結核の化學療法研究 第88報

Isonicotinic acid hydrazide を含む各種抗結核劑の 人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響の比較

金澤大日置内科 細 川 勇 一

Chemotherapeutic Studies in Tuberculosis. Report. 88
The Effect of Various Antituberculous Drugs, inclusive of Isonicotinic acid hydrazide,
on the Conservative Oxygen Consumption of *M. tuberculosis* var. *hominis*.
Yuichi Hosokawa.

緒 言

先に當教室佐々木¹⁾は、各種抗結核劑の人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響を觀察し、藥劑單獨使用に於いては、sulfamin 中 sulzolin が特に著しく之を阻害すること、及びそれが人型結核菌、牛型結核菌にかなり特異な現象である事實を知つた。しかもこのものとその他の抗結核劑とを併用せる場合、特に sulzolin と PAS との組合せが各々 10^{-2} モル溶液に於いて、人型結核菌保存呼吸を極めて短時間に停止せしめ得ることを報告した。しかるに最近 Grunberg が thiosemicarbazone of isonicotinaldehyde 外、類似化合物の抗結核作用を検討中、偶々 isonicotinic acid hydrazide (INAH) が頗る強力であることを報じたので、茲に著者は、同物質單獨の人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響を検討すると共に、このものと上述 sulzolin その他各種抗結核劑との併用効果を調査せるに、INAH は sulzolin に次ぎ第二に見出された人型結核菌保存呼吸に對する完全阻害物質であることを知ると共に、同劑と sulzolin との併用が恰も sulzolin と PAS 併用時に於けるが如く、人型結核菌保存呼吸を短時間に阻害停止せしめると言う成績を得た。

實驗方法

菌浮游液調製 全實驗を通じ我が教室にて岡、片倉培地に累代培養保存中の人型結核菌 H_2 株を使用し、その培養日數を約2週間とした。メヂウムとしては、食塩磷酸緩衝液を使用した。食塩磷酸緩衝

液は、0.9%食塩水に緩衝能を與えるため磷酸緩衝液(1/15N)を4%加えたもので、混和後の pH が7.5となる様に調製した。菌浮游液作製に際しては5%石炭酸液中に24時間、その後無水アルコール中に同じく24時間放置したメノウ製乳鉢をとり、乾燥し、數滴のメヂウムと培地上より無菌的に鈎菌せる人型結核菌菌苔を投じ、約15~20分間磨碎し、次で次第に少量宛メヂウムを加え乍ら磨碎を繼續し、1cc中に菌量2.5~4.0mgを含む様な懸濁液を得た。菌の乾燥重量の測定には、同一菌浮游液2.0ccを小型ビーカ中に入れ、滅菌の爲アルコールを充分に混じた後、眞空乾燥器中に放置、乾燥後之を秤量し、得た重量よりメヂウム中の塩類の量を減じた。

藥液調製 被檢藥物としては、PAS, streptomycin, sulzolin, sulfathiazol, sulfadiazin, INAH を使用した。之等の中、streptomycin (Ca-塩), PAS (Na-塩), INAH は水に易溶なる故に、食塩磷酸緩衝液を溶媒として直ちに之等物質の 10^{-1} モル溶液を豫め得たが、sulfamin 劑は一般にその儘では難溶であるので、70%アルコールを溶媒として加温溶解、同じく 10^{-1} モル溶液を調製した。而して後之等を食塩磷酸緩衝液を以て所要濃度に迄稀釋した。

酸素消費量計測 Warburg 氏檢圧計(1%圓周水平、回轉運動)を使用し、舊法によりて計測した。計測容器は内容16.5cc前後のものをを用い、主室内に被檢藥物を所要濃度の2倍量を含む溶液2.0cc

を入れ更に菌浮游液 2.0cc を入れて全量を 4.0cc とした。又對照用の容器には藥物を含まない食塩磷酸緩衝液 2.0cc と前記菌浮游液 2.0cc を入れた。尙氣圧、溫度、運動量等の誤差補正に食塩磷酸緩衝液 4.0 cc のみを入れた對照を併せ置き誤りを防止した。而して副室中には發生する炭酸瓦斯を吸収させる爲に、20% 苛性加里溶液 0.2 cc を入れた。

