

p-ethylsulfonylbenzaldehyde thiosemicarbazone (PE) に関する研究

第 3 報

東京大学美甘内科

岡 野 正 光

(受付 昭和 29 年 10 月 6 日)

私は PE の基礎的並びに臨床的研究を行い、PE が抗結核剤として有効であることを報告した^{1,2)}。今回は PE の試験管内における結核菌発育阻止作用及び長期投与例における耐性菌出現について些かの知見を得たので報告する。

片倉培地を用い、集落数を測定した成績は第 2 表及び第 1 図の如くである。すなわち接種した生菌単位数は $9.5 \times 10^8/cc$ であるが、PE を含まぬ対照培地では 3 日目には $2.5 \times 10^9/cc$ 、7 日目には $5.5 \times 10^9/cc$ となり、其後も

第 1 表 H37 Rv 株の PE 感性

培地	PE γ/cc		培養期間								
	0	0.1	0.5	1	2	5	10	50	100		
Dubos	2 週	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	
		卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	
	3 週	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	
		卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	
	岡・片倉	2 週	卍	卍	+	±	-	-	-	-	-
			卍	卍	+	-	-	-	-	-	-
3 週		卍	卍	+	+	-	-	-	-	-	
		卍	卍	+	+	+	-	-	-	-	
4 週		卍	卍	卍	+	+	9	8	2	1	
		卍	卍	卍	+	+	-	-	-	-	

I PE の試験管内結核菌発育阻止作用について

〔1〕 実験方法

(A) 使用菌株

教室保存の H37 Rv 株を用いた。この菌の Dubos の Tween-Albumine 培地³⁾ 及び岡・片倉培地における PE に対する感性はそれぞれ $1 \gamma/cc$ 、 $5 \gamma/cc$ である(第 1 表)。実験には同株を Dubos 培地に継代均等培養したものを用いた。

(B) 使用培地

(i) Dubos の Tween-Albumine 培地 (pH 6.8)

(ii) 岡・片倉培地 (pH 7.0)

(C) 実験方法

H37 Rv 株の Dubos 培地 10 日培養株の $0.1cc$ を Dubos 培地 (対照及び PE 0.1, 1, $10 \gamma/cc$ 含有) $4.9cc$ に接種し、毎日 1 回振盪し $37^\circ C$ 孵卵器内にて均等培養し、各培地より培養後 1, 3, 7, 14, 21 日目にその $0.1cc$ を取り 10 倍希釈系列を作り、それぞれその $0.1cc$ を岡・片倉培地 (対照及び PE 0.1, 1, $10 \gamma/cc$ 含有) 各 2 本に接種し、発育集落数を測定した。測定は毎週 1~2 回 6 週迄集落数を数え、その最大集落数を以つて発育集落数とし、集落数の多い場合は互に癒合し計測不能となるので、10 倍希釈系列法をとることにより集落数計測に最適の希釈範囲で集落数を測定した。これにより全生菌単位数 (viable unit) 及び菌の薬剤耐性度分布 (population) を求めた。

同時に菌の塗抹標本を作り、Ziehl-Neelsen 染色法にて染色し、菌の形態及び染色性に及ぼす PE の影響を検討した。菌の長さは micrometer 法により各標本につき 200 個の菌の長さを測定した。

