

ヒドロンスンの SM-, INAH-, PAS-耐性発現に及ぼす影響

三浦幸二・林 光男・安保 孝

国立療養所大府荘 (指導: 荘長 勝沼六郎博士)

(昭和 31 年 11 月 20 日 受付)

吾々研究室の君野¹⁾は、*M. avium* を用い耐性菌が他の抗結核剤に対して、2重耐性を得る難易の点より、Isonicotinic acid hydrazide (以下 INAH と記載) 耐性菌は streptomycin (以下 SM) 耐性となりにくいことを報告した。其の後、東村等²⁾は *M. avium* より分離した INAH 耐性菌の viability duration の減少を報告し、その為に *M. avium* に於て、INAH 耐性菌より SM 耐性となりにくいのであると決論を下した。然るに、東村等³⁾は、人型結核菌に於ては、耐性菌の出現率は、いづれの薬剤への変異によつても影響されないことを認めた。著者⁴⁾は、人型結核菌 INAH 耐性菌の viability duration の減少を認めなかつた。又⁵⁾人型結核菌に於ける 2重耐性菌出現率よりみて、SM-INAH 2重耐性菌の出現率は、理論値と実測値に一致を認めたが、これより考えても、人型結核菌 INAH 耐性菌が SM 耐性に、特になり易いとは考えられなかつた。Hydronsan は、INAH と Glucuronsan との複合体である関係上、Hydronsan の発育阻止作用は、INAH 相当量に應ずるものであることは、当然期待出来ることであるが、Glucuronsan そのものの発育阻止作用、及び INAH と併用時に於ける作用が当然考えられ、Hydronsan 耐性となつた場合、SM 耐性になりにくい事も予想される。この点を検討する目的にて、本研究を行つた。

実験材料

使用菌株: 人型結核菌青山 B 株を使用した。

使用培地: 1% 小川(辰次)培地を使用した。グルタミン酸ソーダ 1.0g, 第 1 磷酸カリ 1.0g, 蒸留水 100 ml を基液とし、これに卵液(無精卵) 200 ml, グリセリン 6.0 ml, 2% マラヒット緑 6.0 ml を加え、中試験管に 10 ml ずつ分注、85°C 1 時間凝固滅菌した。

使用薬剤: SM は Dihydrostreptomycin sulfate で協和醸酵会社製、PAS は Sodium paraaminosalicylate で田辺製薬会社製、INAH は Isonicotinic acid hydrazide で第一製薬会社製、Hydronsan (以下 INHG-Na と記載) は、Sodium glucuronate isonicotinyl hydrazine で、中外製薬会社の厚意に依るものである。

各薬剤は、所定濃度に凝固滅菌前に、培地に加えられた。

実験方法及び成績

(1) INAH と INHG-Na との発育阻止作用の比較
培地は 1% 小川培地を使用し、各系列の 1 本目の薬剤濃度を INAH, INHG-Na とともに、最終濃度 1 mcg/ml とし、14 本目まで倍數稀釈とし、最後の 1 本のみ薬剤を加えなかつた。

INAH の稀釈系列、INHG-Na の稀釈系列とも、保存せる青山 B 株より、ナス型コルベンを使用し、約 1 mg 菌(湿菌量)を調製し、その生理的食塩水の稀釈菌液 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} を、それぞれ接種、37°C 4 週後成績を判定した。

INAH の青山 B 株に対する発育阻止作用は、第 1 表の如く、少量接種に対しては、INAH 0.015 mcg/ml で完全阻止を示したが、大量接種に対しては、INAH 1 mcg/ml に於ても、數集落の生育を認めた。INHG-Na の発育阻止作用については、第 2 表の如く、少量接種では INHG-Na 0.007 mcg/ml ~ 0.03 mcg/ml で完全阻止を示し、大量接種に於ても、0.06 mcg/ml で完全阻止を示した。Hydronsan の阻止作用は INAH 相当量に應ずるものと思われる。

(2) PAS と INHG-Na 併行について

実験(1)と同様にして調製せる INAH と INHG-Na との各稀釈系列に、PHS を、それぞれ 0.25 mcg/ml, 0.1 mcg/ml, 0.05 mcg/ml, 0.01 mcg/ml 及び 0 mcg/ml を加え、青山 B 株を同量ずつ接種し、37°C 6 週培養後判定した。