斯くて容器を直ちに檢圧計に連結し、37.5°C の恒温槽中で 30 分間豫備振盪後、檢圧計上部の栓を閉ちて呼吸槽を外界と遮斷し測定を開始した。即ち振盪開始後 30 分間毎に檢圧計の目盛を読み、後凡ての補正を之に加えた。以上の操作が出来得る限り無菌的に行われたことは無論である。測定が 2, 3 の藥劑に於いて 24 時間の永きに涉つた場合もないではなかつたが、此際雜菌の發生が殆んど寡なかつたことは先に佐々木が檢討報告した如くである。

實驗成績

1) 各種抗結核劑單獨による人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響

PAS, streptomycin, sulzolin, sulfathiazol, sulfadiazin を夫々單獨に使用せる場合には 10^{-2} モル溶液に於いてのみ、INAH はその $10^{-2} \sim 10^{-4}$ モ

ル溶液に於いて之が測定を施行した。今夫等の成績を案するに凡そ次の如くであつた。

先ず PAS を加えた場合には、却つて酸素吸收量が増大する。

然るに streptomycin は殆んど結核菌の呼吸に影響する事は無い。

sulfadiazin の同呼吸に及ぼす影響も殆んど認められなかつたに不拘、sulfathiazol では多少對照に比し阻害的に作用した形跡があり、sulzolin に至り最も阻害的に強く作用して、約 7 時間後酸素消費量は對照に比し約 16% 程度減少し、23 時間半許りに菌の呼吸を停止し得るに至つた。

又 INAH は、その 10^{-2} モル溶液に於いて約 20 時間後之れが完全阻害を營み、sulzolin 單獨使用時に於けるより僅か許り強力であつたが、之より先 7 時間經過時には對照に比べて約 13% 程度阻害的に作用したのみで、sulzolin のそれよりも阻害度は小であつた。 0.5×10^{-2} モル溶液では幾分阻害的に作用し、それ以下の濃度に於いては對照とほぼ等しいか、或は却つて之れを増大するが如き成績を得た。

斯くの如く、sulzolin, INAH は他の抗結核劑とは異なり、何れもその 10^{-2} モル溶液に於いて可な

第 I 表 人型結核菌保存呼吸に及ぼす各種抗結核劑及び 2~3 の sulfamin 劑の影響

藥劑 反應時間	對 照	PAS	strepto- mycin	INAH	sulfa- thiazol	sulfadiazin	sulzolin	PAZOL	7% Alcohol
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	3.0(3.0)	3.5(3.5)	3.0(3.0)	3.0(3.0)	2.5(2.5)	3.0(3.0)	2.5(2.5)	2.0(2.0)	3.0(3.0)
1.00	6.5(3.5)	7.0(3.5)	6.0(3.0)	6.0(3.0)	5.5(3.0)	6.0(3.0)	5.0(2.5)	4.5(2.5)	6.0(3.0)
30	10.5(4.0)	11.0(4.0)	9.5(3.5)	9.0(3.0)	8.5(3.0)	9.0(3.0)	8.0(3.0)	6.5(2.0)	9.0(3.0)
2.00	13.5(3.0)	14.5(3.5)	13.0(3.5)	12.0(3.0)	12.0(3.5)	12.0(3.0)	11.5(3.5)	8.5(2.0)	12.5(3.5)
30	16.0(2.5)	18.5(4.0)	16.0(3.0)	14.5(2.5)	15.5(3.5)	15.5(3.5)	14.0(2.5)	10.5(2.0)	16.0(3.5)
3.00	19.0(3.0)	22.0(3.5)	19.0(3.0)	17.5(3.0)	18.5(3.0)	19.0(3.5)	17.0(3.0)	12.0(1.5)	19.0(3.0)
30	22.5(3.5)	25.5(3.5)	22.0(3.0)	20.5(3.0)	21.5(3.0)	22.0(3.0)	19.5(2.5)	13.5(1.5)	22.5(3.5)
4.00	25.5(3.0)	29.0(3.5)	25.5(3.5)	23.5(3.0)	24.5(3.0)	25.0(3.0)	22.0(2.5)	15.0(1.5)	25.5(3.0)
30	29.0(3.5)	33.0(4.0)	29.5(4.0)	27.0(3.5)	27.5(3.0)	28.5(3.5)	25.0(3.0)	16.0(1.0)	29.0(3.5)
5.00	32.5(3.5)	37.0(4.0)	32.5(3.0)	30.5(3.5)	31.0(3.5)	32.0(3.5)	27.5(2.5)	16.5(0.5)	32.0(3.0)
30	36.5(4.0)	41.0(4.0)	36.5(4.0)	33.5(3.0)	34.5(3.5)	35.0(3.0)	30.5(3.0)	16.5(0)	35.5(3.5)
6.00	39.0(2.5)	44.5(3.5)	39.5(3.0)	36.5(3.0)	37.5(3.0)	38.5(3.5)	32.5(2.0)	16.5(0)	38.5(3.0)
30	42.0(3.0)	48.0(3.5)	42.5(3.0)	39.5(3.0)	40.5(3.0)	41.5(3.0)	34.5(2.0)	16.5(0)	41.5(3.0)