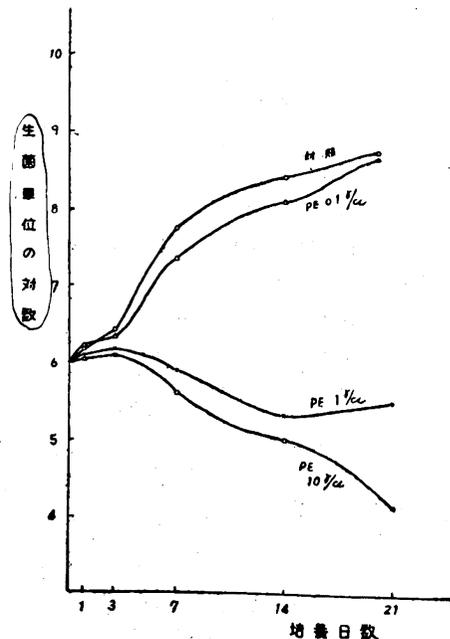
〔2〕 実験成績

(A) PE の結核菌発育阻止作用

PE 加 Dubos 培地内における結核菌の増殖状態を岡・

(註) 上段: Dubos 培地 培養 H37 Rv 株の感性
下段: 岡・片倉培地 培養 H37 Rv 株の感性

第 1 図 H37 Rv 株の Dubos 培地内増殖曲線

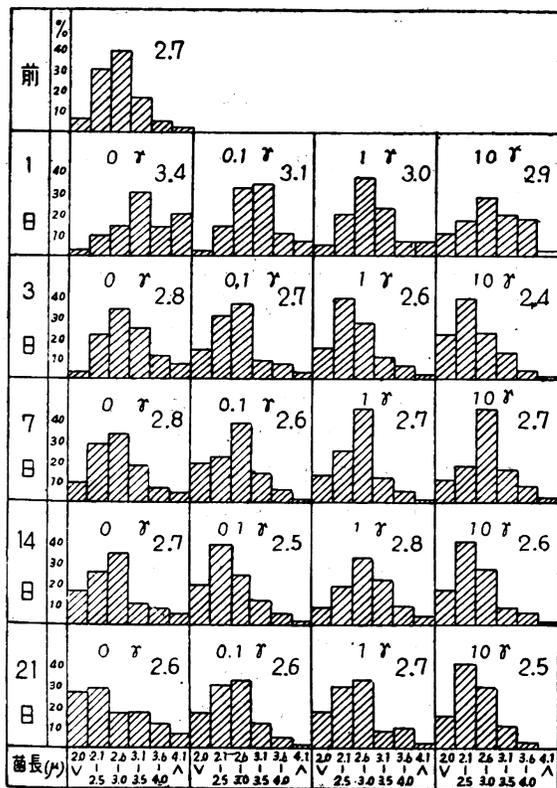


第2表 生菌単位 (当 cc)

岡・片倉 (r/cc)	Dubos			
	0	0.1	1	10
培養 日数	0	0	0	0
1	9.5×10^5	7.0×10^5 (73)	9.8×10^3 (1.0)	1.5×10 (0.0016)
3	1.5×10^6	1.0×10^6 (67)	2.5×10^4 (1.7)	2.0×10 (0.0013)
7	2.5×10^6	1.1×10^6 (44)	1.6×10^4 (0.7)	3.5×10 (0.0014)
14	5.5×10^7	1.2×10^7 (22)	1.5×10^5 (0.3)	2.5×10^2 (0.0005)
21	2.5×10^8	9.5×10^7 (39)	5.0×10^6 (2.0)	1.5×10^3 (0.0007)
0.1	0	0	0	0
1	1.6×10^6	7.6×10^5 (48)	8.0×10^4 (5.0)	4.0×10 (0.0025)
3	2.1×10^6	1.2×10^6 (57)	2.2×10^5 (10.0)	2.5×10 (0.0012)
7	2.2×10^7	1.5×10^7 (68)	1.3×10^6 (5.9)	3.5×10^2 (0.0016)
14	1.2×10^8	7.5×10^7 (58)	5.0×10^6 (4.2)	1.0×10^3 (0.0008)
21	4.6×10^8	3.5×10^8 (77)	2.0×10^7 (4.4)	1.5×10^3 (0.0004)
1	0	0	0	0
1	1.2×10^6	7.4×10^5 (62)	2.8×10^4 (2.3)	2.0×10 (0.0017)
3	1.5×10^6	9.4×10^5 (63)	4.2×10^4 (2.8)	3.5×10 (0.0023)
7	7.7×10^5	2.6×10^5 (34)	7.0×10^4 (9.1)	5.0×10^2 (0.065)
14	2.0×10^5	1.0×10^5 (51)	9.2×10^4 (46.0)	1.5×10^3 (0.75)
21	3.0×10^6	2.8×10^5 (93)	2.0×10^5 (66.7)	2.5×10^3 (0.83)
10	0	0	0	0
1	1.1×10^6	7.2×10^5 (34)	1.8×10^4 (1.6)	2.5×10 (0.0023)
3	1.2×10^6	3.8×10^5 (32)	1.0×10^4 (1.3)	3.0×10 (0.0025)
7	4.0×10^5	2.2×10^5 (34)	6.0×10^4 (15.0)	1.0×10^2 (0.025)
14	1.0×10^5	7.3×10^4 (73)	5.0×10^4 (50.0)	1.5×10^3 (1.5)
21	1.2×10^4	1.2×10^4 (100)	1.0×10^4 (83.3)	2.0×10^3 (16.7)

