH 1 mcg/ml + PZA 100 mcg/ml, SM 20 mcg/ml, SM 20 mcg/ml + PZA 100 mcg/ml を, それぞれ含有する 1% 小川培地に接種し, 10 進法による稀釈菌液 (10^{-6}) を, 薬剤を含有しない培地に接種し, one step における生菌数当りの INAH 1 mcg 耐性菌出現率, 及び SM 20 mcg 耐性菌出現率を検し, 表 6 の如き結果

表 3 PZA-SM 併用効果 (青山 B 株使用)

培地	PZA mcg/ml	SM mcg/ml									
		20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15	0.075	0
1% 小川	0	0	0	0	123	308	261	291	202	254	278
	10	0	0	0	369	299	189	187	194	144	160
	50	0	0	0	0	119	144	251	216	169	291
	100	0	0	0	0	0	0	106	123	88	130
3% 小川	0	0	0	131	75	107	220	151	245	233	249
	10	0	0	103	115	217	149	157	99	284	187
	50	0	0	2	157	244	158	Cont.	220	190	206
	100	0	0	0	189	139	95	181	232	85	148
5% 小川	0	0	97	168	281	223	350	285	305	302	259
	10	0	56	130	193	316	180	133	237	154	246
	50	0	26	108	119	144	186	154	155	173	148
	100	0	0	71	122	204	144	165	143	180	185

表 4 PZA-INAH 併用効果 (青山 B 株使用)

培地	PZA mcg/ml	INAH mcg/ml										水
		0.2	0.1	0.05	0.025	0.012	0.006	0.003	0.0015	0.00075		
1% 小川	0	0	0	0	0	36	147	221	257	274	207	
	10	0	0	0	0	36	150	177	129	217	220	
	50	0	0	0	0	1	102	141	188	Cont.	280	
	100	0	0	0	0	2	0	140	105	114	112	
3% 小川	0	0	0	0	0	68	187	230	161	179	231	
	10	0	0	0	0	23	128	306	281	278	295	
	50	0	0	0	0	4	72	241	163	236	86	
	100	0	0	0	0	0	71	82	95	79	138	
5% 小川	0	0	0	0	0	34	274	221	219	285	191	
	10	0	0	0	0	39	180	230	134	208	174	
	50	0	0	0	0	0	73	95	140	185	72	
	100	0	0	0	0	0	9	64	136	119	50	

を得た。

即ち, INAH 1 mcg 耐性菌出現率には著明な差はみとめなかつたが, SM 20 mcg 耐性菌出現率に対しては, PZA の存在する場合には低下をみとめた。

表 5

菌 株	試験管当り 接種生菌数	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	試験管当り SM 20 mcg 耐性菌数	生菌数当り SM 20 mcg 耐性菌出現率
SS+aq.	343.6×10^5	22.6	6.51×10^{-7}	5.85	1.70×10^{-7}
SS+PZA 10	161.5×10^5	9.5	5.88×10^{-7}	1.9	1.17×10^{-7}
SS+PZA 100	210.7×10^5	24.8	11.2×10^{-7}	8.15	3.86×10^{-7}
SS+PZA 200	58.0×10^5	6.4	11.2×10^{-7}	0.75	1.29×10^{-7}

表6 One step selection の場合に於ける INAH 単独及び INAH-PZA 併用, SM 単独, SM-PZA 併用の場合の INAH, SM 耐性菌出現率

薬 剤	試験管当り 接種生菌数	INAH 1mcg 耐性菌数 試験管当り	SM 20mcg 耐性菌数 試験管当り	生菌数当り INAH 1mcg 耐性菌出現率	生菌数当り SM 20mcg 耐性菌出現率
INAH 1mcg	291.4×10 ⁶	25.0	—	8.58×10 ⁻⁸	—
INAH 1mcg+PZA 100 mcg	"	7.4	—	2.53×10 ⁻⁸	—
SM 20mcg	"	—	3.0	—	34.0×10 ⁻⁸
SM 20mcg+PZA 100 mcg	"	—	0.5	—	1.33×10 ⁻⁸