1) 藥劑は全て 10^{-2} モル溶液にて實驗する。

2) 數字は酸素消費量 c.mm () 内數字は 30 分間に於ける酸素消費量 c.mm を示す。

3) PAZOL は sulzolin PAS の併用(sulzolin: PAS=1:1)を稱し、各々 10^{-2} モル溶液を使用す。

4) 本實驗使用人型結核菌 H₂ 株乾燥重量は 3.5mg (實際は實驗が數回に渉りて行われているが、菌量を一定にして成績を補正した。以下同じ)

第II表 INAH 各濃度に於ける人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響

	對 照	$10^{-2}M$	$0.5 \times 10^{-2}M$	$10^{-3}M$	$0.5 \times 10^{-3}M$	$10^{-4}M$
0	0	0	0	0	0	0
30	3.5(3.5)	2.5(2.5)	3.0(3.0)	3.5(3.5)	3.5(3.5)	4.0(4.0)
1.00	7.0(3.5)	4.5(2.0)	7.0(4.0)	7.0(3.5)	7.5(4.0)	7.5(3.5)
30	10.5(3.5)	7.0(2.5)	10.0(3.0)	10.5(3.5)	11.0(3.5)	11.5(4.0)
2.00	14.0(3.5)	10.0(3.0)	13.0(3.0)	14.0(3.5)	14.5(3.5)	15.5(4.0)
30	17.0(3.0)	12.5(2.5)	16.0(3.0)	17.0(3.0)	18.5(4.0)	19.0(3.5)
3.00	21.0(4.0)	15.5(3.0)	19.0(3.0)	20.5(3.5)	22.5(4.0)	22.5(3.5)
30	24.5(3.5)	18.0(2.5)	22.0(3.0)	24.0(3.5)	25.5(3.5)	26.5(4.0)
4.00	28.0(3.5)	21.0(3.0)	25.5(3.5)	28.0(4.0)	29.0(3.5)	30.0(3.5)
30	32.0(4.0)	24.5(3.5)	29.0(3.5)	32.0(4.0)	33.0(4.0)	34.0(4.0)
5.00	35.0(3.0)	27.0(2.5)	32.0(3.0)	35.5(3.5)	36.5(3.5)	37.5(3.5)
30	38.0(3.0)	29.5(2.5)	34.5(2.5)	39.0(3.5)	39.5(3.0)	40.5(3.0)
6.00	41.0(3.0)	31.5(2.0)	37.0(2.5)	42.5(3.5)	43.0(3.5)	44.0(3.5)
30	44.5(3.5)	34.0(2.5)	40.0(3.0)	45.5(3.0)	46.0(3.0)	47.5(3.5)

数字は全て酸素消費量 c.mm () 内数字は30分間に於ける酸素消費量を示す。當實驗使用菌量 3.7mg

第I圖 各種抗結核劑による人型結核菌保存呼吸に對する影響

Warburg 檢圧計(廻轉式水平振盪)120回/分振盪。溫度攝氏37.5度。磷酸緩衝液(pH 7.5)使用。乾燥重量 3.5mg

り強力に菌の呼吸に阻害的に作用し、時間の経過と共に遂に完全阻害に迄至ることは甚だ特異な現象と認む可きである。而も此の濃度に於いて菌が死滅したことは該菌を岡、片倉培地に培養し陰性の成績を得たことに依つて明かである。

成績の概要を第I, II表及び第I, II圖に示す。

2) 各種抗結核劑併用による人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響

PAS, streptomycin, sulzolin, その他2~3の抗結核劑併用時に於ける菌の呼吸に及ぼす影響に

第II圖 INAH 各濃度による人型結核菌保存呼吸に對する影響

Warburg (廻轉式水平振盪)120回/分振盪。溫度攝氏37.5度。磷酸緩衝液(pH 7.5)使用。乾燥重量 3.7mg

就いては、當教室佐々木²⁾が報告した。

著者は INAH を主体として他の抗結核劑を次の如く併用し、之が酸素消費量を測定した。INAHは 10^{-2} , 0.5×10^{-2} モル溶液を使用、他の抗結核劑は 10^{-2} モル溶液を使用した。

