



Title	EthambutolおよびCapreomycinに対する結核菌の耐性分布について
Author(s)	五十嵐, 仁; IGARASHI, Hitoshi
Description	
Citation	結核の研究, 30, 47-57
Issue Date	1970
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26804
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_P47-57.pdf



Ethambutol および Capreomycin に対する 結核菌の耐性分布について

五十嵐 仁

(北大結研予防部)

緒 言

患者から分離した結核菌株中に何れかの比率にせよ耐性 Variant が含まれていることは既に結核化学療法薬として Streptomycin が輝しい出発をした時から多数の薬剤について知られていることである^{1)~9)}。そしてこれら Variant が投与される薬剤によって選択的に増殖し臨床に対応する薬剤に耐性獲得という事実として表われてくるといふ考え方は、現在ウイルスをも含めて微生物遺伝学上の常識となっている。しかしこれら薬剤に未接触の野生株の中に含まれる種々の耐性度をもつ Variant と臨床的に表現される耐性とはどういう関係にあるのか、恐らくその間の過程中には菌側と生体側と、又薬剤自体に変化が起り、極めて複雑な状況が起きているに違いない。だがそれはさておいて、われわれが臨床検査の段階で既に多量の薬剤投与をうけた個体について極く大雑把に、これら耐性 Variant を培養検出している現状である。しかしわれわれは、細菌学的見地から、まず未治療時の分離菌株における菌 Population を知るべきではなからうか。こういう意味で、著者は、近時二次薬として使用されている Ethambutol (以下 EB) と Capreomycin (以下 CPM) について、耐性分布を、未治療患者由来の野生菌株で調べ、この2薬剤が二次薬中に占める位置を耐性の点から、少くとも細菌学的立場で知ることができたと思われるのでここに報告したい。

実験方法

使用した菌株は昭和41年度結核療法研究協議会(以下療研)が未治療患者における一次薬耐性の調査をした際、本研究所に北海道内10ヶ所の療養施設から送附された81株である。

EB および CPM に対する菌の Population をしらべる方法は Canetti の比率法によった¹⁰⁾。

即ち小川培地に約4週培養の菌から型の如く手振り法でまず5mg/mlの菌浮遊液を作り、これから出発して10倍稀釈の反復により数段階の濃度の菌液を得た。耐性培地としては小川培地を用い、その調製過程でEB又は

CPM を加熱凝固前に培地に加えた。薬剤濃度は、EB では1.25, 2.5, 5 および 10 γ /ml, CPM では12.5, 25, 50 および 100 γ /ml とした。

菌接種に当っては、数回の予備実験により、予めコロニーの算定可能なように、高い濃度の薬剤を含む培地ほど濃い菌液を接種するようにした。接種量は0.2mlとし各2本の培地を用いた。接種後37°Cに培養し、4乃至6週後にコロニーを数えて平均値を求め、対照培地の値との比を算定した。

実験成績

EB と CPM の耐性 Variant に関連して菌 Population の構成を、測定した菌株毎にコロニーの実数値で示したのが表1と2(EB)、表5と6(CPM)であり、接種菌数に対する比率で表わしたのが表3と4(EB)、表7と8(CPM)である。そして各表で菌株記載の順序は、EBでは1.25 γ /ml, CPMでは12.5 γ /mlの耐性培地における Variant の比率の低いものから高いものと並べた。まずEBの耐性分布の状態を表1と2の上で Variant の実数値でしらべてみよう。EB1.25 γ /mlでは、接種菌数に比し、どの菌株にも可成り多くの生菌単位がみられているが、2.5 γ /mlではその減少が著明になり、さらに5 γ /mlでは殆んど菌の発現が認められなくなり、10 γ /mlでは全くコロニーはみられない。この成績に基づいて各耐性 Variant の Population に対する比率をパーセントで示したのが表3と4であり、これを半対数で表わしたのが図1である。これらの成績より、EBでは、2.5 γ /mlと5 γ /mlの間で、その耐性分布に著しい差があることが明らかである。次にCPMの耐性分布を表5、表6によって Variant の実数値でみると、本実験では薬剤濃度がEBのその10倍であるにも拘わらず、EBとは対照的に12.5 γ /mlでは勿論25 γ /ml, 50 γ /mlにも Variant は可成り多く認められ、さらに100 γ /mlでもなお相当数のコロニーの発現のみとめられた菌株があることに気が付く。各耐性 Variant の Population に対する比率を表7と8に、さらにその分布状態を半対数で図2に示し

表 1 Ethambutol 耐性度の分布 (I) (Population の構成と Variant の数)

