各種結核化学療法剤の他剤耐性菌に対する静菌作用

〔第4編〕 Viomncin, Cycloserin, Kanamycin 耐性菌に対する各種結核化学療法剤の静菌作用

京都大学結核研究所化学療法部（主任　教授　内藤益一）
神　尾　　彰

（昭和33年12月20日受付）

内容抄録

前編迄に述べたと同様の観点に立つて，同様の方法で Viomycin (以下 VM), Cycloserine (以下 CS), Kanamycin (以下 KM) の3種の抗結核剤に対する耐性菌を作成し，各耐性菌について他種抗結核剤に対する感感性を親株と比較した結果次の成績を得た。

1) VM, CS 各耐性菌共に 10% 血清加 Kirchner 培地を用い増量継代培養法で分離し，KM 耐性菌は菌を 10γ KM 含有血清加 Kirchner 培地に約1ケ月培養した後，1%小川培地で分離した。之等の耐性菌は pH 6.5 の 10%血清加 Kirchner 培地に於いては親株に比し VM 耐性菌は 16～32倍，CS 耐性菌は2倍，KM 耐性菌は 10,000 倍以上の耐性を示した。

2) VM, CS 各耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性は親株と同様，KM 耐性菌は TBI に対しやや感受性低下の傾向を示したが，その他の抗結核剤に対しては親株と同様であつた。

緒　　論

第1編より第3編に亘り著者は人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株を用い，Streptomycin (以下 SM), para-Aminosalicylic-acid (以下 PAS), Isonicotinic-acid-hydrazide (以下 INAH), para-Acetoaminobenzaldehyde-thiosemicarbazone (以下 TBI), Cyanacetic-acid-hydrazide (以下 CAH), Pyrazinamidc (以下 PZA), Tetracycline (以下 TC), Sulfisoxazole (以下 SI) の8種の耐性菌（以下 $H_{37}RvR$ 株）を作成し，他種抗結核剤に対する感受性を原株の $H_{37}Rv$ 感受性株（以下 $H_{37}RvS$ 株）と比較したが，今回は Viomycin (以下 VM), Cycloserine (以下 CS) 耐性菌の他に，梅沢[1]により最近発見せられ新抗結核剤として注目を浴びている Kanamycin (以下 KM) 耐性菌に就いても同様の実験を行つた次第である。

VM は1950年米国の Veterans Administration のストマイ会議にて報告せられたもので，1951年に Ehrlich[2], Hobby[3], Youmans[4] 等により試験管内実験成績，Finaly[5] 等により動物実験成績，Werner, Tompsett[6] 等により臨床成績が Amer. Rev. Tuberc. 誌上に発表せられ注目を浴びたものである。VM 耐性菌に就いても Ehrlich[2] や Hobby[3] は耐性上昇は比載的緩徐ではあるがかなりの程度の耐性菌が出来る事を報告しており，高階[7] は $H_{37}Rv$ 株で，松田[8] は607株でかなりの耐性菌を得て Hobby 等の成績を裏づけている。

CS は1953年 R. L. Harned[9] 等により発見されたもので，1952年黒屋[10]により Orientmycin と名づけられた Antibiotic と同一物である事が判明している。その後多数の研究者により基礎的，臨床的研究がなされているが，CS の耐性獲得に就いては Renzetti[11], 海老名[12], 堂野前[13] 等は耐性菌出現を認めているが，何れも 50 γ/cc 以上の耐性菌は得られていない。第15回の Veterans Administration (1956)の結核化学療法会議に於いても M. M. Cummings は 10 γcc 以上の培地に増殖可能の菌を臨床上耐性菌と定義しているし，R. E. Moyer and W. S. Schwartz も同様に 10γ/cc 完全耐性を示す例を耐性例としている等，米国に於いては 10γ/cc 以上の培地に増殖する菌を CS 耐性菌と認める方向にある様である。