先ず PAS との組合せに於いては、INAH の如何なる濃度に於いても對照に於けるとほぼ等しいか、或は多少阻害的に作用する。

streptomycin との組合せに於いては、PAS との組合せのそれより幾分阻害度は大であるが到底完全阻害する迄には至らなかつた。

sulfadiazin, sulfathiazolとの組合せによる同呼吸に及ぼす影響はより強く阻害的に作用したが, sulzolin のそれに比べ小で, 尙且つ完全阻害を呈するという成績は得られなかつた. sulzolin に於いては, INAH 10^{-2} モル溶液との組合せに於いて約4時間30分後に菌の呼吸を完全に阻害したが, 但し後者の 0.5×10^{-2} モル溶液に於いては完全阻

害は惹起せられなかつた. 前者の組合せによる成績はPAS, sulzolin 各々 10^{-2} モル溶液併用時の完全阻害に見るよりも反応時間を約30分程度短縮し得た.

PAS, sulzolin 及び INAH の三者併用時に於いては勿論完全阻害を營むと共に更に反応時間をも短縮したことは第III表, 第III圖に見るが如くで

第III表 INAH と各種抗結核劑との併用による人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響

	對 照	PAS 10^{-2} M		Streptomycin 10^{-2} M		Sulzolin 10^{-2} M		PAZOL 10^{-2} M	
		INAH 10^{-2} M	INAH 0.5×10^{-2} M	INAH 10^{-2} M	INAH 0.5×10^{-2} M	INAH 10^{-2} M	INAH 0.5×10^{-2} M	INAH 10^{-2} M	INAH 0.5×10^{-2} M
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	3.5(3.5)	3.0(3.0)	3.5(3.5)	2.0(2.0)	2.5(2.5)	1.0(1.0)	1.5(1.5)	1.0(1.0)	1.5(1.5)
1.00	7.0(3.5)	6.0(3.0)	6.5(3.0)	4.0(2.0)	5.0(2.5)	2.0(1.0)	2.5(1.0)	1.5(0.5)	2.0(1.0)
30	10.5(3.5)	9.0(3.0)	9.5(3.0)	6.5(2.5)	7.5(2.5)	2.5(0.5)	4.0(1.5)	2.0(0.5)	3.0(1.0)
2.00	13.5(3.0)	11.5(2.5)	12.5(3.0)	8.5(2.0)	9.5(2.0)	3.0(0.5)	5.0(1.0)	2.5(0.5)	4.0(1.0)
30	17.0(3.5)	14.5(3.0)	16.0(3.5)	10.0(1.5)	12.0(2.5)	3.5(0.5)	6.0(1.0)	3.0(0.5)	5.0(1.0)
3.00	20.5(3.5)	17.5(3.0)	19.0(3.0)	12.5(2.5)	14.5(2.5)	4.5(1.0)	7.5(1.5)	4.0(1.0)	5.5(0.5)
30	23.5(3.0)	20.0(2.5)	22.0(3.0)	14.0(2.0)	16.5(2.0)	5.0(0.5)	9.0(1.5)	4.5(0.5)	6.0(0.5)
4.00	27.0(3.5)	22.5(2.5)	24.5(2.5)	16.5(2.5)	19.0(2.5)	5.5(0.5)	10.5(1.5)	4.5(0)	6.5(0.5)
30	30.5(3.5)	25.5(3.0)	27.5(3.0)	19.0(2.5)	21.5(2.5)	5.5(0)	12.0(1.5)	4.5(0)	7.0(0.5)
5.00	33.5(3.0)	28.5(3.0)	30.5(3.0)	21.0(2.0)	23.5(2.0)	5.5(0)	13.0(1.0)	4.5(0)	7.0(0)
30	37.0(3.5)	31.5(3.0)	34.0(3.5)	23.0(2.0)	26.0(2.5)	5.5(0)	14.5(1.5)	4.5(0)	7.5(0.5)
6.00	40.5(3.5)	34.0(2.5)	37.5(3.5)	25.5(2.5)	28.5(2.5)	5.5(0)	16.0(1.5)	4.5(0)	7.0(−0.5)
30	44.0(3.5)	36.5(2.5)	40.5(3.0)	28.0(2.5)	31.0(2.5)	5.5(0)	17.0(1.0)	4.5(0)	7.0(−0.5)

1) 數字は全て酸素消費量 c.mm にして, ()内數字は30分間に於ける酸素消費量を示す.