PAS-INHG-Na の併用は第 3 表、PAS-INAH の併用は第 4 表に示す通りで、PAS-INHG-Na の場合とくに、併用効果が、見掛け上劣るように見えるのは、INHG-Na の発育阻止作用が、INAH 相当量に應ずる為と思われる。

(3) INAH, INHG-Na の one step selection による耐性菌出現率について

保存せる青山 B 株をナス型コルベンにて振盪、生理的食塩水にて懸濁し、均等菌浮遊液となし、その菌液を、INAH 1 mcg/ml, INHG-Na 1 mcg/ml を、それぞれ含有する 1% 小川培地に、それぞれ等量ずつ接種し、その 10 進法による均等菌浮遊液を、薬剤を含有しない培地に接種して、接種生菌数当りの INAH 1 mcg 耐性菌出現率及び INHG-Na 1 mcg 耐性菌出現率を検討したが、

第 1 表 INAH の 発 育 阻 止 作 用

試験管 系 列	接種 菌量	INAH mcg/ml														
		対照	.00011	.00022	.00045	0.0009	0.0017	0.0035	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0
1	10 ⁻⁴	卅	723	302	391	278	207	201	63	0	0	0	0	0	0	0
2	10 ⁻³	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	347	0	0	0	0	0	0
3	10 ⁻²	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	127	0	0	0	0	0
4	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	298	5	3	5	5
5	10 ⁰	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	71	19	19	29	20

但し 卅 : 大部分が孤立しているが、融合しているものもある。
 卅 全部の集落が融合している。

第 2 表 INHG-Na の 発 育 阻 止 作 用

試験管 系 列	接種 菌量	INHG-Na mcg/ml														
		対照	.00011	.00022	.00045	0.0009	0.0017	0.0035	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0
1	10 ⁻⁴	++	1	3	6	3	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10 ⁻³	++	++	++	++	++	++	++	++	29	0	0	0	0	0	0
3	10 ⁻²	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	0	0	0	0	0	0
4	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	++	0	0	0	0
5	10 ⁰	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	0	0	0	0

第 3 表 PAS, INHG-Na 併用効果 (青山B株使用, 6週判定)

試験管 系 列	PAS mcg/ ml	INHG-Na mcg/ml														
		対照	.00011	.00022	.00045	0.0009	0.0017	0.0035	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0
1	0.25	45	22	22	34	19	52	52	37	29	26	0	0	0	0	0
2	0.10	38	42	21	33	36	43	42	42	33	20	0	0	0	0	0
3	0.05	23	21	cont.	40	55	29	40	cont.	47	12	0	0	0	0	0
4	0.01	30	22	59	0	58	43	38	47	44	15	1	0	0	0	0
5	0	61	37	48	50	72	63	48	50	38	24	0	0	0	0	0

第 4 表 PAS, INAH 併用効果 (青山B株使用, 6週判定)

試験管当り 接種菌数	INAH PAS	1.0	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.0075	0.0037	0.0018	0.0009	0.0045	0.0022	0.0011	0
		45.8	0	0	0	0	0	0	0	8	39	38	46	43	41	37
"	0.01 mcg	0	0	0	0	0	0	34	61	cont.	80	50	56	47	51	72
"	0.05 mcg	0	0	0	0	0	0	14	52	62	42	32	30	27	28	45
"	0.10 mcg	0	0	0	0	0	0	7	46	46	50	48	42	28	63	68
"	0.25 mcg	0	0	0	0	0	0	7	38	37	31	48	44	40	40	50

第 5 表 INAH, INHG-Na の One step selection
 による耐性菌出現率

試験管当り 接種菌数	INAH 1mcg 耐性菌数	INAH 1mcg 耐性菌出現率
26.3×10 ⁶	67.3	2.54×10 ⁻⁶
	INHG-Na 1mcg 耐性菌数	INHG-Na 1mcg 耐性菌出現率
26.3×10 ⁶	74.2	2.82×10 ⁻⁶

(青山B株使用)

第 6 表

使用菌株	試験管当り 接種菌数	SM 20mcg 耐性菌数	SM 20mcg 耐性菌出現率
AINR 1mcg	15.0×10 ⁵	5.05	3.36×10 ⁻⁶
AINGR 1mcg	13.4×13 ⁵	0.25	1.86×10 ⁻⁷

但し AINR 1mcg : INAH 1mcg One step selection により得られた耐性株
 AINGR 1mcg : INHG-Na 1mcg One step selection により得られた耐性株

