



Title	INAH自然耐性菌の研究：第1報
Author(s)	久世, 彰彦
Description	
Citation	結核の研究, 2, 55-59
Issue Date	1955-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26561
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P55-59.pdf



INAH 自然耐性菌の研究

第 1 報

久世 彰彦

(北海道大学医学部第1内科 山田豊治教授)

(北海道大学結核研究所豫防部 高橋義夫教授)

微生物の薬剤耐性の研究は生物学上甚だ興味深い課題であるばかりでなく、化学療法が大きな役割を占める臨床の実際には不可欠の課題である。

結核研究の領域に於ても、有効な化学療法が発達普及するにつれて、結核菌の薬剤耐性の問題、即ち、抵抗性発現の機序、其の難易、抵抗性の復帰、又抵抗菌の生物学的性状、毒力、ひいては耐性獲得防止の対策等が多くの研究者により種々の観点から広く研究されている。しかし結核菌の場合、耐性菌の研究の大部分は研究室保存の菌株を、低濃度から漸次高濃度の薬剤含有培地に継代培養して得られた耐性菌か、或いは化学療法をうけた患者から分離された耐性菌に就いて行われているのであつて、未だ薬剤にふれたことのない菌群を最初から高濃度の薬剤に直接接触せしめて分離される所謂自然耐性菌に就いての研究は比較的少ない。

SM の自然耐性菌に就いては、Vétérans hospital の統計は 3391 回の試験のうち、10~99 γ /ml 耐性のもの 2.4% 100~499 γ /ml 耐性のもの 0.3% と報告、Yegian¹⁾ は 1.4×10^8 中 82 の SM 抵抗株と 12 ケの依存株を分離している。又 British Medical Research²⁾ の報告に患者から得られた自然耐性菌の 2 例が興味ある事実として記載されている。

INAH に対しても自然耐性菌の存在は当然予期せられることで、我々は BCG の場合、INAH 10 γ /ml 以上の自然耐性菌が感受性菌約 2 万個に 1 ケの割合で存在していることを見ている。

又患者から分離された自然耐性菌に就いては Hofmann, P. und Nickel, L.³⁾, Lattimer, J. K.⁴⁾, Gladys, L. et al.⁵⁾, Bassermann, Fr. J.⁶⁾, Fust, B. und Böhm, E.⁷⁾, Bünger P. und Lass, A.⁸⁾ 等の報告がある。之等研究者の成績は第 4 表に一括して示した。

著者も亦、患者喀痰中に含まれる INAH 自然耐性菌の分布を検討した。以下は其の実験報告である。

実験方法

結核菌の分離方法：以前に INAH の投与をうけた事

のない患者からとつた喀痰を 4% NaOH で処理して、3% 小川酸性培地に 0.1 ml を培養分離した。

INAH 耐性検査：上記の如く培養して 4 週後に発生したコロニーより、水晶玉入りコルベンを用いる手振振盪法で、約 20 mg/ml の蒸溜水菌浮遊液を作つた。次いでその菌液の 0.1 ml 宛を 0 γ /ml, 1 γ /ml 及び 10 γ /ml の割合に INAH を含有せしめた小川培地に培養した。

INAH 耐性菌の定量的検査：上の培養の結果、INAH 耐性菌の発生を認めた場合には、INAH を含有しない培地に発生したコロニーから同様に、正確に 20 mg/ml の母菌液を作り、之を通常の方法で定量的培養すると同時に、母菌液の 0.1 ml を INAH 含有培地 (1 γ /ml と 10 γ /ml) に培養した。

かくして、感受性菌と耐性菌との比率を検査した。

更に数株の菌に就いて同様の実験を繰返し培養期間と耐性菌発現の関係を調べた。

実験成績

成績は表 1, 2, 3 に示されている如くである。

1) 検査例数 80 例中、培養 4 週目では 1 γ /ml, 10 γ /ml INAH 含有培地にそれぞれ 25 例 (31%), 7 例 (9%) に結核菌の発育がみられた。培養 4 週目ではコロニーの発育が認められず、5 週目ではじめて現われた例を含めると 1 γ /ml, 31 例 (40%), 10 γ /ml, 10 例 (13%) に INAH 耐性菌の発現を認めた。

2) INAH 耐性菌の定量的検査によつて得られた分離結核菌中の感受性菌と自然耐性菌の比率は、感受性菌 10^8 について 1 γ /ml 耐性のもの 1 ケから約 30 ケ、例外として 5620 ケのものもあつた。10 γ /ml 耐性のものは 1 ケから約 10 ケの割合であつた。

