

¹⁴C-INH Uptake からみた INH 耐性菌に対する 1314 Th と INH の併用効果についての実験的研究

高 江 四 郎

東京医科歯科大学第二内科（指導 大淵重敬教授）

受付 昭和 41 年 12 月 14 日

EXPERIMENTAL STUDIES ON EFFECT OF COMBINED USE OF 1314 TH AND INH TO INH-RESISTANT TUBERCLE BACILLI FROM VIEW-POINT OF ¹⁴C-INH UPTAKE*

Shiro TAKAE

(Received for publication December 14, 1966)

We have repeatedly reported that the combined use of 1314 Th and isoniazid is experimentally and clinically more effective than the use of 1314 Th alone, even in cases in which the isoniazid resistance is confirmed.

In this study, experiments with radioactive isoniazid were conducted to clarify the mechanism of combined effect of these drugs to isoniazid-resistant tubercle bacilli.

1) The isoniazid sensitive Kurono and Tayama strains of *Mycobacterium tuberculosis* and the H₃₇Rv strain resistant to 50 mcg/ml of isoniazid were cultivated in Dubos' liquid medium containing various concentrations of 1314 Th at 37°C for two weeks. The cells of tubercle bacilli were centrifuged and washed thrice with phosphate buffer. These cells were resuspended in phosphate buffer and ¹⁴C-isoniazid was added to this suspension to give the concentration of one mcg/ml. After incubation at 37°C for 24 hours, the cells were sterilized at 60°C for one hour and washed thoroughly with saline containing Tween 80 and distilled water. Then, the cells were plated on sample dishes and counted with the 2π-gasflow counter. The following results were obtained.

1. The H₃₇Rv-RINH strain took up less amount of ¹⁴C-isoniazid than the isoniazid-sensitive strain did.

2. The amount of ¹⁴C-isoniazid uptake by the sensitive strains cultivated in Dubos' medium containing 0.1 mcg/ml of 1314 Th was much the same as that in 1314 Th free medium. When more than 0.25 mcg/ml of 1314 Th was added to Dubos' medium, the amount of ¹⁴C-isoniazid uptake extremely decreased.

3. The ¹⁴C-isoniazid uptake by isoniazid-resistant strain increased along with the increase in concentration of 1314 Th in Dubos' medium and it became maximum at 0.5 mcg/ml of 1314 Th.

2) When the cells of isoniazid-resistant tubercle bacilli were suspended in phosphate buffer containing 0.1 mcg/ml of 1314 Th and one mcg/ml of ¹⁴C-isoniazid and incubated at 37°C for 24 hours, the amount of ¹⁴C-isoniazid uptake was not different from that of the cells cultured in medium containing the same concentration of 1314 Th. But in spite of increase of 1314 Th concentration in the suspension, no increased uptake of ¹⁴C-isoniazid was observed, or rather in 2.5 and 5.0 mcg/ml of 1314 Th, decreased uptake was demonstrated.

* From the Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine, 1-Chome, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

3) ICR-JCL female mice, infected with 50 mcg/ml isoniazid-resistant H₃₇Rv strain, were treated with 100 mcg of 1314 Th daily for 28 weeks. Tubercle bacilli isolated from these mice took up more amount of ¹⁴C-isoniazid than the cells from nontreated mice did.

4) When the isoniazid-resistant H₃₇Rv strain was cultivated in Dubos' medium containing one of various antituberculous drugs, the cells in the medium containing ethambutol or 1314 Th took up more amount of ¹⁴C-isoniazid than SM, PAS, KM, CS or VM.

These results suggested that the increased uptake of ¹⁴C-isoniazid was due to a modification of the permeability of the cells by 1314 Th, and that this modification was one of the combined effects of 1314 Th and isoniazid to isoniazid-resistant tubercle bacilli.

It was further suggested that the isoniazid resistance was not only due to permeability of the cells but also depended upon the metabolic activity of the cells.

It might be expected that the combined use of ethambutol and isoniazid was more effective to isoniazid-resistant tubercle bacilli than the use of ethambutol alone.

緒 言

1902 年第 1 回日本医学会総会開会式の講演において、Erwin von Bälz は、わが国における結核のいかにわしい注射療法の流行を歎き、結核に対するその時点での正しい診療のあり方を説くとともに、来たるべき抗結核剤出現への期待と確信を述べている。そして今日ではその期待は実現され、十指に余る抗結核剤の出現をみながら、なお重症結核患者の治療に悩んでいるのが現状である。

近年「二次抗結核剤」、「結核の化学療法方式」あるいは「重症難治肺結核」などに関するシンポジウムが、頻々と行なわれるのもこのことを裏書きしている。

現在行なわれている結核の化学療法は、1944 年の Waksman による Streptomycin (SM) の発見に始まるといわれるが、これに続く *p*-Aminosalicylic acid (PAS), Isonicotinic acid hydrazide (INH) とともに、この一次抗結核剤が、その効果、副作用などの面からみてなお中心的なものであり、以下の二次あるいは三次抗結核剤の効果も、これらとの比較において論じられるのが常である。

したがって一次抗結核剤に耐性を有する重症患者に、Kanamycin (KM), α -Ethyl-thioisonicotinamide (TH), Cycloserine (CS), Pyrazinamide (PZA), 4-Acetylaminobenzaldehyde thiosemicarbazone (TB₁), Sulfaz (SF) などの二次抗結核剤および、Viomycin (VM), Dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol (EB), Capreomycin (CPM), Sodium *o*-aminophenolmethanesulfonate (SOM) などのいわゆる三次抗結核剤を使用するさいに、その選択および使用法は副作用、耐性の発現あるいは併用効果の面などから十分な検討が必要である。もちろんこれらの多剤同時併用が、1 剤あるい