菌 株	接 種 菌 数	濃 度			
		E 1.25 γ	B 2.5 γ	5.0 γ	10.0 γ
R-3	11 $\times 10^5$	5 $\times 10^3$	0	0	0
R-53	17 "	12 "	0	0	0
R-54	21 "	1 $\times 10^5$	0	0	0
R-57	37 "	90 $\times 10^3$	2 $\times 10^3$	0	0
R-55	13 "	32 "	0	0	0
R-67	15 "	46 "	1 $\times 10$	0	0
R-4	51 "	2 $\times 10^5$	0	0	0
R-61	17 "	77 $\times 10^3$	0	0	0
R-11	15 "	82 "	0	0	0
R-46	18 "	113 "	0	0	0
R-34	14 "	99 "	0	0	0
R-36	14 "	105 "	0	0	0
R-52	69 $\times 10^4$	61 "	0	16 $\times 10^2$	0
R-12	63 $\times 10^3$	8 "	0	0	0
R-75	15 $\times 10^5$	2 $\times 10^5$	1 $\times 10^4$	0	0
R-45	13 "	2 "	22 $\times 10^3$	0	0
R-59	36 "	6 "	0	0	0
R-74	10 "	2 "	30 $\times 10^3$	1 $\times 10^2$	0
R-38	82 "	13 "	5	0	0
R-44	47 "	9 "	15 $\times 10$	0	0
R-9	27 "	6 "	48 $\times 10^3$	0	0
R-58	28 "	6 "	4 $\times 10^4$	0	0
R-22	17 "	4 "	30 $\times 10$	0	0
R-84	20 $\times 10^4$	50 $\times 10^3$	0	0	0
R-32	116 $\times 10^5$	33 $\times 10^5$	81 $\times 10^3$	0	0
R-48	97 "	31 "	0	2	0
R-43	49 "	16 "	6 $\times 10$	0	0

表 2 Ethambutol耐性度の分布 (I) (Population の構成と Variant の数)

菌 株	接 種 菌 数	濃 度			
		E 1.25 γ	B 2.5 γ	5.0 γ	10.0 γ
R-63	11 $\times 10^5$	4 $\times 10^5$	0	0	0
R-40	36 "	13 "	33 $\times 10$	0	0
R-19	51 "	19 "	8 $\times 10^3$	1	0
R-41	7 "	3 "	6 $\times 10$	0	0
R-30	48 "	19 "	49 $\times 10^4$	0	0
R-1	39 $\times 10^4$	16 $\times 10^4$	6 $\times 10^3$	0	0
R-71	91 $\times 10^5$	38 $\times 10^5$	6 $\times 10$	0	0
R-18	94 "	41 "	3 $\times 10^3$	0	0
R-37	51 "	23 "	10 "	0	0
R-31	141 "	66 "	10 $\times 10^4$	0	0
R-17	38 "	21 "	0	0	0

菌 株	接 種 菌 数	濃 度			
		E 1.25 γ	B 2.5 γ	5.0 γ	10.0 γ
R-8	40 "	22 "	2 \times 10	0	0
R-2	25 "	14 "	12 \times 10 ⁵	0	0
R-21	113 "	70 "	8 \times 10 ⁴	3	0
R-82	24 \times 10 ⁴	2 "	34 \times 10 ³	0	0
R-83	63 "	4 "	26 "	0	0
R-28	25 \times 10 ⁵	16 "	71 \times 10 ⁴	1	0
R-35	91 "	62 "	4 \times 10	0	0
R-47	40 "	27 "	28 \times 10 ³	0	0
R-7	92 "	66 "	0	1 \times 10 ²	0
R-85	30 "	22 "	24 \times 10 ⁴	0	0
R-80	4 "	3 "	12 \times 10 ³	0	0
R-42	71 "	53 "	95 \times 10 ⁴	0	0
R-79	9 "	7 "	33 \times 10 ³	0	0
R-81	52 \times 10 ⁴	4 "	1 \times 10	0	0
R-73	13 "	100 \times 10 ³	5 \times 10 ³	0	0
R-78	81 "	7 \times 10 ⁵	19 \times 10 ⁴	1	0

表3 Ethambutol 耐性度の分布 (II) (Population の構成と Variant の%)

菌 株	濃 度			
	E 1.25 γ	B 2.5 γ	5.0 γ	10.0 γ
R-3	0.4 %	0 %	0 %	0 %
R-53	0.7	0	0	0
R-54	2.4	0	0	0
R-57	2.4	0.05	0	0
R-55	2.5	0	0	0
R-67	3.1	t	0	0
R-4	4.0	0	0	0
R-61	4.7	0	0	0
R-11	5.5	0	0	0
R-46	6.5	0	0	0
R-34	7.1	0	0	0
R-36	7.5	0	0	0
R-52	8.8	0	0.02	0
R-12	12.7	0	0	0
R-75	13.8	0.7	0	0
R-45	15.4	1.7	0	0
R-59	15.5	0	0	0
R-74	15.8	3.1	0.05	0
R-38	16.0	t	0	0
R-44	18.3	0.003	0	0
R-9	20.8	1.8	0	0
R-58	21.8	1.5	0	0
R-22	23.5	0.02	0	0
R-84	25.7	0	0	0