3) INAH 含有培地に発生するコロニーは、早いものは培養 3 週で認められるが、3 週 4 週ではコロニーが認められず 5 週ではじめて認められる例もあつた。しかし 8 週目以降にコロニーが発現するような例はなかつた。

表 1 喀痰より分離せる結核菌の INAH 自然耐性

患者 番 號	INAH 耐性			患者 番 號	INAH 耐性			患者 番 號	INAH 耐性			患者 番 號	INAH 耐性		
	0r/ml	1r/ml	10r/ml		0r/ml	1r/ml	10r/ml		0r/ml	1r/ml	10r/ml		0r/ml	1r/ml	10r/ml
1	###	1	0	21	###	0	0	41	###	0	0	61	###	1	0
2	###	0	0	22	###	0	0	42	###	0	0	62	###	0	0
3	###	0	0	23	###	+	+	43	###	40	18	63	###	0	0
4	###	0	0	24	###	0	0	44	###	11	0	64	###	0	0
5	###	0	0	25	###	8	0	45*	###	1	0	65	###	0	0
6	###	0	0	26	###	0	0	46	###	0	0	66	###	0	0
7	###	0.5	0	27	###	0	0	47	###	1	0	67*	###	0.5	0
8	###	0.5	0	28	###	3.5	0	48	###	3	0	68	###	0	0
9	###	0	0	29	###	0	0	49	###	0.5	0.5	69	###	1.5	0
10	###	0	0	30	###	15.5	7	50	###	0	0	70*	###	1	0.5
11	###	0	0	31	###	0	0	51	###	0.5	0	71	###	0	0
12	###	1	0	32	###	0	0	52	###	0	0.5	72	###	0	0
13	###	0	0	33	###	0	0	53	###	0	0	73*	###	6.5	0.5
14	###	0	0	34	###	0	0	54	###	0.5	0	74	###	2	2
15	###	1.5	0	35	###	0	0	55	###	0	0	75	###	+	+
16	###	0	0	36	###	+	0	56	###	1.5	0	76	###	0	0
17	###	0.5	0	37	###	0	0	57	###	1	0	77	###	0	0
18	###	0	0	38*	##	15.5	0	58	###	0	0	78	###	0	0
19	###	0	0	39	###	0	0	59	###	0	0	79	###	0	0
20	###	1.5	0	40	###	0	0	60*	###	1	0.5	80	###	0	0

検査例 80 例 INAH 耐性例

培養 4 週判定 1r/ml 25 (31%) 10r/ml 7 (9%)

培養 5 週判定 31 (40%) 10 (13%)

コロニーが完全に融合しているもの、+ 概ねコロニー数 100~200、数字はコロニー数平均、

* 培養 4 週目コロニーの發育なく 5 週目で發育を認めたもの。

表 2 分離結核菌中の感受性菌と自然耐性菌の發育コロニー数

患 者 番 號	定 量 培 養		INAH 含有培地に發育せるコロニー数 (接種菌 1mg 當りの平均)			分離結核菌 10 ⁸ 箇に含 まれる自然耐性菌	
	10 ⁻³ mg	10 ⁻⁶ mg	1r/ml	10r/ml	100r/ml	1r/ml	10r/ml
12	113	23	2.5	0.2	—	10.8	0.6
15	97	15	3.3	2.0	—	22.0	13.3
17	45	4	1.2	0.2	—	28.7	3.7
20	184	27	3.0	1.8	—	11.1	6.6
23	128	16	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³ + 9 0	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³ 0 0 0	—	5620.0	0
25	131	16	5.3	1.5	—	33.0	9.4
28	106	16	4.5	1.3	—	28.1	8.1
44	137	26	0.1	0	0	0.4	0
48	++	61	2.5	0.5	0	4.1	0.8
54	++	34	1.9	0	0	5.4	0
57	++	63	0.4	0	0	0.7	0
61	++	28	1.5	0.5	0	5.4	1.9
69	226	23	1.5	0.5	0	6.6	2.3
74	++	54	1.2	0.4	0	2.2	0.8
7	++	75	0.7	0	0	0.9	0