(註) 括弧内は全生菌単位数に対する %

第3表 菌の長さの分布及び平均菌長



(註) 表中太字は平均菌長, r は培地内含有 PE 濃度 (r/cc), 日数は培養日数

漸増し, 14 日目には $2.5 \times 10^8/cc$, 21 日目には $5.4 \times 10^8/cc$ となる。PE 0.1 r/cc 含有 Dubos 培地では対照培地とほぼ同等の菌の増殖を認める。PE 1 r/cc 及び 10 r/cc 含有培地でも 3 日目迄はそれぞれ $1.5 \times 10^6/cc$, $1.2 \times 10^6/cc$ と僅かに菌数は増加するが, その後は生菌単位数は漸次減少する。しかし PE 1 r/cc 含有培地では 3 週でも生菌単位数は 2 週とほぼ同じである。

菌の増殖過程における population の変化を見ると第2表の如くである。第2表のカッコ内は PE を含まぬ岡・片倉培地に発育した菌の集落数(全集落数)を 100 とし, 各 PE 加岡・片倉培地に発育した菌の集落数を全集落数に対する % で表わした数値である。すなわち原株の 73% は 0.1 r/cc では発育を阻止されないが, 1 r/cc 含有岡・片倉培地に発育可能な菌は 1% に過ぎず, 10 r/cc に発育する菌は約 10^6 に対し 1 個の割合である。

PE を含まぬ対照 Dubos 培地では菌はほぼ均一の population を以って増殖する。PE 0.1 r/cc 含有 Dubos 培地に増殖した

菌の population もほぼ同様である。しかし PE 1 r/cc 及び 10 r/cc 含有 Dubos 培地内における菌の population は 3 日目迄は対照と著変を認めないが, 7 日目には 1 r/cc に発育可能な菌はそれぞれ 9%, 15% とやや増加し, 10 r/cc 耐性菌も 10^4 個の中に認められるようになる。14 日目, 21 日目には PE 1 r/cc , 10 r/cc 含有岡・片倉培地に発育する菌の比率は更に増加し, PE 1 r/cc 含有 Dubos 培地内の菌の population は 14 日目には 1 r/cc に 46% が, 10 r/cc に 0.7% が発育し, 21 日目には 1 r/cc に 66% が, 10 r/cc に 0.8% が発育する。PE 10 r/cc 含有 Dubos 培地内ではこの傾向は更に著明で, 14 日目には 50% が 1 r/cc に, 1.5% が 10 r/cc に発育し, 21 日目には 83% が 1 r/cc に, 16% が 10 r/cc に発育する。すなわち菌の population の変化は培地内での菌の生菌単位数の減少と期を一にしているのである。

(B) 菌の形態及び染色性に対する PE の影響
micrometer により測定した菌の長さ(平均菌長)は接種時 2.7 μ であった。接種後 1 日目には菌の長さは延長するが(危険率 5% にて有意), 3 日目以後は 2.8~2.4 μ となる。PE は発育初期におけるこの菌の延長を阻害し(危険率 5% にて有意), この傾向は含有 PE 量に平行して著明である(第3表)。

Ziehl-Neelsen 染色法による菌のル余の形態及び染色性に対する著明な変化は, PE の各濃度において実

第4表 喀痰中結核菌のPE耐性

症例	r/cc	前	1月	4月	6月	9月	12月	12月以上	備考
1	0	##	##	##	##		##	23月28月	2年後中止 INAH投与後 耐性復帰
	1	##	##	##	##		##	##	
	10	-	-	-	-		##	##	
	100	-	-	-	-		##	##	
2	0	##	##	##	##	##	##	21月23月	2年後悪化
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	-	-	##	
	100	-	-	-	-	-	-	##	
3	0	##	##	##	##		##	15月	
	1	##	##	##	##		##	##	
	10	-	-	-	-		##	##	
	100	-	-	-	-		##	##	
4	0	##	##	##	##		##	16月	
	1	##	##	##	##		##	##	
	10	-	-	-	-		##	##	
	100	-	-	-	-		##	##	
5	0	##	##	##	##	##	##	15月	
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	##	##	##	
	100	-	-	-	-	##	##	##	
6	0	##	##	##	##	##	##	15月	
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	##	##	##	
	100	-	-	-	-	##	##	##	
7	0	##	##	##	##	##	##	16月	1年後悪化
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	##	##	##	
	100	-	-	-	-	##	##	##	
8	0	##	##	##	##	##	##	16月	1年後悪化
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	##	##	##	
	100	-	-	-	-	##	##	##	
9	0	##	##	##	##		##	16月	
	1	##	##	##	##		##	##	
	10	-	-	-	-		##	##	
	100	-	-	-	-		##	##	
10	0	##	##	##	##	##	##	14月	
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	##	##	##	
	100	-	-	-	-	##	##	##	
11	0	##	##	##	##	##	##		
	1	##	##	##	##	##	##		
	10	-	-	-	-	##	##		
	100	-	-	-	-	##	##		
12	0	##	##	##	##	##	##		
	1	##	##	##	##	##	##		
	10	-	-	-	-	##	##		
	100	-	-	-	-	##	##		
13	0	##	##	##	##	##	##		
	1	##	##	##	##	##	##		
	10	-	-	-	-	##	##		
	100	-	-	-	-	##	##		
14	0	##	##	##	##	##	##		
	1	##	##	##	##	##	##		
	10	-	-	-	-	##	##		
	100	-	-	-	-	##	##		