2) 當實驗使用人型結核菌 H_2 株乾燥重量 3.68mg

3) PAZOL 單獨成績は約4時間30分〜5時間にして完全阻害を示した. (第III圖参照)

第III圖 INAH と各種抗結核劑との併用による人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響
Warburg 檢圧計(廻轉式水平振盪)120回/分
振盪, 溫度攝氏37.5度, 磷酸緩衝液(N/10
pH 7.5)使用, 乾燥重量 3.68mg

ある.

斯くの如く, sulzolin と INAH 各々 10^{-2} モル溶液の組合せは, 他の抗結核劑の組合せに於けるよりも(PAS, sulzolin の組合せを除く)遙かに強力

に菌の呼吸を阻害した事は他に比をみないところで特筆に値するものである.

(なお該組合せにより呼吸を完全に阻害された菌が培地上で遂に發育せざることは, 著者に依り證明された.)併し今 sulzolin と INAH との組合せが強力であるか, sulzolin と PAS との組合せが強力であるかは, 一方的に孰れ共決し能われないものがある. 成程 sulzolin, INAH の組合せでは前者の 10^{-2} モル溶液に對し後者の同じく 10^{-2} モル溶液で強力に作用したが, 後者のより稀薄な溶液では菌呼吸の完全停止を見得なかつたに拘らず, sulzolin, PAS の組合せでは, sulzolin 10^{-2} モル溶液に對し, PAS の 10^{-3} モル溶液併用時に於ても同じく菌呼吸の完全停止を來し得たからである.

成績の大要を第III, IV表及び第III, IV圖に示す.

第IV表 INAH と Sulfamin 劑の併用に依る
人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響

対 照		INAH 10^{-2} Mol		
		Sulzolin 10^{-2} M	Sulfathiazol 10^{-2} M	Sulfadiazin 10^{-2} M
0	0	0	0	0
30	3.0(3.0)	1.0(1.0)	1.5(1.5)	1.5(1.5)
1.00	6.0(3.0)	2.0(1.0)	3.0(1.5)	3.0(1.5)
30	9.0(3.0)	3.0(1.0)	4.0(1.0)	4.5(1.5)
2.00	12.5(3.5)	3.5(0.5)	5.0(1.0)	6.0(1.5)
30	15.5(3.0)	4.0(0.5)	6.0(1.0)	7.0(1.0)
3.00	18.5(3.0)	4.5(0.5)	7.0(1.0)	8.0(1.0)
30	21.5(3.0)	4.5(0)	8.5(1.5)	9.5(1.5)
4.00	25.0(3.5)	5.0(0.5)	10.0(1.5)	11.0(1.5)
30	28.0(3.0)	5.0(0)	11.0(1.0)	12.5(1.5)
5.00	31.5(3.5)	5.0(0)	12.5(1.5)	14.0(1.5)
30	34.5(3.0)	5.0(0)	13.5(1.0)	15.5(1.5)

- 1) 數字は酸素消費量 c.mm () 内數字は30分間に於ける酸素消費量 c.mm を示す。
- 2) 當實驗使用人型結核菌 H₂ 株乾燥重量は 3.3mg.

結 論

以上著者は, isonicotinic acid hydrazide (INAH) を含め各種抗結核劑の人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響を更めて検討し, 中最も注目になるものとして次の如き成績を得た。

- 1) sulzolin, INAH を各々 10^{-2} モル含有する溶液では菌の保存呼吸が極めて短時間に完全に阻害停止せられる。

第IV圖 hydrazide と Sulfamin 劑併用に
依る人型結核菌保存呼吸に及ぼす影響

Warburg 氏檢圧計使用120回/分同轉37.5°
C 乾燥使用重量3.3mg磷酸緩衝液 (pH7.5)
使用。

- 2) 之を sulzolin, PAS 兩者の組合せ成績と比較するとき, 此の場合 sulzolin, PAS 各々 10^{-2} モル溶液では時間的に僅か許り sulzolin, INAH の同濃度の併用成績に劣るが, PAS の 10^{-3} モル溶液併用の場合でも菌呼吸の完全停止を認めることが出来, 同濃度では sulzolin, INAH の併用効果が認められないので, 此の点では PAS, sulzolin の組合せがより勝れている。

参考論文

- 1) 佐々木: 日本内科学會雜誌, 41, 25, 1952. —2)
- 佐々木: 日本内科学會雜誌, 41, 31, 1952.