培養 4 週目判定 ++ コロニー数概ね 100~200 ++ コロニー数概ね 200~500 数字はコロニー数平均

表 3 培養期間による自然耐性菌發現の相違

患者 番號	INAH 耐 性											
	3 週			4 週			5 週			6 週		
	0r/ml	1r/ml	10r/ml	0r/ml	1r/ml	10r/ml	0r/ml	1r/ml	10r/ml	0r/ml	1r/ml	10r/ml
12	##	1	0	###	2.5	0.3	—	—	—	###	3.5	0.3
15	###	2.5	1	###	3.5	2	—	—	—	###	4.5	2
17	##	0	0	###	1	0.3	—	—	—	###	2	0.3
20	###	3	0.5	###	3	1.5	—	—	—	###	4	2
25	###	2.5	0.5	###	5.5	0.5	—	—	—	###	6	1.5
28	##	0.5	0	###	4.5	1	—	—	—	###	6	1.5
44	—	—	—	###	5.5	0	###	5.5	0.5	—	—	—
48	—	—	—	###	1.5	0	###	4.5	1	—	—	—
60	##	0	0	###	0	0	###	1	0.3	—	—	—
56	##	0	0	###	0	0	###	1.3	0.3	—	—	—

コロニーが完全に融合してるもの

コロニーが完全には融合していないもの

數字はコロニー數平均

表 4 INAH 自然耐性菌に就いてなされた報告

報 告 者	例 數	耐性例	培地中に含まれる INAH 濃度/ml				
			0.1r	1r	5r	10r	100r
Hofmann, P.	191	2					
Gladys, L.	37	13		9		2	2
Bassermann, Fr. J.	112	10		8	2		
Lattimer, J. K.	12	4			4		
Bünger, P.	100	21	15	6			
Hein u. Wemmer	119	16	15	1			
Berg u. Meissner	512	29	28	1			
Britisch Medical Reserch	147		136 < 0.2r	8 < 1r	3 < 5r		
Bünger, P. (eitvige pleural exsudat)	4	2	1		1 (2.5r)		
* 13) 大 森	51	2	1	1			
楠	22	5	3	1 (0.5r)		1 (20r)	
沖 中	16	1					
近 藤	18	2		1		1	
砂原 (茂)	46	4					
藤 井	14	0					
美 甘	39	22	17	5			
小川 (辰)	26	11	7	3		1	
* 12) 柳 澤	695	237	187	38		11	1

考 按

1つのコロニー或いは1つの菌株は厳密な生物学的意味に於ては決して純粋なものではなく、それらは発生学的に異つた要素をもつた個々の細菌の集団である。この意味に於て、自然界に存する総ての個々の細菌が同一薬剤に対して同一態度を示すとは考えられない。

即ち同一薬剤に対して感受性の差があり、中にかかなりの程度に自然に抵抗性を有するものが必ずある筈である。我々の実験成績も此の事実を裏書きしている。

菌の薬剤に対する自然耐性の有無は、菌の種類及び薬剤の種類によつて多様であるが、結核菌に於てもSM, PAS, TBに対する自然耐性菌が報告されており^{1)~3)11)~13)14)}、殊にINAH自然耐性菌に就いての今までの報告をまとめると表4のようになる。

一般にINAHに対する結核菌の感性帯は1:10,000,000 (Domagk), 1:60,000,000 (Gvunberg und Schnitzev) 即ち0.1 γ /mlから0.015 γ /mlとされ、American Trudeau Societyでは0.06 γ /mlを耐性限界濃度としている。

表にみられるように報告者によつてINAH自然耐性菌発現の率にかかなりの差がある。之は実験に用いられた培地の種類、菌型、菌株、培養期間、接種菌量、判定の方法等の相違によるものと考えられる。

今回の実験ではINAH 1 γ /ml以上の耐性を検査したのであるが、他の報告者の如く0.1 γ /mlを耐性限界濃度として検査すれば、耐性菌発現の率は更に増加すると考えられる。

又菌株によつてはコロニー発現迄に長時間を要するものがあるので、培養期間の長短も成績に影響することが考えられる。

次に分離菌群中に含まれる自然耐性菌と感受性菌の比率をみると、SM自然耐性菌に関しては、Yegian¹⁾は94:1.4 $\times 10^8$ といい、柳沢は1:3.1 $\times 10^6$ 乃至1:5 $\times 10^8$ であると云つている。INAH自然耐性菌に関する我々の今回の実験では1~30:10⁸であつた。