15	0	##	##	##	##	##	##		
	1	##	##	##	##	##	##		
	10	-	-	-	-	-	-		
	100	-	-	-	-	-	-		
16	0	##	##	##	##		##		
	1	##	##	##	##		##		
	10	-	-	-	-		##		
	100	-	-	-	-		##		
17	0	##	##	##	##	##	##		
	1	##	##	##	##	##	##		
	10	-	-	-	-	-	-		
	100	-	-	-	-	-	-		
18	0	##	##	##	##	##	##	18月	1年後悪化 SM併用
	1	##	##	##	##	##	##	##	
	10	-	-	-	-	-	-	##	
	100	-	-	-	-	-	-	##	

第5表 喀痰中結核菌のPE耐性

	r/cc	前	1月	4月	6月	9月	1年	1年以上
完全耐性	<1	12	12	11	9	4	5	1
	1	6	6	7	9	8	11	6
	10	0	0	0	0	0	1	0
	100	0	0	0	0	1	1	3
	10<	0	0	0	0	1(8)	2(11)	3(30)
不完全耐性	<1	0	0	0	0	0	0	0
	1	17	16	16	14	5	4	0
	10	1	2	2	3	5	10	2
	100	0	0	0	1	3	4	8
	10<	1(6)	2(11)	2(11)	4(22)	8(62)	14(78)	10(100)

(註) 括弧内は%

験経過中には認められなかった。

【3】考 按

以上の実験成績からPEの結核菌発育阻止作用について考按を加えてみる。

Dubs 培地に接種した結核菌は接種後3日目迄は徐々に分裂増加し、3日目から7日目迄は急速に(対数期)、その後は又徐々に増加する。これにPEを0.1 r/cc加えても菌の増殖曲線には殆んど変化を見ない。しかしPEを菌の感性(1 r/cc)以上に加えると、菌の増殖曲線は3日目迄は僅かに増加するが、対数期において対照の場合と異り生菌数は減少してゆく。そしてその減少は高濃度になるに従い著明であり、1 r/ccでは14日目で大体減少は止むが、10 r/ccでは21日目にもなお菌は減少している。

その population を検討すると、対照及び0.1 r/cc含有培地では接種前とほぼ同一であるが、1 r/cc、10 r/cc含有培地では感受性菌に対する1 r/cc、10 r/cc耐性菌の比率が生菌数の減少と期を一にして7日目より漸次増加し、殊にその傾向は10 r/cc含有培地において著明である。PE 10 r/cc含有培地における21日目の population はPE 0、0.1、1、10 r/ccに発育した菌の比率は100:100:88:16で生存菌のすべてが0.1 r/ccに発育可能であつた。そして生存菌の16%は10 r/cc以上の

耐性菌であり、67 (88—16)% は 1—9 r/cc 耐性菌で、残りの 17 (100—88)% が 1 r/cc 以下の感性菌であつた。すなわち 10 r/cc に 3 週間接触しても菌が生存する為には必ずしも 10 r/cc 耐性である必要はない。換言すればこのような条件下にて 10 r/cc の PE が感性菌のすべてを殺菌していない。同様のことは 1 r/cc 含有培地内の菌についても見られた。しかし絶対菌数が明らかに増加してゆく、即ち分裂増殖してゆくのは附加 PE 濃度以上の耐性菌である。

Carrod⁴⁾, Mackaness⁵⁾ 等は SM・INAH の結核菌に対する殺菌作用を認めているが、PE は個々の菌の PE に対する感性、PE の濃度、菌の薬剤接触期間及び個々の菌の特性により、一部の菌に対しては殺菌的に、一部の菌に対しては静菌的に作用するものと考えられる。

