

3種併用効果の基礎実験

Streptomycin, PAS および Isoniazid を同時に併用せる

培地環境に継代せる結核菌の研究

第1報 主として耐性上昇過程について

国立予防衛生研究所 (部長 柳 沢 謙)

宮 本 泰・上 野 一 恵

(受付 昭和 30 年 7 月 9 日)

Isoniazid の発見が報ぜられた当初、このものと Streptomycin(SM), PAS との種々な組合せの方向へ、治療と研究の指針が向けられて行くことが予見され、このことを報じた¹⁾が、現在、結核の化学療法は併用療法の時代に入った。化学療法の現在のこのような様式も、それは、いずれ、次の時代のさらに進歩した治療法へ移行行くまでの過渡的な段階にあるものかも知れないが、現在はこの様式の中で、一応の体系付けが完了するまで、個々の基礎的知識の集積と検討が行われて行く時代である。この研究もそのような基礎研究の一つとして行われた。本研究はあくまでも試験管内実験であつて、その成果を *in vivo* の側へ投影するに当つては慎重さを必要とし、また多くの修飾を受けるべきことは不可避と思われるが、それにもかかわらず、本実験の計画と遂行に当つては、臨床上の諸因子との関連を最初からすくなくからず考慮の中に入れたことは否めない。本研究では、*in vitro* で併用を行う場合の耐性上昇過程を追究することを主眼とし、しかも、単独ならびに2種併用の場合を参照しつつ、3種併用の場合の追究に主力を注いだ。

実験方法

使用菌株ならびに培地：H₃₇Rv 株、H₃₇RvR株(いずれも Dr. A.G.Karlson より分与された人型菌保存菌株。後者は SM 1000 γ 耐性株)、H₂ 株 (伝研より予研に分与された人型菌保存株)、BCG 以上の4菌株の小川培地(1%第1磷酸加里培地)上の培養14~21日目の菌塊を採り、水晶球入り肉厚丸底コルベン中に入れて型の如く滅菌蒸留水を加えて摩砕し、1mg/ml の均等菌液を調製した。この菌液の 0.1ml 宛を3薬剤加 Kirchner Sy-Ser 液体培地 (以下 K-培地) 5ml 宛の系列に接種し、培養3週後に肉眼的に発育を認める最高濃度の試験管底より菌塊をとり、小川培地上に発育せしめる。この代、または菌量すくなく場合はさらに一代小川培地に増菌を行つた次代の菌群より菌液を作り、再び3種薬剤含有K-培地の系列に植える。すなわち K-培地→小川培地→K-

培地の如く、中間に増菌のため小川培地を挿入しながら3種薬剤含有 K-培地を以て継代を繰返しつつ、発育の限界を次第に薬剤の高濃度の方へ上昇せしめるように努めた。各薬剤別の感受性ならびに3種薬剤併用環境に対する感受性はともに、すべて K-培地を用いて調べた。

培地に含ませた薬剤：K-培地に同時に含ますべき3種薬剤の濃度の組合せは、各試験管共、3種薬剤 Streptomycin(SM), PAS, Isoniazid に関して同一の濃度を含むような組合せ系列を採用した。すなわち、予めこれら3薬剤を等濃度含むように滅菌蒸留水にて薬液濃度階級を作り、このものの 0.5ml (その中に3薬剤を等量含む) を 4.5ml の K-培地を加え、全量 5.0ml になるように薬剤含有培地を調製した。その濃度段階は次のようである。0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 γ /ml/SM, PAS, INH, すなわち1本の培地に SM, PAS, INH の等量をそれぞれ上記の濃度含む如き系列である。比較のために採用した SM, PAS, INH それぞれの単独および SM+INH ならびに INH+PAS の2種薬剤を含む培地での継代の系列には、同様にそれぞれ次の如き濃度段階を採用した。SM+INH では INH を一定濃度 0.1 γ に定め、加うべき SM を 0.1, 0.5 γ /ml の2種類に定め、また INH+PAS では INH の濃度を 0.05 γ および 0.025 γ とし、之に対して加うべき PAS の濃度は INH 0.05 γ には 0.1, 0.25 γ /ml の2種類とし、又 INH 0.025 γ には 0.5 γ /ml とした。なお、3種併用の実験系列では、4菌株のそれぞれを初代の K-培地に接種するに当つては、SM, PAS, INH の3種薬剤に関して 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 γ /ml の濃度の3つずつの組合せのすべてを作り菌を接種した。