菌 株	濃 度			
	E 1.25γ	B 2.5γ	5.0γ	10.0γ
R-32	23,5	0,7	0	0
R-48	31,6	0	t	0
R-43	31,6	0,001	0	0

図1 Ethambutol 耐性度の分布

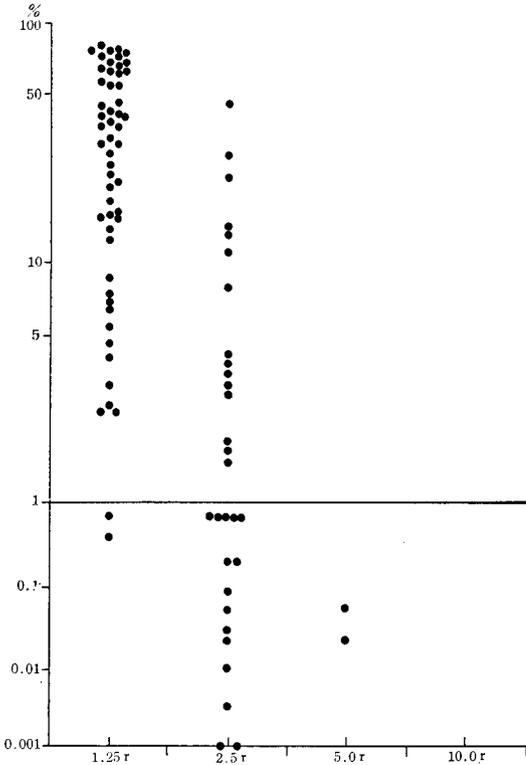


表4 Ethambutol 耐性度の分布 (II)
(Population の構成と Variant の%)

菌 株	濃 度			
	E 1.25γ	B 2.5γ	5.0γ	10.0γ
R-63	33.3%	0 %	0 %	0 %
R-40	36.5	0.09	0	0
R-19	37.3	0.2	t	0
R-41	38.5	0.01	0	0
R-30	40.0	10.2	0	0
R- 1	41.6	1.4	0	0
R-71	41.8	t	0	0
R-18	43.1	0.03	0	0
R-37	45.5	0.2	0	0
R-31	46.6	0.7	0	0
R-17	54.0	0	0	0
R- 8	55.0	t	0	0
R- 2	56.0	46.0	0	0
R-21	62.2	0.7	t	0
R-82	62.5	14.0	0	0
R-83	63.5	4.1	0	0
R-28	64.0	28.2	t	0
R-35	67.6	t	0	0
R-47	68.4	0.7	0	0
R- 7	71.2	0	t	0
R-85	73.3	8.0	0	0
R-30	75.0	2.9	0	0
R-42	75.2	13.5	0	0
R-79	76.5	3.8	0	0
R-31	76.9	0.001	0	0
R-73	76.9	3.5	0	0
R-78	80.2	22.8	t	0

t < 0.001%

た。これらの成績から、CPMでは耐性 Variant の分布が1.25γ/mlから100γ/mlに亘って広く分布し、ある段階で耐性 Variant が急激に減少することはないように思われる。とくに表6と8の最後に記載した菌株 R-36は何れの濃度の耐性培地にもきわめて多数のコロニーを示しており、CPM 初回高度耐性株と思われ、図2ではとくに白丸を用いて示した。

以上の成績を集計して、EB と CPM について各薬剤濃度の培地における Variant の Population に占める比率が0.01%以上を示すものから50%以上のもの迄6段階に分けて、それに該当する菌株の割合をパーセントで示し、さらに各濃度の耐性培地に生えた Variant の比率の中央値、平均値および最大値を求めて表わしたのが表9である。これで見ると、比率を0.01%におくと、

EB では1.25γ/mlで100%、2.5γ/mlで51.9%、5γ/mlで3.7%、10γ/mlで0%の菌株がこれに該当し、比率を0.1%以上とおけば、1.25γ/mlで100%、2.5γ/mlで100%、5γ/mlで42.6%のものがこれに該当し、5γ/mlでは該当する菌株はみられない。

一方 CPM では、比率を0.01%以上とおくと12.5γ/mlで100%、25γ/mlで82.4%、50γ/mlで39.2%、100

表5 Capreomycin 耐性度の分布 (I) (Population の構成と Variant の数)