考 察

(1) の実験においては, PZA は, 大量接種に対しては発育阻止作用を示さぬが, 少量接種に対しては, 発育阻止作用を示した。

第1に, 表1によれば, 接種菌数当りの出現率は, PZA 10 mcg/ml の存在する培地では, 1.03×10^{-1} , PZA 100 mcg/ml の存在する培地では, 4.5×10^{-4} , 又は 8.9×10^{-3} であり, 400 mcg/ml では, 5.09×10^{-3} であつた。この出現率を以てしては, mutant と云うことは出来ない。従つて, variant と考えられる。

第2には, 少量接種に対して発育阻止作用を示すのは(註。本来の薬剤耐性の考え方よりすれば, 薬剤による阻止濃度以下の薬剤濃度であるので), PZA に sensitive なものを, 含んでいるかも知れない。この場合には, 第1の場合の反対に, この sensitive なものが, variant と考えられ, これが培地の薬剤濃度にて, selection されたものと考えられる。この考えよりすれば薬剤を含有する培地に生えた菌は, 正常なものであるかも知れない。

要するに, 第1, 第2の考え方のいずれも肯定することも, 又否定することも出来ない。そこで更に, 培地 1,000 mcg 以上の薬剤が含有される場合が問題となつてくる。これについては, 別に検討を行う予定である。

(2), 実験2においては, culture を Electro photometer により比濁を行い, 発育曲線を検した。この場合は, 生菌数によつたのではなく, 単に, 比濁によつたものであるのでこのまま直ちに断定することは, 勿論出来ないが, 図表2より, lag phase 遅延と, Generation time の PZA による延長が想像される。これについては, 別に詳報を予定している。

PZA は, 人体及び *in vivo* においては, 一応その作用をみとめられているが, 中性培地においては, 低濃度における発育阻止作用はみとめられていない。勿論, 基礎実験のみで臨床に直ちに適用は出来ないけれども, *in vitro* でほとんど無効なものが, *in vivo* で有効であることは, 一見奇異の感をいだかさせる。しかるに, 培地 pH を変えた場合, 酸性培地においては, 著明な発育阻止作用を示す⁸⁾と云われている。われわれは, adaptation を予想し, これを追試し, PZA の作用機作を明ら

かにする目的にて実験(3)を行つたが, 1% (pH 7.0), 3% (pH 6.5), 5% (pH 6.0) において, 発育阻止に差異をみとめなかつた。

次に考えられるのが, SM 又は INAH と, PZA との併用効果である。加うるに pH の差異による効果が考えられる。この為, 実験(4), (5)を行つたが, 1% 培地で, SM-PZA の併用効果をみとめた。(註。3%, 5% では, pH が, 酸性となるため, SM の作用が減弱されるので, 1% 培地に比して, 併用効果が著明に出なかつたものと思われる。)

この結果よりすれば, INAH-PZA 併用よりは, SM-PZA 併用の方が有効であると考えられる。次に, PZA の単独使用の場合には, INAH 及び SM 耐性菌出現率は, PZA を使用しなかつた場合に較べ, 有意の差を見出すことは出来なかつた。

(a) PZA 10 mcg/ml, 100 mcg/ml, 200 mcg/ml を含有せる培地に生えた菌よりの INAH-及び SM-耐性菌は, (1) の考え方よりすると, PZA と INAH, PZA-SM の2重耐性菌であるかもしれない。

(b) 或いは, PZA に sensitive な variant が, selection されて残つた菌(正常の菌か, 又は, これも variant であるかも知れない)よりの INAH 又は SM 耐性菌であるかも知れない。

(a) (b) の2つが, 考えられるが, そのいずれとも断定することは出来ない。

INAH 単独又は, INAH-PZA 併用の場合における one step selection の INAH 耐性菌の出現率は, 有意の差を見出すことは出来なかつたが, SM 単独又は SM-PZA 併用の場合における one step selection においては, SM 耐性菌の出現率は, SM-PZA 併用の場合に比し, 出現率の低下を示している。