各代における発育限界の判定：培養2週および3週の K-培地における発育を読み、3週の最高発育許容濃度を採用した。肉眼により管底にあきらかに発育集落を認める場合に、その発育程度の如何にかかわらず、その濃度を以て判定値として、まぎらわしい沈澱は発育と認めない。

継代株の菌力試験：3種併用の培地環境に継代11代を経過せる H₃₇Rv 株につき、この株の INH 耐性の性質に関連して、モルモットの皮下接種法による菌力のテストを行った。体重 450~500g のモルモット 5 匹を選び、1 匹当り 0.1mg 湿菌相当量を右下腹部皮下に接種し、6 週後に剖検し、肉眼的結核病変を検した。比較のため、同じ母株の H₃₇Rv 株より INH 含有小川培地上に分離した 5 コの INH 耐性株 (one-step mutants) を、それぞれ 3 匹宛のモルモット計 15 匹に、同一菌量、同時に接種して 6 週後に剖検、比較を行った。

継代株のカマナーゼ反応検査法：K-培地の管底より小川培地上に分離発育せる集落につき、直接 Oxydol

(30% H₂O₂ 水) を注ぎ、酸素の泡沫発生を盛んに認めるものを陽性とし、全く認めぬ場合を陰性とした。

実験成績

3種併用、2種併用および薬剤単独の培地環境に継代せる各菌株の感受性の推移：3種併用の実験系列で、H₃₇Rv 株は 14 代まで、他の 3 株は 7 代まで追究し、これに対して単独および 2 種併用の系列は 8 代まで追究して比較を行った。これらの成績を表 1 ならびにその一部の成績の比較を図 1 に示した。各代において、その時々の実験条件に左右されるための多少の変動は認めるが、H₃₇Rv 株では全期間を通じ、3 種薬剤を共に 0.5Y 以上含

む環境には遂に発育を示さず、6 代目の値以外は、すべて 0.25Y 以下の低い値にとどまった。この傾向は他の 3 菌株についても全く同じであつた。単独、2 種併用継代の成績は、表 1 に示す如く、SM、INH では、単独で 6~8 代迄にすでに 100Y 以上の高耐性を、また PAS では比較的低い 1Y 以上の耐性が生じた。2 種併用のうちの INH+SM では、単独の場合と同様に INH 耐性は徐々に上昇して、8 代目には 100Y 以上の高耐性の

出現を見る。ただ、INH+PAS の併用では、INH 耐性の出現は併用する PAS の量に比例して著しく阻止され、PAS の最低量 0.1Y の系列においてのみ INH に対して 1Y の耐性値を示したが、他は感受性の水準にとどまつた。

3 種薬剤を併用せる培地環境に継代した菌株の各薬剤別の感受性：前項に示したように、継代の全期間を通じて、3 種併用環境に対する見掛けの耐性の発現は強力に阻止され、菌株によりそれぞれ相加的ないし相乗的なる薬剤の協同作用が認められたが、これら菌株の感受性を各薬剤別に調べて見ると、表 2 の如く、菌株により異なるが、H₃₇RvR 株以外はいずれも 3 薬剤のうちの 2 種類に対する耐性が生じており、残り 1 種に対しては感受性が保たれていることが判つた。しかして 3 種併用の環境に対する見掛けの感受性の維持は、この 1 種類の薬剤の効果のためであることも判明した。表 2 において、H₃₇Rv

表 1 3種薬剤 SM, PAS, INH の等濃度を併用せる培地環境および 2種併用環境に継代せる各菌株の最高発育許容濃度の推移

継代数	3種併用					2種併用						
	SM・PAS・INH					INH 0.1Y		INH 0.05Y		INH 0.025Y		
	H ₂	BCG	H ₃₇ Rv		H ₃₇ RvR	SM		PAS		PAS 0.5Y		
			0.1Y	0.5Y		0.1Y	0.25Y					
1 9	0	0	※ 0	※ 0.25	0	INH 0.1	INH 0.1	INH 0.05	INH 0.05	INH 0.025		
2 10	0	0	0.05	0.25	0.1	0.1	0.1	0.1	0.025	0.025		
3 11	0.05	0.1	0.1	0.1	0	1	0.1	0.1	0.05	0.025		
4 12	0	0.1	0.25	0.1	0.1	1	1	0.1	0.05	0.025		
5 13	0.05	0.25	0.1	0.1	0	5	1	0.5	0.05	0.05		
6 14	0	0.1	0.5	0.25	0.1	10	10	0.5	0.1	0.05		
7	0.05	0.5	0.25		0.1	10	10	0.5	0.1	0.05		
8			0.25			100	100	1	0.1	0.05		