菌 株	接 種 菌 数	濃 度			
		C	P	M	濃 度
		12.5 γ	25.0 γ	50.0 γ	100.0 γ
R-42	71 $\times 10^5$	3 $\times 10^3$	1 $\times 10$	4	5
R-74	10 "	3 "	0	0	0
R-81	52 $\times 10^4$	3 "	9 $\times 10$	2	0
R-40	36 $\times 10^5$	25 "	3 "	30	17
R-59	36 "	31 "	5 "	4	2
R-9	27 "	29 "	22 $\times 10^3$	25	3
R-30	48 "	2 $\times 10^5$	4 $\times 10$	1	2
R-75	15 "	64 $\times 10^3$	9 $\times 10^3$	2 $\times 10^2$	1
R-3	11 "	65 "	9 "	0	0
R-12	63 $\times 10^3$	8 "	0 "	0	0
R-50	4 $\times 10^5$	51 "	14 $\times 10$	—	3
R-70	51 "	10 $\times 10^5$	13 $\times 10^3$	—	9
R-80	4 "	1 "	91 "	74 $\times 10^2$	5
R-38	82 "	21 "	0	7	6
R-8	40 "	12 "	32 $\times 10^3$	—	2
R-35	91 "	28 "	2 $\times 10$	5	3
R-66	64 "	23 "	19 $\times 10^4$	—	7
R-48	97 "	45 "	40 $\times 10^3$	10 $\times 10^2$	0
R-72	85 "	44 "	105 $\times 10^4$	—	—
R-44	47 "	26 "	32 $\times 10^3$	115	2
R-22	17 "	10 "	14 "	4	5
R-84	20 $\times 10^4$	110 $\times 10^3$	32 "	58	17
R-79	9 $\times 10^5$	5 $\times 10^5$	33 $\times 10^4$	66 $\times 10^2$	42
R-53	17 "	10 "	0	0	0
R-4	51 "	30 "	44 $\times 10^4$	—	12
R-57	37 "	23 "	21 "	4	3
R-47	41 "	25 "	20 $\times 10^5$	19 $\times 10^3$	1 $\times 10$

表6 Capreomycin 耐性度の分布 (I) (Population の構成と Variant の数)

菌 株	接 種 菌 数	濃 度			
		C	P	M	濃 度
		12.5 γ	25.0 γ	50.0 γ	100.0 γ
R-56	29 $\times 10^5$	18 $\times 10^5$	13 $\times 10^4$	1 $\times 10^2$	4
R-83	63 $\times 10^4$	4 "	11 $\times 10^3$	1 "	1
R-21	113 $\times 10^5$	72 "	19 $\times 10^5$	11 "	141
R-45	34 "	23 "	15 "	24 $\times 10^3$	5
R-55	13 "	9 "	3 $\times 10$	—	0
R-73	13 $\times 10^4$	98 $\times 10^3$	43 $\times 10^3$	3 $\times 10^2$	29
R-65	45 $\times 10^5$	31 $\times 10^5$	8 $\times 10^4$	0	0
R-17	38 "	29 "	72 $\times 10^3$	2 $\times 10^3$	15
R-7	21 "	17 "	11 $\times 10^5$	6 $\times 10^4$	12 $\times 10^2$
R-82	24 $\times 10^4$	2 "	69 $\times 10^3$	10 $\times 10^2$	16
R-43	49 $\times 10^5$	42 "	23 "	80	54

菌 株	接 種 菌 数	濃 度			
		C	P	M	
		12.5 γ	25.0 γ	50.0 γ	100.0 γ
R-54	21 "	19 "	40 $\times 10^4$	13 $\times 10^8$	2
R-19	21 "	19 "	10 $\times 10^5$	72 $\times 10^2$	57 $\times 10$
R-58	28 "	27 "	92 $\times 10^3$	2	4
R-41	47 "	45 "	44 $\times 10^5$	12 $\times 10^4$	62 $\times 10$
R-61	17 "	16 "	120 $\times 10^3$	—	1
R-62	84 "	81 "	35 $\times 10^5$	45 $\times 10^3$	8 $\times 10$
R-34	14 "	15 "	30 $\times 10^4$	4 $\times 10^2$	97
R-78	81 $\times 10^4$	9 "	49 "	61 "	81
R-28	20 $\times 10^5$	23 "	19 $\times 10^5$	5 $\times 10^4$	11 $\times 10^5$
R-33	17 $\times 10^6$	19 $\times 10^6$	8 $\times 10^6$	16 "	6 $\times 10^3$
R-49	124 $\times 10^4$	15 $\times 10^5$	14 $\times 10^4$	3 $\times 10^3$	46
R-63	11 $\times 10^5$	13 "	6 $\times 10^3$	0	0
R-85	30 "	37 "	31 $\times 10^4$	52 $\times 10^2$	122
R-36	32 $\times 10^5$	27 $\times 10^5$	26 $\times 10^5$	24 $\times 10^5$	40 $\times 10^4$

表7 Capreomycin 耐性度の分布 (II) (Population の構成と Variant の%)