は 2 剤併用療法よりもすぐれた成績を示すことは、実験的にも臨床的にも報告^{1)~4)}されているが、より少ない薬剤でこれと同等ないしこれにまさる効果が得られることが望ましいことは論をまたない。そのためには個々の薬剤の作用機作が解明され、それに基づく併用効果の攻究がなされなければならない。しかしわれわれは薬剤の作用機作が明らかにされたために、さらに新しい抗結核剤が発見された例としては、Lehmann による PAS 以外にはほとんど知らない。

ところで現在二次抗結核剤中、主力をなしているのは KM, CS, TH であるが、KM 主軸方式と TH 主軸方式とはほぼ同じ効果を示すといわれる⁵⁾。この TH は 1952 年 Libermann⁶⁾ によつて合成、発表された Isonicotinic acid の誘導体で、その抗菌作用および臨床効果についての報告^{6)~28)}は多くみられるが、結核菌に対する作用機作そのものについての報告は少なく、ほとんど明らかにされてはいない。

一方 INH も 1952 年抗結核剤として登場以来、化学療法の中心的薬剤として、種々の併用療法に用いられている。ことに INH 耐性が証明されている場合でも、好んで他剤と併用され、ことに TH との併用は TH 単独に比し、臨床的にその効果が増強されることは、著者の教室でもしばしば報告^{22)~28)}してきた。また教室の野崎¹⁶⁾¹⁷⁾はその臨床効果を実験的に裏づけるために、*in vitro* および動物実験を行ない、TH により INH 耐性菌の耐性度が減弱することを認めている。しかし INH あるいは TH そのものの作用機作および耐性機構が解明されていない以上、その併用効果増強の機序も十分説明するにいたっていないのはやむをえない。

著者はこの併用効果の機序解明のために ¹⁴C-INH を用い、TH が結核菌による ¹⁴C-INH Uptake に及ぼす影響について検討し、2, 3 の知見を得たので報告す

る。

実験方法

I. TH 加 Dubos 液体培地による方法

1) 培養方法

10% 牛血清アルブミン加 Dubos 液体培地の中に、TH を 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mcg/ml の 8 段階の希釈濃度になるように入れ、各段階とも 5 ml ずつ、それぞれ 30 本ずつ調製し、その 10 本ずつに結核予防会結核研究所から分与された H₃₇Rv INH 50mcg/ml 耐性菌および黒野株 (INH 感性) と、肺結核患者より新たに分離した INH 感性菌 (田山株) を接種し、37°C 2 週間培養した。

菌接種にさいしては INH 耐性菌は INH 50 mcg/ml 含有 3% 小川培地で、また INH 感性菌は 3% 小川培地で、それぞれ 3 週間培養した新鮮菌を用い、滅菌蒸留水でガラスホモジナイザーによつて均等化した菌液を作り、Optical density が 610 mμ で 0.1 になるように希釈し、その 0.1 ml を平等に接種した。

2) 培養成績の判定

培養 2 週後、肉眼的所見および沈殿物の塗抹染色標本 (Ziel-Neelsen 法) の鏡検所見から、下記の基準に従つてその培養成績を判定した。すなわち、

- 一：塗抹標本でも菌の増殖を認めない。
- 土：塗抹標本で、わずかに菌の増殖を認める。
- 十：試験管を振つて糸状の菌の浮遊を認め、塗抹で増殖を確認。

廿：十と卅との中間。

卅：試験管底に著明な菌塊沈殿を認めるもの。

3) Dubos 液体培地で培養後の INH 耐性試験

土以上を示した Dubos 液体培地から、各菌群について、INH 含有 3% 小川培地を用いて耐性試験を行ない、Dubos 液体培地接種前と比べて、INH 耐性度の变化の有無を検討した。このさいの判定基準は、

一：コロニーなし。

数字：50 コロニー以下。

十：51~100 コロニー。

廿：101 コロニー以上。

卅：融合しているもの。

として表わした。

4) 結核菌による ¹⁴C-INH* Uptake の測定

培養菌液を、各菌株別、各 TH 濃度別に集め、無菌的に遠心して集菌し、pH 7.0 の磷酸緩衝液で 3 回洗滌した。この洗滌菌体をガラスホモジナイザーで均等化し、濁度一定 (Optical density が 610 mμ で 0.3) の磷酸緩衝液菌液として、終末濃度が 1 mcg/ml になるように ¹⁴C-INH を無菌的に加え、さらに 24 時間 37°C に保つた。

この ¹⁴C-INH を加えた菌浮遊液を 60°C 1 時間加熱滅菌し、遠心沈殿して上清と菌体とに分け、菌体を 0.2 % Tween 80 加生理食塩水で 4 回洗滌し、さらに蒸留水で 1 回洗滌した。そして最終洗滌液上清中に Radioactivity を認めないことを確かめたうえ、菌体を試料皿 (面積 4.9 cm²) に取り、乾燥後 2π-Gasflow Counter で Radioactivity を測定し、試料による自己吸収を補正したうえ、乾燥菌量 mg 当りの cpm として表わした。(* ¹⁴C-labeled isoniazid: Carbonyl-¹⁴C; Specific activity 9.8 mc/mM; The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England.)