これは, 1% 小川培地使用にて, SM 20mcg, PZA 100mcg の条件にては, 表3により, Synergism があることが知られるが, それ相応の selection が行われる筈である。その為, 見掛け上, SM 20mcg 耐性菌の出現率が低下したものと思われる。即ち, SM 単独の場合の出現率と解するよりも, SM 及び PZA の相乗作用と考えられる要素が混入している。

結 論

(1) 1% 小川培地において、PZA は青山B株に対し、大量接種に対しては、ほとんど400 mcg/mlにおいても、発育阻止を示さないが、少量接種に対しては、発育阻止を示した。

(2) DUBOS 液体培地において、PZA は、青山B株の lag phase を遅延せしめ、generation time を延長させるものと想像せしめる発育曲線を示した。

(3) 培地 pH を 7.0, 6.5, 6.0 と変えた場合にも、PZA の作用には、何等の相違をもみとめることは出来なかつた。

(4) 1%, 3%, 5% 小川培地にて、PZA-INAH の併用効果をもとめることは出来なかつたが、SM-PZA の場合には、3%, 5% 小川培地では、有意の相違はなかつたが、1% 小川培地においては、併用効果をもとめた。即ち、PZA と SM の間に synergisms をみとめた。

(5) 1% 小川培地にて、PZA 単独使用の場合、PZA は、INAH 及び SM 耐性菌出現率に何等の影響も与えなかつた。

(5) One step selection の場合においては、INAH 単独、及び INAH-PZA 併用における INAH 耐性菌出現率には、有意の差を見出すことは出来なかつたが、SM 単独、SM-PZA 併用の場合には、SM-PZA 併用は SM 単独に比し、見掛け上の SM 耐性菌出現率の減少をみとめた。

後 記

御指導及び御校閲を賜わつた国立療養所大府荘荘長勝沼六郎博士、並びに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。尙御助言を賜わつた大府荘君野徹三博士に感謝する。本研究に当り終始御助力を賜わつた大府荘研究室 加藤千代女史、鈴木初枝氏に感謝

する。

尙本論文の概要は、31年6月日結東海地方会にて発表した。

参 考 文 献

- 1) MALONE, L., SCHUN, A.: Am. Rev. Tuberc. 65: 511, 1952.
- 2) DESSAU, F. I., *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 65: 519, 1952.
- 3) YEGER, R. L., *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 65: 523, 1952.
- 4) MCDERMOTT, W., *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 69: 319, 1954.
- 5) CAMPAGNA, M., *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 69: 334, 1954.
- 6) TARSHIS, M. S. & WEED: Am. Rev. Tuberc. 67: 391, 1953.
- 7) SOLOTOROVSKY, *et al.*: Tr. Thirteenth Conference on the chemotherapy of tuberculosis, St. Louis Missouri February 8-11, 1954. (11) より引用.
- 8) 三浦, 東村: J. Antibiotics, Ser. B. 掲載予定.
- 9) MCDERMOTT & TOMPSETT.: Am. Rev. Tuberc. 70: 748, 1954.
- 10) 長沢潤, 他: 最新医学. 10: 237, 1955.
- 11) 熊谷岱蔵, 他: 日本臨床結核. 14: 839, 1955.
- 12) DESSAU, F. I., YEAGER, R. L., BARGER, F., KULISH, M.: Am. Rev. Tuberc. 65: 635, 1952.
- 13) PHILLIPS, S., LARKIN, J. C.: Am. Rev. Tuberc. 69: 443, 1954.
- 14) 坂本, 他: 日本臨床結核. 14: 845, 1955.
- 15) HARRY, J., ROBINSON, *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 70: 423, 1954.
- 16) SCHWARTZ & MOYER: Am. Rev. Tuberc. 70: 413, 1954.
- 17) WILLIAM, S., *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 70: 367, 1954.
- 18) MUSCHENHEIM, C., *et al.*: Am. Rev. Tuberc. 70: 743, 1954.