菌 株	濃 度			
	C	P	M	
	12.5 γ	25.0 γ	50.0 γ	100.0 γ
R-42	0.04 %	t %	t %	t %
R-74	0.3	0	0	0
R-81	0.5	0.02	t	0
R-40	0.7	t	t	t
R-59	0.9	t	t	t
R-9	1.1	0.8	t	t
R-30	4.4	t	t	t
R-75	4.4	0.6	0.001	t
R-3	5.8	0.8	0	0
R-12	9.5	0	0	0
R-50	14.4	0.04	—	t
R-70	18.8	0.2	—	t
R-80	25.0	22.8	1.9	0.001
R-38	25.2	0	t	t
R-8	28.8	0.8	—	t
R-35	30.8	t	t	t
R-66	35.9	2.9	—	t
R-48	46.6	0.4	0.01	0
R-72	51.8	12.4	—	—
R-44	54.8	0.7	0.002	t
R-22	55.9	0.8	t	t
R-84	56.2	16.4	0.03	0.009
R-79	58.8	38.2	0.8	0.005
R-53	58.8	0	0	0
R-4	59.4	8.6	—	t
R-57	60.8	5.5	t	t
R-47	61.7	48.1	0.5	t

t < 0.001%

表8 Capreomycin 耐性度の分布 (II) (Population の構成と Variant の%)

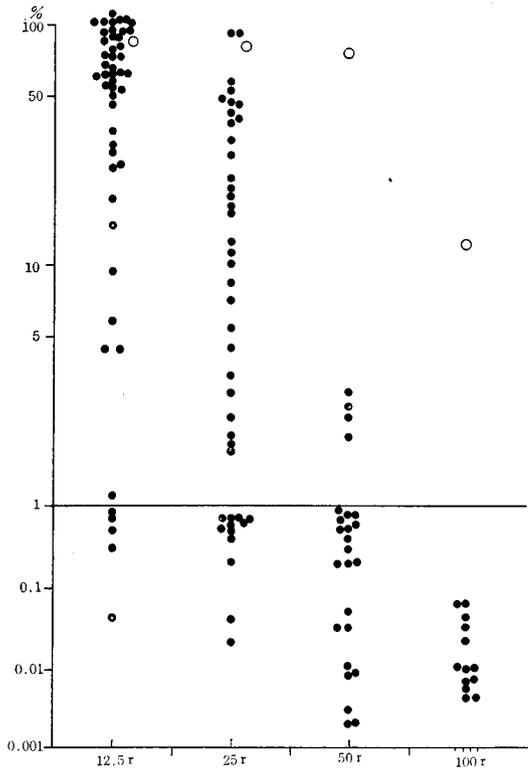
菌 株	濃 度			
	C 12.5 γ	P 25.0 γ	M 50.0 γ	濃 度 100.0 γ
R-56	62.1 %	4.5 %	0.003 %	t %
R-83	63.5	1.7	0.008	t
R-21	64.0	16.8	0.009	0.001
R-45	66.2	42.7	0.7	t
R-55	69.2	2.3	—	0
R-73	75.4	33.1	0.2	0.02
R-65	75.6	1.8	0	0
R-17	76.3	1.9	0.05	t
R- 7	80.5	53.7	2.9	0.06
R-82	83.3	28.5	0.4	0.006
R-43	85.7	0.5	0.002	0.001
R-54	90.5	19.1	0.6	t
R-19	90.5	47.6	0.3	0.03
R-58	96.4	3.4	—	t
R-41	96.8	93.5	2.5	0.01
R-61	97.0	7.2	—	t
R-62	97.0	41.3	0.5	0.001
R-34	103.6	21.1	0.03	0.007
R-78	104.9	56.9	0.8	0.01
R-28	112.5	92.5	2.3	0.06
R-33	115.2	48.5	0.9	0.04
R-49	116.9	11.3	0.2	0.004
R-63	119.0	0.5	0	0
R-85	123.3	10.2	0.2	0.004
R-36	85.7	80.9	74.6	12.7

t < 0.001%

表9 Ethambutol と Capreomycin の耐性度分布の分析

Variant の Population に占める割合	E B 濃 度				C P M 濃 度			
	1.25 γ	2.5 γ	5 γ	10 γ	12.5 γ	25 γ	50 γ	100 γ
> 0.01 %	100 %	51.9%	3.7 %	0 %	100 %	82.4	39.2%	13.7%
> 0.1 %	100	42.6	0	0	98.0	78.4	31.4	0
> 1 %	96.3	29.6	0	0	90.2	58.8	7.8	0
>10 %	75.9	11.1	0	0	80.4	39.2	0	0
>20 %	63.0	5.6	0	0	76.5	27.5	0	0
>50 %	31.5	0	0	0	64.7	7.8	0	0
中 央 値	32.4	0.01	0	0	60.8	2.9	0.001	0.002
平 均 値	35.4	3.2	0.001	0	57.6	15.8	0.3	0.005
最 大 値	80.2	46.0	0.05	0	123.3	93.5	2.9	0.06