KM に就いては目下多数の研究者により協同研究が行われており，その基礎及び臨床成績の中間報告が第6回日本化学療法学会(1958)に

於いて 2，3 の研究者により行われ，略々 SM に匹敵する成績が得られている様である。我々[14]も同学会に於いてその成績の一部を報告した所である。併しながら KM 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性を検討した報告は目下の所見当らない様である。KMの耐性獲得に就いては当教室では国枝[15]が実験を行つており，その成績は後日発表の予定である。著者は国枝の実験中に得られた KM 耐性菌に就いても同様の実験を行う機会を得たのでその成績を報告する次第である。

実　　験

〔A〕耐性菌 ($H_{37}RvR$ 株) 作成に関する実験

Ⅰ　実験材料

1) 培地
2) 菌浮游液
} 第1編参照

Ⅱ　耐性菌作成方法及び其耐性の強さに就いて

1) VM 耐性菌($H_{37}RvR$-VM 株)

河盛[16]や我々[17]の報告にも見られる如く，VM は卵培地では加熱凝固操作により静菌力がかなり減退するので，耐性菌作成には専ら10%血清加 Kirchner 培地を用い増量継代培養法により行つた。その術式は第2編〔A〕Ⅱ. 3) の項に述べた方法と全く同様である。継代3代目頃より耐性の上昇が認められ，継代7代目には VM 50 γ 含有 Kirchner 培地に増殖する菌を得た。この VM 耐性菌の耐性度を原株の $H_{37}RvS$ 株と比較した成績は第1表に示す如くであり，16〜32倍の耐性度を示した。

2) CS 耐性菌 ($H_{37}RvR$-CS 株)

耐性菌作成にあたつては10%血清加 Kirchner 培地を用い増量継代培養法により行つた。

第1表　VM 耐性菌の耐性度

実験条件　　10%牛血清加 Kirchner 培地 (pH 6.5)，接種菌量 0.01 mg/cc 4週判定

実験回数	菌種 ＼ VM 濃度 γ/cc	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	対照	MIC
第一回	$H_{37}RvS$ 株	−	−	−	−	−	−	−	卌	卌	卌	3.13
	$H_{37}RvR$-VM 株	−	−	廾	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	100
第二回	$H_{37}RvS$ 株	−	−	−	−	−	−	廾	卌	卌	卌	6.25
	$H_{37}RvR$-VM 株	−	−	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	100

〔註〕 MIC……発育阻止最小濃度

第2表　CS 耐性菌の耐性度

実験条件　　第1表に同じ

実験回数	菌種 ＼ CS 濃度 γ/cc	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	対照	MIC
第一回	$H_{37}RvS$ 株	−	−	−	−	廾	卌	卌	卌	卌	卌	12.5
	$H_{37}RvR$-CS 株	−	−	−	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	25
第二回	$H_{37}RvS$ 株	−	−	−	−	廾	卌	卌	卌	卌	卌	12.5
	$H_{37}RvR$-CS 株	−	−	−	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	25

〔註〕 第1表に同じ

その術式は VM 耐性菌作成（前項）の時と全く同様である。継代培養5代目頃より耐性の上昇が認められたが，継代培養10代に於いても 12.5 γ 以上の耐性菌は分離出来なかつた。この CS 耐性菌の 10%血清加 Kirchner 培地での耐性度を見たのが第2表であり，原株に比し2倍程度の耐性である。

3）KM 耐性菌（H_{37}RvR-KM 株）

KM 10 γ/cc 含有 Kirchner 液体培地を作成し，滅菌した「硝子キヤップ」付大型試験管5本に夫々 5 cc 宛分注し，第1編〔A〕Ⅰ 2）の項で述べた如くにして作成した菌液を駒込ピペット（1 cc 22～25 滴）で5滴宛接種し，培養4週後管底にある菌を充分滅菌生理的食塩水で洗い，夫々1%小川培地に接種した。約1ヶ月にしてコローを認めたので，5コロニー程度別々に採取し，その各コロニーに就いて別々に10%血清加 Kirchner 培地に浮游させて菌膜をはらせて増菌した後，接種菌量 0.01 mg/cc の条件で10% Kirchner 培地で耐性検査を行つた所，第3表に示す如く KM 10,000 γ/cc 含有培地に尚増殖する超耐性株を分離し得た。即ち H_{37}RvS 原株に比し1万倍以上の耐性を獲得した菌である。