II. TH を ¹⁴C-INH と同時に磷酸緩衝液液に添加したときの、INH 耐性菌による ¹⁴C-INH Uptake の測定

10% 牛血清アルブミン加 Dubos 液体培地を用い、I と全く同じ INH 耐性菌を接種し、37°C で 2 週間培養した後、無菌的に遠心して集菌し、pH 7.0 の磷酸緩衝液で 3 回洗滌し、Optical density が 610 mμ で 0.3 になるように菌浮遊液を調整した。これを各 5 ml ずつに分ち、終末濃度が 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mcg/ml になるように TH を加え、それぞれに ¹⁴C-INH を 1 mcg/ml になるように加えて 37°C で 24 時間放置した。

その後は I の 4) と全く同様の操作をくり返して試料を調製し、その Radioactivity を測定した。

III. INH 耐性結核菌感染マウスからの分離菌による ¹⁴C-INH Uptake に及ぼす TH 治療の影響

生後 4 週、体重 15~20 g の ICR-JCL 系 (均一系) 雌マウスに、H₃₇Rv·INH 50 mcg/ml 耐性菌を感染させたものを使用した。感染方法はあらかじめ 50 mcg/ml の割合に INH を含有する 3% 小川培地で、3 週間培養した H₃₇Rv 株を、生理食塩水で菌浮遊液とし、Optical density が 610 mμ で 0.1 になるように調整し、その 0.2 ml ずつをマウスの腹腔内に接種した。なおこの菌液 0.2 ml 中には 2×10⁵ の生菌数を確認した。

菌接種後 10 週間放置してから TH を 1 匹当たり 100 mcg ずつ、週 6 日腹腔内注射する治療を 28 週間行ない、TH 治療群と無治療群 (菌接種のみ) 各 3 匹ずつを屠殺、肺内結核菌定量培養を行なつた。そしてその分離菌を Dubos 液体培地で 2 週間培養後、I の 4) と全く同様の操作を行なつて ¹⁴C-INH Uptake を測定した。また分離菌について INH 耐性試験も行なつた。

IV. Dubos 液体培地に種々抗結核剤を加えた場合の、INH 耐性菌による ¹⁴C-INH Uptake の測定

300 ml の三角コルペンに、10% 牛血清アルブミン加 Dubos 液体培地 100 ml を入れ、これに各種抗結核剤を、その終末濃度がそれぞれ SM 1.0, PAS 0.1, KM 1.0, CS 1.0, TH 1.0, VM 1.0, EB 0.5 mcg/ml にな

ように加え、I と全く同じ INH 耐性菌を同量ずつ接種して、37°C 2 週間培養し、その後は I の 4) と同様の操作をくり返して試料を調製し、その Radioactivity を測定した。

実験成績

I. TH 加 Dubos 液体培地での培養成績

INH 感性菌 2 株はほぼ同様な増殖を示したが、INH 耐性菌は感性菌に比し、各 TH 濃度においてやや強い増殖を示した。TH 5.0 mcg/ml において、感性菌が全く増殖を示さなかつたのに対し、耐性菌ではわずかながら増殖を認めた。(表 1)

Table 1. Growth of Strains of Isoniazid-sensitive and -resistant Tubercle Bacilli in Dubos' Medium Containing 1314 Th

Concentration of 1314 Th mcg/ml	Isoniazid-sensitive		Isoniazid-resistant
	Kurono	Tayama	H ₃₇ Rv
0	++	++	++
0.1	++	++	++
0.25	++	++	++
0.5	++	++	++
1.0	++	++	++
2.5	+	+	+
5.0	—	—	±
10.0	—	—	—

Table 2. Isoniazid Sensitivity of Kurono and Tayama Strains after Incubation in Dubos' Medium Containing 1314 Th

Concentration of isoniazid mcg/ml		0	0.1	1.0	5.0	10.0
Kurono	Before incubation	++	—	—	—	—
	After incubation	Concentration of 1314 Th 0(mcg/ml)	++	—	—	—
			++	—	—	—
			++	—	—	—
			++	—	—	—
			++	—	—	—
			++	—	—	—
			+	—	—	—
Tayama	Before incubation	++	—	—	—	—
	After incubation	Concentration of 1314 Th 0(mcg/ml)	++	—	—	—
			++	—	—	—
			++	—	—	—
			++	—	—	—
			+	—	—	—
			+	—	—	—
			+	—	—	—

II. TH 加 Dubos 液体培地による培養後の INH 耐性度の変化

感性菌 2 株は 2.5 mcg/ml 以下の各濃度の TH との接触後において、それぞれ INH に対して全く耐性の発現を認めなかつた。(表 2)

これに対して、INH 50 mcg/ml 耐性菌は、TH 0.5 mcg/ml 以下の濃度で接触のものは、INH 耐性度に変化を認めなかつたが、TH 1.0 mcg/ml、2.5 mcg/ml 培地中の菌では、INH 50 mcg/ml において集落数が少なかつた。しかしこれも推計学的に耐性度の減弱を証明するほどの有意差はなかつた。(表 3)

III. INH 感性菌と耐性菌による ¹⁴C-INH Uptake

TH 0 mcg/ml Dubos 液体培地中の感性菌 (黒野株) と耐性菌 (H₃₇Rv 株) について、¹⁴C-INH Uptake を比較すると、表 4 に示すごとく著明な差異を認め、およそ 2:1 の比を示した。これは t-test により 0.1% 以下の危険率で有意であつた。

IV. TH 濃度による ¹⁴C-INH Uptake の変動

1) TH を Dubos 液体培地中に加えた場合

感性菌黒野株では、TH 0.1 mcg/ml で Uptake がわずかに増加したが、田山株ではほとんど変化を示さなかつた。TH 濃度が 0.25 mcg/ml になると両株とも著明な減少を示し、TH 濃度がさらに上につれていつそう

Table 3. Isoniazid Resistance of H₃₇Rv-RINH Strain after Incubation in Dubos' Medium Containing 1314 Th

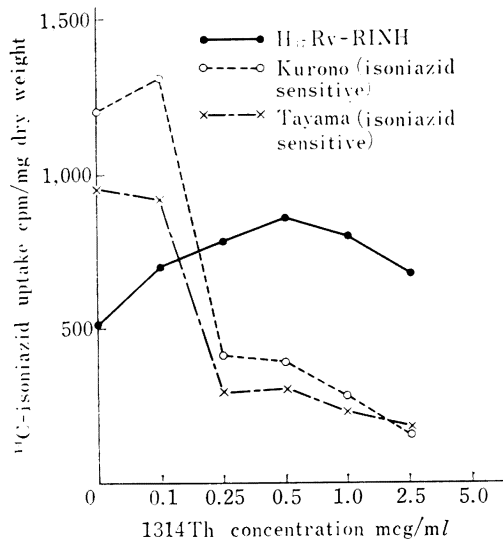
Concentration of isoniazid mcg/ml		0	1	5	10	25	50
Before incubation		++	++	++	++	++	++
After incubation	Concentration of 1314 Th						
	0(mcg/ml)	++	++	++	++	++	++
	0.1	++	++	++	++	++	++
	0.25	++	++	++	++	++	++
	0.5	++	++	++	++	++	++
	1.0	++	++	++	++	++	+
	2.5	+	+	+	+	+	32
	5.0	(78)*	(81)	(70)	(63)	(66)	32

*: Number of colonies.