図2 Capreomycin 耐性度の分布



r/ml で 13.7% と可成り高い比率の菌株がこれに該当し、ついで比率を 0.1% 以上とおけば 12.5r/ml で 98%, 25r/ml で 78.4%, 50r/ml で 31.4% が該当し、100r/ml ではじめて該当する株は認められなくなる。一方 Variant の Population に対する比率を薬剤濃度別にみると、例えば EB 2.5r/ml では中央値、平均値、最大値がそれぞれ 0.01%, 3.2%, 46.0% であり、5r/ml ではそれぞれ 0%, 0.001%, 0.05% であり、また CPM では濃度 25r/ml で比率の中央値、平均値、最大値がそれぞれ 2.9%, 15.8%, 93.5% と何れも高く、50r/ml でそれぞれ 0.001%, 0.3%, 2.9% を示している。

以上の成績を以前にこれらの 2 剤を除く他の抗結核薬について報告した Canetti の成績と比較して示したのが表 10, 表 11 である。

表 10 の中、INH, SM, PAS および Tbl の成績は Canetti が記述したものであるが、彼は所謂抗結核一次薬の耐性の基準濃度を INH で 0.2r, SM で 4r, PAS で 0.5r おき、その濃度で耐性 Variant の Population に対する比率がともに 1% を超えるものを薬剤耐性とみなしている。そしてその根拠として薬剤の接種前に菌 Population 中に含まれる耐性 Variant が前述の比率に到達するために、例えば INH では最少 250 倍、平均

表 10 各種一次薬と Ethambutol との耐性基準の比較

薬 剤 と 濃 度	耐性基準	Variant の比率 (%)		増 殖 率	
		中央値	最大値	$\frac{A}{B}$	$\frac{A}{C}$
	A	B	C	D	E
INH					
0.1r	10 %	0.004	0.02	2500	500
0.2	1 %	0.0005	0.004	2000	250
SM					
2	100 %	0.5	10	200	10
4	1 %	0.004	0.04	250	25
PAS					
0.25	10 %	0.08	1	125	10
0.50	1 %	0.002	0.01	500	100
1	0.1%	0.0001	0.003	1000	33
Tb1					
1	100 %	0.1	30	1000	3
2	10 %	0.004	0.5	2500	20
5	1 %	0.002	0.05	500	30
(Canetti et al.)					
EB					
2.5r	10 %	0.01	46	1000	0.2
5	1 %	0	0.05	—	20

(五十嵐)

2,000倍増殖する事が必要であることを挙げている。表 10 に示すように、一次薬の 3 剤と二次薬の中の Tbl では、耐性基準濃度は比較的 low、又耐性基準の比率も低い、そして本実験で得られた EB の成績は、次の表 11 にみられる二次薬と異なり、耐性基準の薬剤濃度も Variant 比率もともに低く、この見地からすれば二次薬よりもむしろ一次薬の範疇に入るべきものと思われる。表 11 は Ethionamide (Th), Kanamycin (KM), Cycloserin (CS), Viomycin (VM), Pyrazinamide (PZA) については Canetti の成績を、別に CPM については本実験で得られた成績を示したものである。表で明らかのように、CPM の耐性 Variant の分布は Th, KM など所謂二次薬にきわめて近く、その耐性基準濃度を 50r/ml に、又基準の比率を 10% に置くことが妥当のように思われた。

考 察

結核化学療法に伴って必ず起る薬剤耐性の現象は、薬剤投与後の血中濃度、病巣の解剖学的構造、従ってその性状に伴う病巣内薬剤濃度、又生体内での薬剤の化学

表11 各種二次薬と Capreomycin との
耐性基準の比較

薬 剤 と 濃 度	耐性基準	Variantの比率 (%)		増 殖 率	
		中央値	最大値	$\frac{A}{B}$	$\frac{A}{C}$
		A	B	D	E
Ethionamide					
10 γ	100 %	3	9	33	11
20	10 %	0.2	0.5	55	20
30	1 %	0.01	0.01	100	20
Kanamycin					
20	100 %	4	30	25	3
30	10 %	0.1	2	100	5
40	1 %	0.005	0.1	200	10
Cycloserine					
20	100 %	1	10	100	10
30	10 %	0.05	2	200	5
40	1 %	0.001	0.07	1000	14
Viomycin					
20	100 %	0.7	8	140	12
30	10 %	0.2	2	50	5
40	1 %	0.002	0.07	500	14
Pyrazinamide					
20	50	0.15	10	330	5
100	10	0.02	2	500	5
(Canetti et al.)					
Capreomycin					
25 γ	100 %	2.9	93.5	35	1
50	10 %	0.01	2.9	10000	3
100	1 %	0.0002	0.06	5000	17

(五十嵐)

的变化にも関連している複雑な問題であるが、それら諸要因の中でも最も重要な因子と考えられるのが菌 Population 中に含まれる耐性 Variant の選択的増殖ということである。そしてこの考えに立つ時、化学療法以前の野生菌株中に含まれる Variant の分布状態を知ることこそ耐性発現という臨床上の重大問題に解決をもたらす緒口になりはしないであろうか。本実験はそうした意味で本道10ヶ所の療養施設から送られた約50株について菌 Population を EB と CPM についてしらべた。