この事はINAH自然耐性菌を検出するには、培地への接種量がかかなり大量でなければならぬ事を示している。

自然耐性菌の存在は、化学療法剤に対する菌の耐性獲得の機序を一部説明するのに役立つであろう。事実、治療により高率にみられる結核菌のINAHに対する臨床的耐性獲得は、一部、自然耐性菌の選択的発育及び選択された自然耐性菌の薬剤接触による誘導変異の現われである事は容易に考えられる。

事実、Bünger¹⁵⁾¹⁶⁾は、患者に既存する自然耐性菌が化学療法によつて、その増殖を阻止されない場合、之等が結

核症のシューヴ、再発或いは臨床的耐性発現の原因となることを警告し、従つて血中濃度1.0~5.0 γ /mlを保ちうるINAHの200mg1日3回計600mg投与をすすめている。かかる見地からすれば、今回の実験で明らかな様にINAH 10 γ /ml耐性菌が少なからざる率で見出される以上、更に大量のINAHが投与せられねばならないことになる。

しかし一方、Hofmann等¹⁷⁾は自然耐性菌の見出された2例の9患者INAHにを投与し、後の検査で菌が感受性になつたと報告し、著者は今回の実験で10 γ /ml INAH自然耐性菌を検出した1例の患者に、INAH体重1kg当り4mg及びPAS 10g 毎回投与を行つたところ、治療開始後3ヶ月目に喀痰中結核菌は陰性となり、10ヶ月で投薬中止、その後1年行上頻回の検査に拘わらず、菌は陰性のまま患者は軽快し家事に従事することが出来た例を経験している。

1例ではあるが、かかる例は、INAH自然耐性菌が検出される患者にはINAH治療を断念しなければならぬとか、或いは直ちにINAH大量投与を施さねばならぬという意見に反省を促すものであつて、この場合むしろ他の化学療法剤とINAHの併用を考慮すべきことを示唆するものである。

ひるがえつて、生体内における菌の耐性獲得の機序は極めて複雑で、之を単に自然耐性菌の選択的発育のみで説明することは困難であつて、更に感受性菌と抵抗菌との体内での増殖率の相違、抵抗性の復帰、抵抗菌の毒力等多くの問題と開聯して、今後更に深く研究さるべき課題である。

Cummings等¹⁸⁾は最近、化学療法をうけた事のない1,166名の患者の喀痰検査で30例(2.6%)が10 γ /mlのSMに耐性を示し、之等の患者はすべてSM治療をうけた患者に接触したことが証明されることから、SM耐性菌による感染であると警報している。しかし之等の例の中にはSM自然耐性菌が少なからず含まれていないとは断言出来ない。

今回の実験が行われたのは北海道で初めてINAHが使用された昭和27年10月から28年5月までの期間であるから、INAH獲得耐性菌による感染例は全くないものと考えられる。

結 論

1) INAHの投与を受けたことのない患者の喀痰から分離した結核菌80例中、INAH自然耐性菌がみられた。

之等自然耐性菌中1 γ /ml耐性のものは培養4週目では25例(31%)、5週目では31例(40%)であつた。

10 γ /ml耐性菌は4週目7例(9%)、5週目10例(13%)であつた。

2) 之等 INAH 自然耐性菌は感受性菌 10^8 ケ中に 1 乃至 30 ケ (時に 5,620 ケ) の割合で見出された。

文 献

- 1) Yegian, D.: J. Bact. 58, 257, 1949.
- 2) 柳澤: 日本醫事新報. 1489, 1952.
- 3) British Medical Reserch Council: Brit. med. J., March 7, 1953.
- 4) Hofmann, P. und Nickel, L.: Beitr. Klin. Tbk. 112, 191, 1954.
- 5) Lattimer, J. K.: J. Amer. Med. Assoc. 150, 981. 1952.
- 6) Gladys, L. et al.: Am. Rev. Tuberc. 65, 771, 1952.
- 7) Bassermann, Fr. J.: Klin. wschr. 31, 272, 1953.
- 8) Fust, B. and Böhni, E.: Schweiz. med. wschr. 16, 377, 1953.
- 9) Bünger, P. und Lass, A.: Dtsch. med. wschr. 78, 1193, 1953.
- 10) Bünger, P. und Lass, A.: Z. Tbk. 103, 202, 1953.
- 11) Cummings, M. M. et al.: Am. Rev. Tuberc. 70, 637, 1954.
- 12) 柳澤: 日本醫事新報. 1516, 1953.
- 13) 厚生省結核療養法研究協議會報告.: 1953.
- 14) 柳田: 自然. 1951.
- 15) 座談會: 最新醫學. 8, 65, 1953.