Table 4. Uptake of ¹⁴C-isoniazid by Isoniazid-sensitive and -resistant Tubercle Bacilli

Strain	Isoniazid-sensitive Kurono	Isoniazid-resistant H ₃₇ Rv
Uptake of ¹⁴ C-isoniazid (cpm/mg dry weight)	1214	546
	1133	485
	1250	515
Mean ± SE	1199 ± 59	515 ± 31

(t=24.64; p<0.001)

Fig. 1. Effect of 1314 Th in Dubos' Medium on Uptake of ^{14}C -isoniazid by Tubercle BacilliTable 5. Effect of 1314Th in Dubos' Medium on Uptake of ^{14}C -isoniazid by Tubercle Bacilli

Concentration of 1314 Th mcg/ml	Uptake of ^{14}C -isoniazid (cpm/mg dry weight)		
	Isoniazid-sensitive		Isoniazid-resistant
	Kurono	Tayama	H ₃₇ Rv
0	1199	955	515
0.1	1307	925	703
0.25	409	291	780
0.5	388	306	859
1.0	283	229	797
2.5	156	160	675

減少傾向を示した。そして TH 2.5 mcg/ml では両株とも 160 cpm 前後にまで減少した。

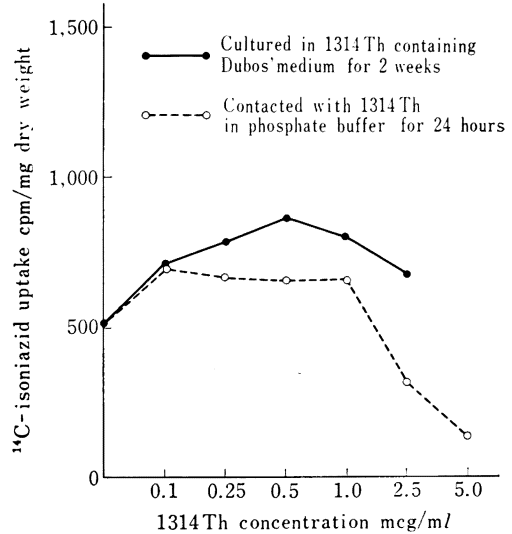
これに対して耐性菌 H₃₇Rv 株では、TH 濃度が 0.1, 0.25, 0.5 mcg/ml と上昇するにつれて、Uptake がむしろ増加を示し、2.5 mcg/ml ではまたいくぶん減少してきたが、それでも 0 mcg/ml におけるよりは高値であつて、感性菌との間に明らかな相違を認めた。(表 5, 図 1)

2) TH を ^{14}C -INH と同時に磷酸緩衝液に加えた場合

磷酸緩衝液中で INH 耐性菌と ^{14}C -INH を接触させるさい同時に TH を作用させると、TH 0.1 mcg/ml では TH が Dubos 液体培地中に加えられたときと同程度の増加を示したが、TH 0.25, 0.5, 1.0 mcg/ml ではそれ以上増加傾向は示さず、2.5, 5.0 mcg/ml で急激に、著明な減少を示した。(表 6, 図 2)

V. 動物実験の成績

1) 肺内結核菌の定量培養

Fig. 2. ^{14}C -isoniazid Uptake by H₃₇Rv-RINH Strain in Phosphate Buffer Containing 1314 ThTable 6. Uptake of ^{14}C -isoniazid by H₃₇Rv-RINH Strain in Phosphate Buffer Containing 1314 Th

Concentration of 1314 Th mcg/ml	Uptake of ^{14}C -isoniazid cpm/mg dry weight
0	515
0.1	697
0.25	659
0.5	651
1.0	656
2.5	313
5.0	134

Table 7. Number of Viable Tubercle Bacilli in 10 mg of the Lungs

	No treatment	1314 Th-treatment
Number of tubercle bacilli	124×10	176
	104×10	192
	142×10	156
Mean±SE	(123±19)×10	175±18

(t=10.36; p<0.01 for logarithm of variate)

肺 10 mg 当りの生菌数を比較すると表 7 のごとく、TH 28 週治療群と無治療群との間に著明な差を認めた。

2) 分離菌による ^{14}C -INH Uptake

無治療群および TH 治療群から分離した菌について、それぞれ ^{14}C -INH Uptake をみると、表 8 のごとく TH 治療群は無治療群に比し Uptake の増加を示し、TH が INH 耐性菌の INH 取り込みに対して、in vivo においても in vitro におけると同様の効果のあることを示した。

Table 8. Effect of Treatment with ^{1314}Th on Uptake of ^{14}C -isoniazid by Isoniazid-resistant Tubercle Bacilli

	No treatment	^{1314}Th -treatment
Uptake of ^{14}C -isoniazid (cpm/mg dry weight)	522	721
	509	709
	549	687
Mean $\pm$ SE	527 ± 20	706 ± 16

(t=11.54; p<0.01)

Table 9. Isoniazid Resistance of Tubercle Bacilli Isolated from the Lungs of Mice

Concentration of isoniazid mcg/ml		0	1	5	10	25	50
Before inoculation		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Isolated bacilli	No treatment	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	^{1314}Th -treatment	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Table 10. Effect of Chemotherapeutics on Uptake of ^{14}C -isoniazid by $\text{H}_3\text{Rv-RINH}$ Strain