まず Population をしらべる方法としての比率法について考察をすすめよう。今回の実験では療研の二次薬に対する初回耐性調査の要領に準じて耐性を4段階に絞った。即ち薬剤添加濃度を EB では1.25, 2.5, 5, 及

び10 γ /ml, CPM では12.5, 25, 50, 及び100 γ /mlとした。そして菌 Population の分析のためにはこの程度の段階が適当であろう。勿論、耐性の判定に鶏卵培地である1%酸性小川培地を用いた点にも問題があり、この点は、後で取り上げなければならないが、各濃度の耐性培地から明確なコロニー数を得るためには各耐性培地に少なくとも2段階の希釈菌液を接種しなければならず、仮りに今回の実験のように、耐性を4段階に限っても、1菌株につき1薬剤約20本の培地を必要とし、しかも用いられた菌の希釈で必ずしもコロニー算定ができるとは限らず、かかる場合には再度菌希釈を変えて実験を繰り返さなければならない。同じような欠陥は比率法が routine の検査法として用いられる場合にも当然起ることであり、Variant の正確な比率から耐性の判断を下すという理論上優れたこの方法も、手間と多数の培地を要するという点から実施されるに当たって躊躇せざるを得ないことになるのであろう。因に、昭和41年、43年に療研が初回耐性調査に用いた方法は、接種菌量は10⁻³と10⁻⁵mgの2段階としており、当然のことであるがこの程度では耐性 Variant の比率は把握できないので極く大雑把な耐性の判定法と言わざるを得ない。

第二に耐性培地に極めて小さいコロニーが遅れて生ずるという問題である。この現象は Canetti も SM, INH の Variant に関して述べて居り⁸⁾ 著者も、ことに PAS 低濃度耐性培地でしばしば経験したところであるが、今回もことに CPM の高濃度 (50 γ , 100 γ /ml) 培地にこのようなコロニーをしばしば認めた。

それは接種後4週では全くコロニーが見られず、6週以上を経て極めて微小なコロニーとして認められるのである。その原因としては、CPM が時間の経過につれて不活性化するということがまず考えられるが、もしそうであれば、CPM の低濃度の培地でも同様な現象が起る筈である。しかし事實は高濃度培地にもみ見られるのであって、このことは、やはり CPM 高濃度耐性 Variant が Population 中に高いパーセントで含まれており、ただその発育速度がきわめて遅いという事を示すものとして理解されよう。

第三に、二次薬としての EB と CPM の位置について考察を進めよう。まず EB では、耐性を1.25 γ /ml とすると Variant の比率が中央値32.4%, 最大値80.2%となり(表9), 2.5 γ /ml とすると、それぞれ0.01%, 46.0%, 又、5 γ /ml ではそれぞれ0%, 0.05%となった(表9, 表10)。そこで表10において Canetti が一次薬 SM, INH, PAS, と二次薬の一つ Tb1 について示している成績と比較しよう。この比率法では所定の耐性

基準濃度に対する Variant の比率が所定の値に達する迄の増殖率を重要視するので、薬剤未接触の野生株のもつ Variant の比率の中央値と最大値から計算し、表ではそれぞれ D, E で表わしてある。例えば、INH では基準濃度 0.27/ml, Variant の比率を 1% に定めると、D と E はそれぞれ 2000 と 250 ということになる。今回の EB について行なった実験では、基準濃度を 2.57/ml, 比率を 10% に置くと D, E はそれぞれ 1000 と 0.2 となり、耐性基準として適当と言えないことになる。そこで基準濃度を 57/ml, 比率を 1% に置くと D の値は得られなかったが E は 20 という値が得られ、恰度一次薬の SM, 二次薬の Tbl に近い成績であることが明らかにされた。つまり、EB は少なくとも Variant の分布状況からみて二次薬よりも寧ろ一次薬の範疇に入るものと思われる。ただ東村¹¹⁾によると耐性の上限が EB では比較的に低く親株の 5 倍に達するに過ぎぬとしており、この意味では上限の高い SM, INH, PAS, Tbl とは違うようである。

次に、CPM は、表 9, 表 11 に示すように基準濃度を 257/ml にとると Variant の中央値、最大値はそれぞれ 2.9%, 93.5% ときわめて高く、この場合基準の比率を 100% にすると増殖率 D, E はそれぞれ 35 と 1 となり、思わしい成績とは認めがたい。次に基準濃度を 507/ml にとると、中央値、最大値はそれぞれ 0.001%, 2.9% となり、この場合耐性基準を 10% とすると増殖率 D, E はそれぞれ 10000, 3 となり、同じ表で Canetti が示した他の二次薬に近い成績を得た。