3種併用の欄の数値は H₃₇Rv (1代~14代)、H₂, BCG, H₃₇RvR (以上は 1代~7代) の 3種併用環境に対する感受性の推移を示す
 † 2種併用の欄の数値は H₃₇Rv 株につき 1代より 8代に至る INH に対する感受性の推移を示す
 ※左列は 1代~8代 ※右列は 9代~14代

図 1 3種薬剤 SM, PAS, INH の等濃度併用環境ならびにこれら等薬剤単独の培地環境における継代において、これらの環境に対する感受性の推移

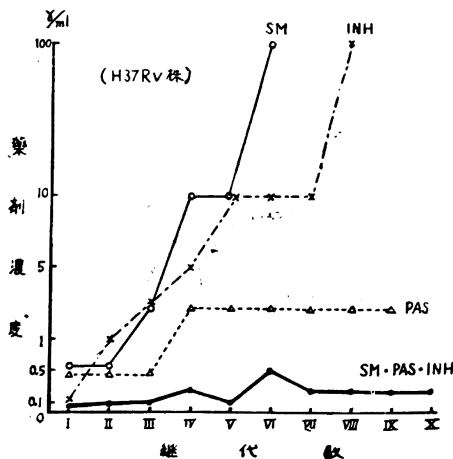


表2 3種併用環境に継代された結核菌の薬剤別感受性ならびに3種および2種併用環境に対する感受性

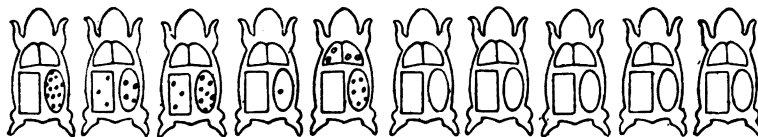
環境の種類	3種併用			2種併用				
	SM・PAS・INH	SM	PAS	INH	SM・INH	INH・PAS	SM・PAS	
菌	H ₃₇ RvR	0.01	1000	0.05	0.01	—	—	—
	H ₂	0.05	1.0	0.1	1.0	—	—	—
株	H ₃₇ Rv	0.25	0.5	25	10	0.5	2.5	0.5
	BCG	0.25	0.25	5	50	—	—	—

H₃₇Rv 株は継代7代目,他の株は5代目の成績

株の7代目の成績を見ると, SMの関与する組合せの場合にのみ一様に感受性水準が保たれる。すなわちこの株では SM 感受性が維持され, INH, PAS はそれぞれ 10Y および 25Y の耐性を示した。表2に見る如く, 以上と同じ傾向を示す株は BCG であり, 感受性の主役を演ずるのは SM であつて, PAS, INH はそれぞれ 5Y および 50Y の耐性を示した。以上と異なるのは H₂ 株であつて, これでは PAS の感受性が維持され, これに反して SM および INH は中等度の耐性の出現を見た。しかして3種併用環境では, PAS のために感受性の水準まで引き下げられる。また, 最初より 1000Y 耐性の H₃₇RvR 株は, INH, PAS 共に感受性を維持しつづけたことは興味深い。この株では, 3種併用環境で高度の感受性水準が示され, かつ SM 耐性の高度なるため, 相対的には著名な相乗作用が示された。

3種併用の培地環境に継代せる H₃₇Rv 株のモルモットに対する菌力および本菌株の catalase 反応: INH 耐性結核菌は時に catalase の脱落し, モルモットに対する病原性の減弱ないし消失を来すことが報ぜられているので, 継代せる H₃₇Rv 株につき検査を行つたが, 試み

図2 3種併用環境に継代された H₃₇Rv 株のモルモットに対する菌力(左側)。右側は INH 含有小川培地上に分離せる H₃₇Rv-INH 耐性株(one-step mutants)の菌力 (Feldman-Hinshow 氏図示法による)