Chemotherapeutics (mcg/ml)	Uptake of ^{14}C -isoniazid cpm/mg dry weight
SM (1.0)	548
PAS (0.1)	512
KM (1.0)	540
CS (1.0)	535
TH (1.0)	797
VM (1.0)	558
EB (0.5)	635
Control	546

3) 分離菌の INH 耐性

TH 治療群および無治療群からの分離菌の耐性度を調べると、表 9 のごとく両者とも 50 mcg/ml 完全耐性を示し、マウスへの接種前と全く同じ耐性度を示した。

VI. 各種抗結核剤の ^{14}C -INH Uptake への影響

成績は表 10 のごとくで、SM, PAS, KM, CS, VM では対照とほぼ同じ Uptake を示したが、EB ではやや増加を示した。この EB での値について、SM, PAS, KM, CS, VM を 1 群としたときの t-test を行なうと、自由度は $1+5-2=4$ で、 $t=4.850$ となり、1% 以下の危険率で有意の差を認めた。

TH の場合は、EB の場合よりさらに高値を示し、有意の差をもつて、Uptake の増加を認めた。(表 10)

考 察

感性菌と耐性菌との性質の差異から、その耐性機構を解明しようとする試みは、同時にまた、その薬剤の作用機作を知る一つの有力な方法でもある。

INH 耐性についても Barclay²⁹⁾³⁰⁾, Youatt³¹⁻³³⁾, Garattini³⁴⁾をはじめ、多くの報告³⁵⁻⁴⁷⁾がみられるが、その作用機作、耐性機構のいずれについてもまだ明確な結論は得られていない。

一般に細菌が薬剤に耐性を示す生化学的機構として、堀⁴⁸⁾, 横田⁴⁹⁾らが述べているように、(1) 薬剤の透過性の低下、(2) 薬剤分解酵素の産生などによる薬剤の不活性化、(3) 薬剤の作用に拮抗する物質の増強、あるいは(4) 薬剤により阻害される代謝系に代る別な代謝系の活性化などがあげられる。

これらのうち第 2, 第 3 の点に関して、Youmans³⁹⁾~⁴¹⁾および Kraus⁴²⁾は、結核菌の培養濾液中に INH を不活性化する物質の存在することを証明し、Fisher⁴³⁾⁴⁴⁾は Hemin が INH の結核菌増殖抑制作用を緩解するとし、中瀬⁴⁵⁾⁴⁶⁾は INH 耐性菌に INH 分解能を認め、また戸井田⁴⁷⁾は INH 耐性鳥型結核菌に hydrazinase が存在し、これが INH を hydrazine と isonicotinic acid に分解することが、菌の耐性機構と考えられる可能性を論じているなど、種々の報告がみられる。しかし著者の今回の実験では、これらの問題について検索しなかつたので、以下主として第 1, 第 4 の事項に関して若干の考察を加えてみたい。

抗結核剤が感性菌に作用するさい、薬剤が全く結核菌体内に侵入することなく、菌体構成成分の遊出を起こさせ、あるいは菌体内代謝産物の排出を阻害する、といった機序も考えられないことはないが、一般的には、なんらかの形で、菌の細胞膜ないしは外来因子の浸透に対する防壁を通過し、菌体内でその薬剤に特有な作用機転を示すものと考えられる。したがって薬剤に対して菌が示す耐性の機序として、まず第 1 にこの透過性の変化ということが問題となる。そしてこの細胞膜の透過性が薬剤に対して選択性をもつているとすれば、耐性菌の他剤に対する交叉耐性の問題も理解しやすいものと思われる。事実 INH 耐性菌での細胞膜の透過性の低下を認める報告^{31)~33)50)~54)}は多い。

著者の今回の成績でも、耐性菌と感性菌の間には、 ^{14}C -INH Uptake に著明な差を認めたが(表 4)、これは Barclay²⁹⁾³⁰⁾, Youatt^{31)~33)}, 江田^{50)~52)}, 戸井田⁵⁵⁾らの成績ほど著明ではなく、その割合はむしろ Garattini³⁴⁾の成績に近い。

Barclay ははじめ²⁹⁾感性菌と耐性菌の間に、 ^{14}C -INH Uptake に非常な差がある、というより耐性菌では実質的には Uptake を示さなかつたということから、INH は細胞の代謝に積極的に関与し、細胞にとつて本質的なにかある物質の形成を阻止するのではないか、という仮説をたてた。しかし翌年の報告³⁰⁾において、感性菌による ^{14}C -INH Uptake は全く物理化学的な吸着によるものとし、しかもそれは Freundlich の吸着等温式に当

てはまることを認め、INH の作用機作は菌の代謝に直接作用するのではなく、細胞にとって toxic な物質の蓄積あるいは、hydrogen transport に関係した酵素の賦活化を妨げることに よるとしている。そして耐性菌では INH の吸着が起こらないために、菌体からの物質の transport が阻害されないことが、その耐性機構であると考えているように思われる。しかし菌の示した Radioactivity と、培地中の INH 濃度とが、吸着等温式に一致したということより、ただちにこの現象が吸着であると速断することは許されない。なぜなら培地と細菌体内という2つの液相に INH という第3の物質が溶解しているとき、Henry-Dalton の分配律の変形で、同様の式を示すことがあるからである。しかも菌体内で INH が代謝される可能性を考えると、なおのことである。著者の実験成績でみても、感性菌で TH 濃度が上昇すると、Uptake は急激に減少し(表 5, 図 1), 耐性菌で ^{14}C -INH を TH と同時に作用に作用させた場合においても、TH 濃度が 2.5 mcg/ml 以上では Uptake は減少し、最終的には cpm 150 前後のほとんど同値を示した(表 6, 図 2) ことから考えると、むしろ江田⁵⁰⁾が述べているように INH はまず菌体に吸着され、その後菌体内に取り込まれるものと考えられる。そして感性菌、耐性菌のいずれも、この吸着という現象には差異がないものと思われる。したがって感性菌と耐性菌の Uptake の差は、細胞膜の透過性以後の問題に帰結される。