第3表　KM 耐性菌の耐性度

実験条件　　第1表に同じ

実験回数	KM 濃度 γ/cc / 菌種	10000	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	対照	MIC
第一回	H_{37}RvS 株	−	−	−	−	−	−	−	−	−	卄	1.25
	H_{37}RvR-KM 株	卄	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	>10000
第二回	H_{37}RvS 株	−	−	−	−	−	−	−	−	−	卌	1.25
	H_{37}RvR-KM 株	卄	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	>10000

〔註〕第1表に同じ

〔B〕耐性菌に対する諸種抗結核剤の静菌作用に関する実験

Ⅰ．実験材料及び実験方法

培養基
被検薬剤溶液
結核菌浮游液
実験術式
成績判定
｝第1編参照

Ⅱ．実験成績

前編にも述べた如く実験誤差を可及的に避ける為2回実験を行い，2回共差のあるものを有意のものとした。

1）H_{37}RvR-VM 株

H_{37}RvR-VM 株の他種抗結核剤に対する感受性を H_{37}RvS 株と比較した成績は第4表に示した如くである。

表の如く，H_{37}RvR-VM 株は KM に対して1回1管程度の感受性の低下を認めたが，他の1回に就いては同様の成績を示し，感受性の有意の差はないと考えられる。又その他の抗結核剤に対しても感受感受性の変化は全く認められなかつた。

2）H_{37}RvR-CS 株

H_{37}RvR-CS 株の他種抗結核剤に対する感受性の実験成績は第5表に示す如くである。

表に示す様に H_{37}RvR-CS 株は INAH, TBI に対して1回1管程度感受性が増す成績を得ているが，他の1回は同様の成績であるので感受性の有意の差はないと考えられる。又他の抗結核剤に対しても感受性の差は認められなかつたのである。

第4表　VM 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

実験条件　　10%牛血清加 Kirchner 培地 (pH 6.5), 接種菌量 0.01 mg/cc
INAH のみ 2 週判定, 他は 4 週判定

実験回数	菌種＼薬剤	SM	PAS	INAH	TBI	PZA	SI	CAH	CS	TC	KM
第一回	$H_{37}RvS$ 株	1.25	0.5	0.125	25	250	62.5	6.25	6.25	12.5	0.625
	$H_{37}RvR$-VM 株	1.25	0.5	0.125	25	250	62.5	6.25	6.25	12.5	1.25
第二回	$H_{37}RvS$ 株	2.5	0.5	0.125	25	250	62.5	6.25	6.25	12.5	1.25
	$H_{37}RvR$-VM 株	2.5	0.5	0.125	25	250	62.5	6.25	6.25	12.5	1.25

〔註〕 表の数値は発育阻止最小濃度 (γ/cc) を示す

第5表　CS 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

実験条件　　第4表に同じ

実験回数	菌種＼薬剤	SM	PAS	INAH	TBI	PZA	SI	CAH	VM	TC	KM
第一回	$H_{37}RvS$ 株	1.25	0.25	0.125	25	250	31.3	125	6.25	12.5	0.625
	$H_{37}RvR$-CS 株	1.25	0.25	0.06	12.5	250	31.3	125	6.25	12.5	0.625
第二回	$H_{37}RvS$ 株	2.5	0.25	0.06	25	250	62.5	62.5	6.25	12.5	1.25
	$H_{37}RvR$-CS 株	2.5	0.25	0.06	25	250	62.5	62.5	6.25	12.5	1.25