た範囲内でいずれの集落も catalase 反応は陽性であり, モルモットに対しては図2に見る如く中等度の菌力を示した。

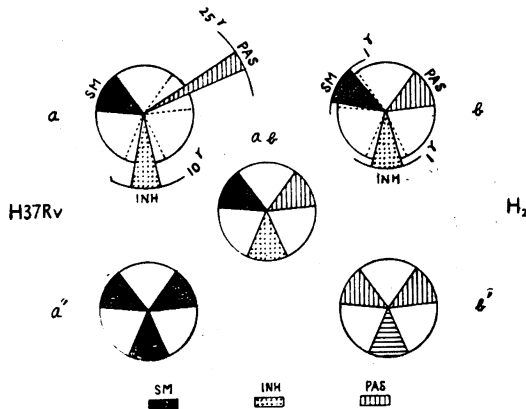
3種併用環境, INH 単独, または INH+PAS, INH+SM なる2種併用環境に継代せる H₃₇Rv 株の INH 感受性が小川培地(卵培地)と Kirchner 培地(血清加合成培地)とでことなる現象について: 3種併用 K-培

地に継代せる H₃₇Rv 株は INH に対して 10~25Y 耐性を示したことを述べたが, この値は Kirchner 液体培地または Kirchner 寒天培地を用いて INH 感受性検査を行つた成績である。これを小川培地を用いて行くと, 発育が見られるのは対照培地 (0Y) と 0.05Y の培地のみであつて, 見掛け

上 INH 感受性を示した。すなわち INH 含有小川培地上では, INH 含有 K-培地上には発育して来る INH 耐性菌が発育して来ないようである。INH 耐性菌の特殊な発育要求のために, 両培地間の growth factor のちがいがこの差を起させるものと考えられるが, この因子が Fisher²⁾ の指摘した Hemin か, Schaeffer³⁾ の実験の示す如く α-ケート酸類か, または Cohn および Middlebrook⁴⁾ の実験に見られる Fe イオンか, あるいは未知の他の物質との関連があるのかについて, 目下研究を行いつゝある。この現象は INH のみの各段階濃度を含ませた K-培地系列で同様に継代された H₃₇Rv 株についても見られ, また INH+PAS, INH+SM なる2種併用環境での継代においても得られた。すなわち, 本現象はこのような継代法によつて INH 耐性を生じた菌群に一様に見られる現象であることが判つた。

Population size と, それぞれが荷う薬剤感受性に関する phenotype を模型的に図示する試み: 以上の実験成績, すなわち, 構成 population の3種薬剤に対する感受性に関して, それらの一定の大きさの population が, 質的にことなる種類の phenotype を保有し, しかもそれらの phenotype のそれぞれが, 種々なる程度の感受性の序列に対応して, 連続的に配列される状態を模型的に図示することを試みた。図3において円形は感受性領域を現わし, 円の中心よりの距りは感受性ないし耐性の程度を示す。便宜上扇形に囲まれる面積を以て population size を代表せしめると, 中心より扇形の弧に至る半径は感受性ないし耐性の上限を示す。図中点線にて描かれた半径と円弧によつて囲まれる扇形は, 3種併用環境の下における population の分布域に相当し, 薬剤単独の環境の下では耐性領域に属していた population が, 3種併用によつて感受性領域に編入されるために生ずる感受性領域の面積 population size の拡大を示す。それ

図3 構成 population phenotype に関する分布模型



ab: 感受性原株 ($H_{37}Rv$, H_2) の各薬剤別感受性 phenotype の分布

a, b: 3種併用環境に継代された2菌株の各薬剤別耐性並びに感受性 phenotype の分布

a..... $H_{37}Rv$, b..... H_2

a', b': 3種併用環境に継代された2菌株の3種併用環境に対する感受性 phenotype の分布。

a'..... $H_{37}Rv$, b'..... H_2

はまた、ab) 即ち継代前の原株の感受性 population の size とも一致する。図に見る如く継代後の $H_{37}Rv$ 株と H_2 株とは phenotype に関して a と b 或いは a' と b' の如く互にことなる類型の二つであることが判る。