では耐性菌においてはどのような機序で、細胞膜の透過性が低下するのか。これに対する報告は多くはないが、Youatt³¹⁾は INH 耐性 BCG を CO_2 で処理すると、 ^{14}C -INH の Uptake が上昇するといひ、坂口ら⁵³⁾⁵⁴⁾は lysozyme が細胞壁中の基質を分解し、またペニシリンは細胞壁のペプタイド合成を阻害することにより壁の脆弱化を来し、INH の透過性が増加すると考えている。また Garattini ら³⁴⁾が、 ^{14}C -INH の Uptake と菌の耐性度との相関を認めながらも、カタラーゼ活性および、 H_2O_2 感受性との関係をより重視しているのに対し、江田⁵¹⁾は耐性度と強い相関があると考えている。

教室の野崎¹⁶⁾は INH 耐性菌に、INH と TH を併用することにより、INH 耐性度の減弱することを示したが、著者が TH を作用させた後に、 ^{14}C -INH Uptake の変化を検討した結果(表 5, 図 1)では、INH 50 mcg/ml 以下の範囲では、耐性度の減弱をほとんど認めないにもかかわらず、 ^{14}C -INH Uptake はかなりの上昇を示した。このことから考えると、INH 耐性菌では確かに細胞膜の透過性が低下しているが、それが耐性機構のすべてではなく、INH が菌体内に入つて後にも、INH に対して耐性を示す機構も存在するものと考えられる。これはさきに述べたように耐性菌の ^{14}C -INH Uptake が単に吸着によるものではなく、菌体内に取り込まれたこ

とを示していることから推定されたことである。Youatt³²⁾³³⁾は結核菌による INH の取り込みと排除の割合が異なっていることが、耐性菌と感性菌の相違で感性菌では INH を代謝するより以上に早く取り込まれ、耐性菌では INH を取り込むとすぐ代謝してしまうと述べている。

著者の成績では TH が INH 耐性菌の膜の透過性を高めているものと考えられる。しかしこの膜の透過性の変化自体には、INH を菌が取り込む積極的な機構はなく、これを駆動する力は菌体内の代謝活性にあるものと考えられる。そのために TH がある濃度以上に存在すると、菌の代謝活性は抑えられ、菌体内への INH の取り込みはむしろ減少する傾向を示すものと思われる。感性菌では TH 0.1 mcg/ml のものはほとんど Uptake の増加をみず、TH が 0.25 mcg/ml 以上になると急激に Uptake の減少を示した(表 5, 図 1)。この成績からは感性菌においては、TH による膜の透過性上昇の所見を認めえなかつた。

TH については Rist⁶⁾⁷⁾、堂野前¹⁸⁾、東村⁹⁾、川合⁹⁾らは、INH との間に交叉耐性はなく、INH 耐性菌にも感性菌と同様の感受性を認めているが、INH 耐性菌に対する静菌作用の低下を認める報告¹¹⁾もある。著者の今回の成績では INH 耐性菌に比し、感性菌2株にやや強い静菌力を認めた(表 1)。したがって感性菌で TH 0.25 mcg/ml のとき、Uptake が著明に減少したのは、耐性菌に比し代謝活性がより強く抑制されたためとも考えられるが、またそれほど著明な抑制作用がなくとも、ある程度代謝活性が抑えられた菌に、溶液中に 1 mcg/ml の割合に存在していた ^{14}C -INH が取り込まれ、この INH の作用が加重せられて、代謝活性が極度に低下したため、以後の Uptake が起こりえなかつたということも十分考えられる。

以上のように ^{14}C -INH の菌体内への取り込みは、菌の代謝活性と密接な関係があると考えられるが、INH の作用機作についても、Schaefer⁵⁶⁾は菌の休止期には作用せず、増殖期に作用すると述べ、Barclay²⁹⁾は INH と接触後1回分裂した後発育が停止するとし、また江田⁵⁰⁾は ^{14}C -INH の Uptake が接触温度により異なることから、代謝活性と関係の深いことを強調している。

また TH と INH との併用効果について、川合¹⁰⁾は H_{37}Rv 株を用いた試験管内実験において、また広瀬ら¹⁹⁾は耐性結核患者における臨床成績からこれを認めておらず、塚越¹²⁾¹³⁾はむしろ 1~100 mcg/ml の TH を含有する 1% 小川培地に継代培養した H_{37}Rv 株の INH 感受性が低下するとさえ述べている。しかし教室では早くから INH 耐性菌保有の陳旧性肺結核例に INH と TH の併用を試み、30% 以上の菌陰転率、X 線所見好転をみており^{22)~24)}、小林²⁰⁾、吉田ら²¹⁾も臨床的あるいは実験

的に併用効果を認めている。著者が TH と ^{14}C -INH とを磷酸緩衝液中で、同時に作用させた実験では、TH 0.1 mcg/ml で Uptake の増加をみたが、0.25, 0.5, 1.0 mcg/ml と TH 濃度が増しても Uptake の上昇はみられず、2.5 mcg/ml になると著明な低下をみた。これははじめ TH の存在で膜の透過性が増し、INH の Uptake も増加したが、TH の 0.25, 0.5, 1.0 mcg/ml といった単独では抑制効果を現わしえない濃度においても、1 mcg/ml の INH の共存によりある程度の代謝活性が抑制され、TH 2.5 mcg/ml では強く抑制されたことを示しているものと思われる。そして TH 5.0 mcg/ml にいたれば、TH による細胞膜の透過性が増大しても、これを駆動する力が全く作用しないために、菌体内への取り込みがほとんど起こらず、ただ単に吸着による Radioactivity を示すものと考えられる。