又 PE は菌の長さの発育初期における延長を阻害する傾向があるが、Domagk⁶⁾, Kalkoff⁷⁾ が Tb1 について述べているような形態的、染色性の変化は認められなかつた。

II 臨床例における PE 耐性菌出現に就いて

PE を 1 年以上 1 日 1 回 0.1 g 単独連用した 18 例の空洞性重症肺結核患者の喀痰中結核菌の PE 耐性を測定した。

(1) 耐性測定法

PE 加岡・片倉培地を用い、間接法にて 1 mg/cc 菌液 0.1 cc を接種し、3 週間判定にて耐性を測定した。

(2) 成績

第 4 表は各個人表で、これを総括すると第 5 表の如くなる。そこで耐性の境界を 10 r に置いてこの成績をみると、完全耐性は投与後 6 カ月迄はなく、9 カ月にて 1 例 (8%)、1 年にて 2 例 (11%)、1 年以上 (14—23 カ月) に及んでもなお 3 例 (30%) に過ぎないが、不完全耐性も含めると投与前既に 10 r 耐性 1 例 (6%) があり、4 カ月迄は殆んど耐性の上昇を見ないが、6 カ月後には 4 例 (22%)、9 カ月後には 8 例 (62%)、1 年後には 14 例 (78%) が 10 r 以上の不完全耐性となり、1 年以上に及ぶと 10 r 2 例、100 r 8 例と全例共 10 r 以上の不完全耐性を示した。

これ等高耐性の菌は Thiosemicarbazone 誘導体である Tb1, Tb6 との間にほぼ同程度の交叉耐性を示した。

これ等の病例の中 PE 耐性菌の出現後、臨床的に悪化した者は 4 例で、その中 1 例は死亡した。

また耐性出現のため、いずれも他の療法に変更したが、PE を中止し INAH を投与した 1 例に PE 中止 4 カ月後に耐性の復帰 (100 r → 1 r) が認められたのみで、他の例では投薬を中止しても耐性は復帰しなかつた。

〔3〕 総括及び考按

Tb1 投与による耐性菌出現については諸家の報告^{8)–13)}があるが、PE も長期連用すると耐性菌が出現する。しかし耐性菌の出現は SM や INAH に比し極めて遅く、投与後 6 カ月頃より漸次耐性が上昇する傾向を示すのである。そして 9 カ月後には 62%、1 年後には 78%、1 年以上 (14—23 カ月) に及ぶと全例に 10 r 以上の耐性菌の出現を認めた。そしてその耐性は Tb1, Tb6 との間に交叉耐性を認めた。耐性菌出現により臨床的には必ずしも悪化はしないが、少なくとも耐性菌出現後なお軽快する例は認めなかつたので、耐性菌出現は薬剤の効果の限界を示す指標となり得る。また休薬により PE の耐性復帰は 1 例を除いては認められず、耐性菌出現例は他の療法に変更すべきである。

結 語

PE の試験管内における結核菌発育阻止作用を経時的に菌の生菌単位数及びその population を測定し検討した結果、PE は諸種の条件により殺菌的及び静菌的に作用することを認めた。また PE により発育初期における菌の長さは延長を阻害されるが、その他の形態及び染色性には著変を認めなかつた。

PE は単独長期連用すると、投与後 6 カ月頃より耐性の上昇を認め、1 年以上に及ぶと全例が耐性を獲得する。終りに御指導・御校閲を賜つた恩師美甘教授に深謝し、御協力いただいた村尾学兄に感謝する。本稿の一部要旨は第 29 回日本結核病学会に報告した。

文 献

- 岡野：結核，28:276, 1953.
- 岡野：結核，29:306, 1954.
- Dubos, R. J. & G. Middlebrook: Amer. Rev. Tuberc., 56:334, 1947.
- Carrod, L. P.: ibid. 62:582, 1950.
- Mackaness, G. B. & N. Smith: ibid. 67:322, 1953.
- Domagk, G.: ibid. 61:8, 1950.
- Kalkoff, K. W.: "Chemotherapeutic der Tuberkulose mit dem Thiosemicarbazone" (G. Domagk) 142, 1950.
- 小山・小酒井他：医療，5:141, 1951.
- 小酒井：日本臨床結核，10:307, 1951.
- 小酒井：結核，27:432, 1952.
- 馬場：医療，6:46, 1952.
- Colwell, C. A. et al.: J. Lab. Clin. Med. 39:761, 1952.
- Nuti, B.: Ann. Ist. C. Forlanini 13:257, (結核抄録 June, 1953. より引用)