考 察

SM, PAS, Isoniazid の3薬剤に関する in vitro の併用効果のうちで、SM と PAS の併用による増強効果については、諸家の成績^{5,6,7)} はすでに一致を示している。しかし、Isoniazid が関与する組合せの効果については、必ずしもそうではない。また、併用効果の試験管内実験は多くは一代限りの観察で、殺菌ないし発育抑制の点のみについて触れ、数代にわたる観察を行った例はすくない。併用効果の詳細な分析を行った例は結核菌に関する限り未だこれを見ない。3種併用による発育抑制に関して、Coletsos⁸⁾ は Löwenstein-Jensen 培地ならびに Youmans 培地を用いて、組合せの中でも最も著しい併用効果がみられた SM・PAS の相乗作用が、INH の添加によつて変りなきことを認め、それは PAS・INH の組合せによる併用効果が相加的である一方、SM・INH の併用が互に“*asynergie* であるため”と述べている。発育抑制に関する以上の2種併用の所見は、私達が本実験で行つた継代による耐性上昇抑制に関する2種併用の所見と偶然にも一致を示す。今村・堀⁹⁾の成績、および堂野前・河盛¹⁰⁾の成績も、継代による耐性出現阻止の点における INH, SM の非協力作用を

指摘する点でわれわれの成績に近い。そして2種併用の内では SM・PAS併用を最も強力なものとしている。これに反して、SM・INH の協同作用を認める成績は、概して Tween 80 を培地に使用した場合であつて、Ilavsky¹¹⁾, Mackaness & Smith¹²⁾, Aitoff¹³⁾, Singh & Mitchison¹⁴⁾, 海老名および高階¹⁵⁾, Hobby¹⁶⁾らの成績がそれである。K-培地でも上野¹⁷⁾は両薬剤の適当な濃度の組合せの場合に効果を認めているが、実験条件が殺菌試験の条件であるため比較の基準を異にする。次に PAS・INH の併用に関して、Coletsos⁸⁾, 堂野前¹⁰⁾らは相加的発育抑制効果を、また上野¹⁷⁾, Aitoff¹³⁾は2種薬剤の組合せ中最も著しい殺菌作用の増強を認めたが、さらに本実験において、SM・INH の場合に反して継代による耐性の発現阻止に対しても、添加される PAS の量に比例する顕著な協力作用を認め、耐性の発現を見なかつたことは注目すべきである。

3種薬剤 SM, PAS, INH の in vitro における併用効果に関しては、発育抑制の効果について、前述の如く Coletsos⁸⁾はその効果が SM・PAS 以上に出でないことを述べ、継代による耐性の発現阻止効果の点では、海老名・芦野¹⁸⁾が同様に、3種併用が SM・PAS と同程度に最も有効であることを指摘した。われわれの研究により明らかにされたことは、前述のように、3種併用の効能は、単独ならびに SM・INH の組合せの場合とことなり、7代ないし14代にわたる継代にもかかわらず、各菌株共、3種共存の培地環境に対する感受性が維持され、見掛けの耐性の発現を見なかつた点にあり、しかもその機構が、3種のうちのすくなくも1種類の薬剤に対する感受性が長期にわたり保たれて行くためであることも明らかにされた。しかし一般的には、3種薬剤のうちの2種に対して、中等度ないし高度の耐性が実際には生じていて、その耐性の程度もこのように反覆継代の期間の内に曝露されている低濃度の薬物濃度にもかかわらず、その値を遙かに凌ぐ高度の耐性値を示し、そのような水準まで、その期間の内に耐性の上昇を来すことが判つた。しかしながら、他方、3種併用の条件の下では、1種類の薬剤に対する感受性が長期にわたり維持されたことは、もしこの関係が in vivo にも適用されるものならば、臨床との関連において意義のある事実と思われる。この条件の下で、すくなくも1種類の薬剤に対して長期間感受性が維持される機構については、population に関する詳細な研究成績が纏まつた上で検討される予定である。この機構について、現在考えられる構成 population に関する模型は、理論上、次の二つの可能性を想起させる。第1に、1種類の薬剤に関する感受性 population が、他の2種のそれに比べて量的に優勢な比率を長期にわたつて維持し続ける場合、第2に、3種薬剤共存の環境における見掛けの感受性という phenotype

に関して、薬剤感受性の方が薬剤耐性に対して dominant である場合である。

このように継代された $H_{37}Rv$ 株が、INH 耐性なるにかかわらず、モルモットに対する菌力の著しい減退も示さず、かつ Catalase 反応も陽性であったことは、この菌株が INH に関して感受性および耐性なる mixed population より構成されていることを暗示しているように思える。卵培地と、血清加合成培地とで INH に対する感受性の読みがことなり、前者においては見掛上感受性であり、後者では耐性であることの原因が、発育要求を異にする数種の population より構成される不均一性によつて説明されるか、あるいは、卵培地組成に加うるに INH が共存する環境では、INH 耐性菌の発育を許さない条件が形成されるのか、K-培地中の血清中の因子がそのような metabolic block を除去する役を演ずるか。その点についての検討を目下行つている。この問題はまた実際的には INH 耐性検査の問題と関連の深い課題である。