著者は TH と INH の併用効果の機序の一つとして、TH による INH に対する細胞膜の透過性の増加が考えられることを示したが、この TH の作用は東村¹⁴⁾も ^{32}P -phosphate および ^{35}S -sulfate の取り込みからこれを認めている。INH 耐性菌感染マウスに対して TH 治療を行なった場合にも、この TH の作用は示され in vitro ばかりでなく、in vivo においても TH と INH の併用効果を期待しうる一つの根拠を示したものと考ええる。

しかしながら INH および TH が菌体内に取り込まれた後、どのような作用機転を示し、また協同作用を示すかは今回の実験では明らかにしえなかつた。だが今野⁵⁷⁾や江田⁵⁸⁾らが INH が DPN の Nicotinamide の部に介入し、そのために DPN 機能の不活性化を来すことが、INH の作用機作ではないかと述べているのは注目されてよい。耐性菌で INH が DPN に介入しないし誤入しないのは、単に菌体内に INH が存在しないゆえであらうか。耐性菌でも INH が全く取り込まれないわけではなく、まして TH の作用で INH が菌体内に増加しても、耐性度の減弱が明らかでない以上、ただ INH が存在するだけでは DPN への介入しないし誤入は起こらないのかもしれない。東村⁵⁹⁾は INH の存在で起こる菌の核酸合成阻害および蛋白合成阻害が、菌の不活性化からくる二次的な非特異的現象ではないと考えている。INH 耐性機構の本質も、この辺にあることも考えられる。

戸井田⁵⁵⁾は耐性化によりいつたん無効になつた INH の耐性菌に対する作用を、二次抗結核剤が復活させるかどうかを、TH, EB を含む各種二次抗結核剤と ^{14}C -INH を同時に作用させ、 ^{14}C -INH の Uptake を測定した結果、いずれの二次抗結核剤においても Uptake の上昇を認めず、INH が再び作用を示す証拠は得られなかつたと述べている。著者は TH を Dubos 培地に加えて行なつたのと全く同じ方法をもつて、種々の抗結核剤につい

て ^{14}C -INH Uptake を測定したが、SM, PAS, KM, CS, VM では Uptake の変動はみられなかつたが、EB ではこれらに比し有意の上昇を認めた。

EB の作用機序について Kuck ら⁶⁰⁾は菌の増殖に必要な代謝生成物の合成を阻害すると述べている。また Karlson⁶¹⁾は動物実験で INH と EB の併用効果を認めており、森山⁶²⁾、河盛⁶⁴⁾は INH 耐性菌に対して交叉耐性はなく、EB と INH の併用効果を実験的にも臨床的にも認め、さらに同時併用ばかりでなく、異時併用でも併用効果があると述べている。EB にも TH ほど著明ではないが、INH 耐性菌の細胞膜の透過性を増大させる作用があり、これが INH と EB の併用効果をもたらす一因ではないかと考えられる。

結 語

種々の濃度に TH を加えた Dubos 液体培地に培養した INH 50 mcg/ml 耐性の H_{37}Rv 株および INH 感性の黒野株と田山株(患者から分離)を用い、 ^{14}C -INH Uptake に及ぼす TH の影響について検討した。また INH 耐性菌感染マウスに TH 治療を行ない、in vivo での TH の作用が、 ^{14}C -INH Uptake に与える影響について、さらにまた TH のみならず他の抗結核剤が、 ^{14}C -INH Uptake にどのような影響を与えるかを検討し、次の結論を得た。

1) INH 耐性菌は感性菌に比し、 ^{14}C -INH Uptake は少なかつた。

2) INH 感性菌は Dubos 液体培地中の TH 濃度が 0.1 mcg/ml では、 ^{14}C -INH の Uptake にほとんど変化をみながつたが、0.25 mcg/ml 以上では著明な減少を認めた。

3) INH 耐性菌では TH 濃度の増加とともに ^{14}C -INH Uptake の増加がみられたが、TH が 0.5 mcg/ml でピークを示し、2.5 mcg/ml では減少傾向を示した。

4) TH を磷酸緩衝液中で、 ^{14}C -INH と同時に INH 耐性菌に 24 時間作用させると、TH 0.1 mcg/ml では、Dubos 液体培地中に TH を加えたときと同じ Uptake を示すが、それ以上の濃度ではとくに Uptake は上昇せず、2.5, 5.0 mcg/ml にいたると著明な低下を示した。

5) INH 耐性菌感染マウスに TH を1匹当り 100 mcg ずつ、連日腹腔内注射による治療を 28 週行ない、無治療群と比較すると肺内生菌数は減少しており、またその分離菌の ^{14}C -INH Uptake は増加した。

6) 以上の成績から TH は INH 耐性菌の細胞膜の透過性を増大させることを知つたが、また INH 耐性が単に細胞膜の透過性のみによるのではなく、菌の代謝系にも依存していることが示唆された。そしてこれが INH 耐性菌に対する INH と TH との、併用効果の一因であることが推定された。

7) Dubos 液体培地中に加えられた SM, PAS, KM, CS, VM との接触では, $H_{37}Rv$ ・INH 耐性菌の ^{14}C -INH Uptake の増加はみられなかったが, EB では TH ほど著明ではないが, 他薬剤に比し ^{14}C -INH Uptake の増加を認めた。したがって EB も TH と同様に INH との併用効果が期待できることが示された。

本論文の一部の要旨は昭和 41 年 11 月第 70 回日本結核学会関東地方会において発表した。

稿を終るのにそぞも終始ご懇切なご指導ご校閲を賜りました恩師大淵重敬教授ならびに大貫稔講師に深甚な謝意を表します。また本研究にご協力いただきました第二内科医局諸先生および霞ヶ浦分院中央検査室各位に深く感謝致します。