第5表に示すごとく、INAH 1 mcg 耐性菌出現率は 2.54×10^{-6} 、INHG-Na 1 mcg 耐性菌出現率は 2.82×10^{-6} で、両者の間に相違を認めなかつた。

(4) INAH 及び INHG-Na の one step selection による、それぞれの 1 mcg 耐性菌よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率について

INAH 1 mcg one step selection により得られた耐性株、及び INHG-Na 1 mcg one step selection により得られた耐性株を、それぞれ別々に、ナス型コルペンにて振盪、均等菌浮遊液を調製し、SM 20 mcg/ml を含有する培地に接種し、又、その菌液の 10 進法による希釈菌液を、薬剤を含有しない培地に接種し、それぞれ生菌数当りの SM 20 mcg 耐性菌出現率を検討するに、第6表の如く、AINR 1 mcg の場合には、SM 20 mcg 耐性菌出現率は 3.36×10^{-6} で、AINGR 1 mcg の場合には、 1.86×10^{-7} であつた。即ち、INHG-Na による one step selection の耐性株の場合に、やや出現率が低下する傾向を認めた。

(5) Glucuronsan による菌発育阻止作用

青山B株より、ナス型コルペンにて均等菌浮遊液を調製し、INAH 1 mcg/ml を含有する培地、及び INHG-Na 2.5 mcg/ml を含有する培地に、それぞれ等量づつ接種し、又その菌液より 10 進法により調製した均等菌浮遊液を、Glucuronsan 1.5 mcg/ml を含有する培地及び薬剤を含有しない培地に、それぞれ等量づつ接種し、37°C 4 週培養後判定した。

その成績は、第7表の如く、接種生菌数当りの Glucuronsan 1.5 mcg 培地生育菌数の百分率は 42.8% であり、僅かに発育阻止を認めた。又、接種生菌数当り INAH 1 mcg 耐性菌出現率は 2.90×10^{-6} で、接種生菌数当り INHG-Na 2.5 mcg 耐性菌出現率は 3.46×10^{-6} で、両者の間に差違を認めなかつた。

(6) Glucuronsan の SM-, INAH-耐性菌出現率に及ぼす影響

青山B株、及び Glucuronsan 1.5 mcg/ml を含有せ

第 7 表

試験管当り 接種生菌数	Glucuronsan 1.5 mcg/ml 培地生育菌数	接種生菌数当り Glucuronsan 1.5mcg 培地生育菌数の百分率
60.9 × 10 ⁶	26.1 × 10 ⁶	42.8%
	INAH 1 mcg/ml 培地生育菌数 17.7	接種生菌数当り INAH 1 mcg 耐性菌出現率 2.90×10^{-6}
	INHG-Na 2.5 mcg/ ml 培地生育菌数 21.1	接種生菌数当り INHG-Na 2.5 mcg 耐性菌出現率 3.46×10^{-6}

る小川培地に生育せる青山B株を使用し、それぞれ別々に、ナス型コルペンにて、均等菌浮遊液を調製し、それぞれ等量づつ SM 20 mcg/ml 含有培地及び INAH 1 mcg/ml 含有培地に接種し、又それぞれの菌液の 10 進法により生理的食塩水稀釈液を、薬剤を含有しない培地に接種し、それぞれ生菌数当りの SM 20 mcg 耐性菌出現率及び INAH 1 mcg 耐性菌出現率を検討した。成績判定は 37°C 4 週培養後に行つた。

その成績は、第8表に示すごとく、Glucuronsan 1.5 mcg/ml 含有培地に生育した青山B株も、薬剤を含有しない培地に生育した青山B株も、ともに SM 20 mcg 耐性菌出現率には、差違を認めなかつた。

第 8 表

使用 菌株	試験管当り 接種生菌数	試験管当り SM 20mcg 耐性菌数	生菌数当り SM 20 mcg 耐性菌出現率
A	91.1 × 10 ⁶	23.9	2.62×10^{-7}
AG	91.1 × 10 ⁶	58.5	6.48×10^{-7}
		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
A	91.1 × 10 ⁶	247.5	2.71×10^{-8}
AG	91.1 × 10 ⁶	52.5	5.78×10^{-7}

A : 青山B株。

AG : Glucuronsan 1.5 mcg/ml 含有培地に生育した青山B株。

然し、INAH 1 mcg 耐性菌出現率については、Glucuronsan 1.5 mcg/ml 含有培地に生育した青山B株の場合には、INAH 1 mcg 耐性菌出現率が少々低下するのを認めた。