総 括

1) 3種薬剤 SM, PAS, Isoniazid 併用の培地環境に結核菌を継代する方法により、次第に耐性を上昇せしめて、発育限界濃度を次第に高い方へ移行させるように努めたが、それは不可能であつた。すなわち4菌株のすべてが、各代とも、3種薬剤共存の比較的低い濃度において発育阻止をうけた。

2) しかし、このように継代された各菌株について、薬剤別に感受性を調べてみると、一般には3種のうちのすくなくとも2種に対して、実際には耐性が生じており、他の1種に対しては感受性が維持されている。そして、3種併用環境における感受性なる phenotype は、この維持された感受性が発現されるためである。このようにすくなくとも1種類の薬剤に対して感受性が長期間維持されることは、臨床との関連において、意義のあることかも知れない。

3) 併用される3種薬剤のうちで耐性が出現する薬剤と、感受性が保たれる薬剤の種類は菌株によつても異り得る。 $H_{37}Rv$ 株、BCG では SM 感受性が、又 H_2 株では PAS 感受性が保たれ、それぞれ他の2種薬剤に対して耐性が生じた。

4) 3種併用、2種併用、単独使用のうち、INH が関与するいずれの場合でも、そのような薬剤含有の培地環境において継代された結核菌の INH 耐性の読みは、小川培地(卵培地)と Kirchner 培地(血清加合成培地)とでことなることが判明し、その原因を究明する必要に迫られた。

5) このように継代された $H_{37}Rv$ 株は INH 耐性を示したが、モルモットに対しては中等度の菌力を示し、

且つ catalase 反応は陽性であつて、INH 感受性ならびに耐性なる mixed population より構成されていることが推定された。

本研究は文部省科学研究費援助によつてなされ、結核研究班々会議に報告された。なお、第30回結核病学会総会にも一部を除き報告を行つた。拙筆に臨み御校閲を賜つた柳沢部長に謝意を表す。なお、本研究に当り、丸山米夫、岡本茂広、三浦馨、山崎久治ら諸兄の技術的助力を得たことを深謝する。

文 献

- 1) 柳沢謙・宮本泰・佐藤直行・大野フヂノ：結核研究の進歩，1，42，昭28.
- 2) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69(5), 797, 1954.
- 3) Schaeffer, W.B. : Am. Rev. Tuberc., 68(2), 273, 1953.
- 4) Cohn, M.L., Oda, U., Kovitz, C. and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70(3), 465, 1954.
- 5) Grassle, O.E. and Pietrowski, J.J. : Jour. Bact., 57(4), 459, 1949.
- 6) Vennesland, K., Ebert, R.H., and Bloch, R. G. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 68, 250, 1948.
- 7) Yegian, D. and Vanderlinde, R. J. : Am. Rev. Tuberc., 61(4), 483, 1950.
- 8) Coletsos, P.J. : Revue de la tuberculose 16(1-2), 670, 1952.
- 9) 今村荒男・堀三津夫：文部省結核研究班化学療法科会，昭和28年度第1回分科会プリント
- 10) 堂野前維摩郷・河盛勇造他：最新医学，7(12)，119，昭27.
- 11) Ilavsky, J. : Am. Rev. Tuberc., 65(6), 777, 1952.
- 12) Mackaness, G. B. and Smith, N. : Am. Rev. Tuberc., 67(3), 322, 1953.
- 13) Aitoff, A. S. M. : Acta Phthisiologica, 3, 19~22, 1952. (結核文献抄録速報，5(8)，559, 1954より転)
- 14) Sigh, B. and Mitchison, D.A. : Brit. Med. Jour., 4854, 130, 1954.
- 15) 海老名敏明・高階二郎：文部省結核研究班化学療法科会，昭和28年度第1回分科会プリント
- 16) Hobby, G.L., et al. : Am. Rev. Tuberc., 67(6), 808, 1953.
- 17) 上野高正：日本細菌学雑誌，9(9)，717, 1954, 9(11)，909, 1954.
- 18) 海老名敏明・芦野芳久：結核研究の進歩，1，119，昭28.