文 献

- 岡治道 (療研): 日本医事新報, 1997: 3, 1962.
- 東海胸部疾患研究会: 結核, 41: 39, 1966.
- 津久間俊次: 結核, 40: 405, 1965.
- 島村喜久治 (国療化研): 結核, 41: 436, 1966.
- Libermann, D., Moyeux, M., Rist, N. & Grumbach, F.: Compt. Rend. Acad. Sci., 242: 2187 1956.
- Rist, N.: Bull. Inter. Union ag. Tuberc., 28: 208, 1958.
- Rist, N., Grumbach, F. & Libermann, D.: Am. Rev. Tuberc., 79: 1, 1959.
- 東村道雄: 結核, 36: 733, 1961.
- 川合満: 京都大学結核研究所紀要, 13: 184, 1965.
- 川合満: 京都大学結核研究所紀要, 13: 193, 1965.
- 杉山 浩太郎・鬼塚 信也・篠田 厚 他: 結核, 37: 169, 1962.
- 塚越兼吉: 日本衛生検査技師会 雑誌, 14: 59, 1965.
- 塚越兼吉: 日本衛生検査技師会 雑誌, 14: 391, 1965.
- 東村道雄・中埜栄三: 結核, 37: 440, 1962.
- Schmiedel, A., Lawonn, H. & Gerloff, W.: Beitr. Klin. Tbk., 129: 317, 1964.
- 野崎昭雄: 結核, 39: 217, 1964.
- 野崎昭雄: 結核, 39: 223, 1964.
- 堂野前維摩郷 他 (日結研): 日本医事新報, 1897: 9, 1960.
- 広瀬久雄・長坂頭雄・富永健二: 結核, 39: 420, 1964.
- 小林栄二: 結核, 39: 298, 1964.
- 吉田文香・福原徳光: 結核, 40: 398, 1965.
- 大淵重敬・藤森岳夫・大貫稔 他: 日本 胸部臨床, 20: 682, 1961.
- 大淵重敬・藤森岳夫・大貫稔 他: 日本 胸部臨床, 20: 817, 1961.
- 大淵重敬・藤森岳夫・大貫稔 他: 治療, 44: 2217, 1962.
- 大淵重敬・藤森岳夫・大貫稔 他: 診断と治療, 51: 145, 1963.
- 藤森岳夫・大貫稔・阿部恒夫 他: 化研彙報, 15: 65, 1961.
- 大貫稔・野寺修・鹿取信 他: 日本胸部臨床, 20: 881, 1961.
- 大貫稔・中野寛・宮島雅一 他: 日本胸部臨床, 21: 624, 1962.
- Barclay, W.R., Ebert, R.H. & Koch-Weser, D.: Am. Rev. Tuberc., 67: 490, 1953.
- Barclay, W.R., Koch-Weser, D. & Ebert, R.H.: Am. Rev. Tuberc., 70: 784, 1954.
- Youatt, J.: Austral. J. Exp. Biol., 36: 223, 1958.
- Youatt, J.: Austral. J. Exp. Biol., 38: 245, 1960.
- Youatt, J.: Austral. J. Exp. Biol., 38: 331, 1960.
- Garattini, S., Leonardi, A. & Paoletti, R.: Am. Rev. Resp. Diseases., 80: 110, 1959.
- Koch-Weser, D., Ebert, R.H., Barclay, W.R. & Lee, V.S.: J. Lab. and Clin. Med., 42: 828, 1953.
- Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 69: 471, 1954.
- Cohn, M.L., Kovitz, C., Oda, U. & Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 70: 641, 1954.
- 堀三津夫: 結核研究の進歩, 24: 168, 1959.
- Youmans, A.S. & Youmans, G.P.: Am. Rev. Tuberc., 72: 196, 1955.
- Youmans, A.S. & Youmans, G.P.: Am. Rev. Tuberc., 73: 764, 1956.
- Youmans, A.S. & Youmans, G.P.: Am. Rev. Resp. Diseases., 81: 929, 1960.
- Kraus, P., Urbanick, R., Simane, Z. & Reil, I.: Am. Rev. Resp. Diseases., 84: 684, 1961.
- Fisher, M.W.: Am. Rev. Tuberc., 69: 469, 1954.
- Fisher, M.W.: Am. Rev. Tuberc., 69: 797, 1954.
- 中瀬真一: 金沢大学結核研究所年報, 18: 239, 1960.
- 中瀬真一: 金沢大学結核研究所年報, 18: 247, 1960.
- 戸井田一郎・斉藤千代: 結核, 37: 287, 1962.
- 堀三津夫: 日本結核全書, 2: 53, 1957.
- 横田健: 結核, 36: 398, 1961.
- 江田亨: 結核, 38: 37, 1963.
- 江田亨: 結核, 38: 107, 1963.
- 江田亨: 結核, 38: 395, 1963.
- 坂口喜兵衛・高部勝衛・守山隆章: 結核, 36: 550, 1961.
- 坂口喜兵衛・高部勝衛・守山隆章: 結核, 37: 495, 1962.
- 戸井田一郎: 結核, 40: 408, 1965.
- Schaefer, W.B.: Am. Rev. Tuberc., 69: 125, 1954.
- 岡捨己・今野淳・長山英男: 結核, 36: 552, 1961.
- 江田亨・横田健・秋葉朝一郎: 結核, 37: 440, 1962.

- 59) 束村道雄・水野松司：結核, 37 : 29, 1962.
- 60) Kuck, N.A., Peets, E.A. & Forbes, M. : Am. Rev. Resp. Diseases., 87 : 905, 1963.
- 61) Karlson, A.G. : Am. Rev. Resp. Diseases., 86 : 439, 1962.
- 62) 森山英五郎：結核, 39 : 155, 1964.
- 63) 森山英五郎：結核, 39 : 191, 1964.
- 64) 河盛勇造・前田 徹・森山 英五郎 他：結核, 39 : 431, 1964.