最後に残る問題として、CPM の耐性測定に鶏卵培地を用いることの是非について考えたい。CPM の結核菌最小発育阻止濃度 (M. I. C) が用いる培地によって相当の開きがあることは、Robinson et al.¹²⁾, 小関¹³⁾, 杉山¹⁴⁾, 堂野前¹⁵⁾, 和田¹⁶⁾, 大川¹⁷⁾ らが報じており、この中、堂野前らは小川培地など鶏卵培地では CPM が卵黄に吸着され活性が著明に減弱すると述べ、大川らは CPM の抗菌力は加熱によって影響されないが、培地の pH によって左右され、磷酸塩の濃度の増大につれて弱まると述べている。

ともあれ、1% 酸性小川培地では他の培地たとえば Dubos 培地, Kirchner 培地, Kirchner 寒天培地、に比して M. I. C. が数倍乃至 10 数倍高値を示し、従って当然耐性も高く表われるわけである。しかし同様のことは他の二次薬、例えば Kanamycin¹⁵⁾, 最近世に現われて注目を惹いている Rifampicin¹⁸⁾ にも認められることで、M. I. C. 或いは耐性度を表わすとき、厳密には使用した培地を条件としなければならないということである。

う。それはともかく、小川培地にせよ、Loewenstein-Jensen 培地にせよ、鶏卵培地によりコロニー数を明確に捉えうること、汚染の危険性の少ない点などから、耐性 Variant の比率を知る上で、今回用いた方法は有利なものと考えてよいと思われる。

結 論

昭和 41 年に療研が実施した未治療患者分離株の一次薬耐性調査に際し、本研究所に、道内 10 ヶ所の療養施設から送附された 81 株の未治療患者由来の野生菌株のうち、それぞれ約 50 株について、著者は、細菌学的見地から、近時二次薬として使用されている EB, CPM に対する耐性分布を、1% 酸性小川培地を耐性培地として用いてしらべ、次の結論に達した。

1) Canetti の提案している比率法に基づく一次薬、二次薬の分類と対比してみると、EB はむしろ一次薬の範疇に入り、CPM は二次薬の範疇に入るものとみなされた。

2) これら 2 剤における臨牀的耐性判定基準は、1% 酸性小川培地を耐性培地として用いた場合、EB では、薬剤濃度 57/ml, 耐性 Variant の比率 1%, CPM では薬剤濃度 507/ml, 耐性 Variant の比率を 10% とすることが妥当ではないかと思われた。

3) CPM では 52 株中、初回高度耐性株とみなされるもの 1 株を得た。

擧筆するに当り、御校閲を賜わった、北大結研高橋義夫教授に深謝するとともに、この実験の計画、立案、実施につき、終始御指導、御教示頂いた有馬純助教授に満腔の御礼を申し上げ、更に、この実験に多大の御協力を頂いた山本健一助教授佐々木昭雄助手他、関係諸兄姉に厚く感謝申し上げます。

尚、本論文の要旨は、第 19 回北海道地方学会総会、および、第 44 回日本結核病学会総会で発表した。

文 献

- 1) Pyle, M. M.: Proc. Staff. Meet. Mayo Clin., 22, 465, 1947.
- 2) Yegian, D. and Vanderlinde, R. I.: J. Bact., 56, 117, 1948.
- 3) Mitchison, D. A.: Thorax., 5, 144, 1950.
- 4) Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tuberk., 65, 765, 1952.
- 5) Szybalski, W. and Bryson, V.: Ibid., 65, 768, 1952.

- 6) Cohn, M. L. Oda, V., Kovitz, C. and Middlebrook, G.: *Ibid.*, **70**, 465, 1954.
- 7) Middlebrook, G. : *Bull. Un. int. Tuberc.*, **26**, 185, 1956.
- 8) Canetti, G. et Grosset, J. : *Ann. Int. Past.*, **101**, 28, 1961.
- 9) Grosset, J. et Canetti, G. : *Ibid.*, **103**, 163, 1962.
- 10) Canetti, G., Rist, N. et Grosset, J. : *Rev. Tuberc. Pneumol.*, **27**, 217, 1963.
- 11) Tsukamura, M. : *Acta. Tuberc. Scand.*, **46**, 89, 1965.
- 12) Robinson, L. B., Wichelhanzen, R. H. : *Trans. 21st. Conf. Pulm. Dis., V. A. Armed Forces*, 351, 1962.
- 13) 小関勇一, 岡本茂広 : *Jap. J. M. Sc. & Biol.*, **16**, 31, 1963.
- 14) 杉山浩太郎 : *日結研報告* November, 1963.
- 15) 堂野前維摩郷, 井上幾之進 : *胸部疾患* **8**, 1080, 1964.
- 16) 和田退蔵 : *結核* **40**, 283, 1965.
- 17) 大川日出夫, 石黒早苗, 亀崎華家 : *日本胸部臨床* **25**, 316, 1966.
- 18) Grumbach, F. et Rist, N. : *Rev. Tuberc. Pneumol.*, **31**, 749, 1967.