考 察

INAH と INHG-Na の発育阻止作用を比較すると、少量接種では INAH 0.015 mcg/ml で完全阻止を示し、INHG-Na では 0.007 mcg/ml ~ 0.03 mcg/ml で完全阻止を示した。INHG-Na の INAH 相当量は約 40% であるので、INHG-Na の発育阻止作用は INAH 相当量に及ぶものと思われる。然し、大量接種の場合、INAH では 1 mcg/ml でも数集落の発育を認め、INHG-Na の場合に 0.06 mcg/ml で完全阻止を示したのは、第1に、INAH の場合には接種菌量が多く、INHG-Na の場合には、少なかつたのか、第2に、INAH と Glucuronsan の併用の為であつたのかも知れない。即ち、INAH で selection された残りの菌に Glucuronsan が作用し、発育を阻止したのかも知れない。この点、更に検討を要するものと思われる。

吾々⁶⁾は、PAS-INAH の併用効果は、単に additive なものであることを報告したが、INHG-Na の場合には、Glucuronsan が添加される為、PAS-INAH 併用以上の効果を期待したが、吾々の実験条件下では、PAS-

INAH 併用の場合の additive な作用以上の効果を見出すことは出来なかつたが、実験 (3) に於て、INAH, INHG-Na の one step selection による耐性菌出現率には相違を認めなかつたが、one step による INHG-Na 1 mcg 耐性株よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率は、one step selection による INAH 1 mcg 耐性株よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率より、やや低下するのを認めた。これは実験 (6) の Glucuronsan 含有培地に生育した青山 B 株よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率が、薬剤を含有しない培地に生育した青山 B 株よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率に比較して相違のなかつたことは、一見矛盾した結果であるが、INHG-Na の作用は、単に INAH と Glucuronsan を添加しただけのものではないかもしれない。

実験 (5) の Glucuronsan の菌発育阻止作用は、ごく僅かであつたが、Glucuronsan 1.5 mcg/ml 含有培地に生育した青山 B 株よりの INAH 1 mcg 耐性菌出現率は、薬剤を含有しない培地に生育した青山 B 株に比して、INAH 耐性菌出現率が、やや低下したが、有意の差を見出すことは出来なかつた。

総 括

- 1) INHG-Na の青山 B 株に対する発育阻止作用は、INAH 相当量に應ずるものであつた。
- 2) PAS-INHG-Na の併用は、PAS-INAH 併用の場合と同じく、単に additive なものであつた。
- 3) INAH, INHG-Na の one step selection による耐性菌出現率は、INAH, INHG-Na の場合も、差違を認めなかつたが、INAH-Na 1 mcg one step selection により得られた耐性株よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率

は、INAH 1 mcg one step selection により得られた耐性株よりの SM 20 mcg 耐性菌出現率より、やや低下する傾向を認めた。

4) Glucuronsan の添加により、菌の発育に僅かに阻害を認め、Glucuronsan 1.5 mcg/ml 含有培地に生育した青山 B 株よりの INAH 1 mcg 耐性菌出現率は、薬剤を含有しない培地に生育した青山 B 株よりの INAH 1 mcg 耐性菌出現率より、やや低下する傾向を認めた。

御指導並びに御校閲を賜つた国立療養所大府荘長 勝沼六郎博士、及び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。

本論文の要旨は、第 11 回厚生省医務局医学会総会に於ける、総会発表にて報告した。

参 考 文 献

- 1) 君野徹三 2重耐性に関する研究。J. Antibiotics, Ser. B. 7 (3): 93~95, 1954.
- 2) TSUKAMURA, M., MIURA, K., & SUZUKI, R.: A Study on the viability of isoniazid-resistant *Mycobacterium avium*. J. Antibiotics, Ser. A. 9 (4): 132~134, 1956.
- 3) TSUKAMURA, M., MIURA, K., & NODA, Y.: Studies on the drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. (Annual report of tuberculosis. in press.)
- 4) 三浦幸二: 人型結核菌 INAH 耐性菌の viability について。(結核掲載予定)
- 5) 三浦幸二, 林光男: One step selection による抗結核剤への耐性発現について。(結核掲載予定)
- 6) 三浦幸二, 安保孝, 東村道雄 人型結核菌に於ける INAH 耐性発現に対する PAS の作用機作。Chemotherapy 4 (6): 349~351, 1956.