〔註〕 第4表に同じ

第6表　KM 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性

実験条件　　第4表に同じ

実験回数	菌種＼薬剤	SM	PAS	INAH	TBI	VM	PZA	SI	CAH	CS	TC
第一回	$H_{37}RvS$ 株	5.0	0.25	0.125	25	6.25	250	125	125	12.5	12.5
	$H_{37}RvR$-KM 株	5.0	0.5	0.06	50	6.25	250	62.5	125	12.5	12.5
第二回	$H_{37}RvS$ 株	2.5	0.5	0.06	25	6.25	250	125	125	6.25	12.5
	$H_{37}RvR$-KM 株	2.5	0.5	0.06	50	12.5	250	125	125	6.25	12.5

〔註〕 第4表に同じ

3) $H_{37}RvR$-KM 株

$H_{37}RvR$-KM 株の他種抗結核剤に対する感受性を $H_{37}RvS$ 株と比較した成績は第6表の如くである。

表の如くに KM 耐性菌は TBI に対し2回共1管差程度の僅かな感受性低下を認めた。その他 PAS, VM 及び INAH, SI に対し1回は1管差の感受性の低下又は増加を認めたが，他の1回に於いては同様の成績であるので，感受性の有意の差はないと考えられる。その他の

抗結核剤に対しても感受性の変化は全く認められなかつた。

総括並びに考按

著者は VM, CS, KM 3種の抗結核剤に対してその耐性菌を作成し，他種抗結核剤に対する感受性に就いて検討を加えた。

先ず VM 耐性菌に就いてみると，VM 耐性菌の他種抗群核剤に対する感受性を検討した文献は著者の渉猟した文献の範囲では意外に少く，之は VM が未だ日常臨床で長期に使用される事が少く，従つて耐性菌と云う事があまり問題にならない為かと考えられる。即ち SM に対しては松田[8]が，INAH に対して Hobby 等[18]が，TC に対して Hobby 等[19]が，CS に対して Cuckler[20] 等が感受性を感受性菌と比較し，何れも略々同様の感受性であると述べている。著者は第4表に示した如く，10種の抗結核剤に対して感受性の検討を加えたが，何れの薬剤に対しても感受性株との有意の差を見出し得ず，諸家の報告と一致した成績を得た。

次に CS 耐性菌の他種抗結剤に対する感受性であるが，前述した如く CS 耐性菌と云つても数倍程度の耐性を獲得した菌しか得られない。この為か CS 耐性菌の他種抗結核剤に対する感受性を検討した報告は見られないようである。著者の得た耐菌も2倍程度の耐性を得たものであり，この菌に就いて行つた成績では何れの薬剤に対しても感受性の変化は認められなかつた。

次に KM 耐性菌に就いてであるが，人型結核菌の KM 耐性獲得に関する報告が目下の所見られないので，著者の実験成績よりして KM 耐性獲得の様式を検討して見たいと思う。

実験〔A〕II　3）の項で述べた如く，著者は10％血清加 Kirchner 培地を用い，原株に比し1万倍以上の耐性を獲得した耐性菌の分離に成功しているので，この実験成績よりすれば KM 耐性獲得の様式は Demerec[21] の SM 型に属するものと考えられ，SM 同様超耐性株を得る事が可能である。この点 KM は全く SM と同部類に属するものと云える。

著者はこの KM 超耐性株を用い，他種抗結核剤10種に対する感受性を原株と比較検討したが，かかる報告は今の所見られないようである。著者はこの実験により KM 超耐性株は1管差で軽度ではあるが TBI に対しやや感受性の低下を認めたが，その他の薬剤に対しては感受性の変化は認められなかつた。

結　　論

著者は第1編，第2編，第3編に引続き $H_{37}Rv$ 感受性菌より作成した VM, CS, KM 耐性菌に就いて10％牛血清加 Kirchner 培地（pH 6.5）を用い，接種菌量 0.01 mg/cc 条件で夫々他種抗結核剤10種に対する感受性を比較検討した結果，次の結論を得た。

〔I〕 VM 耐性菌

1）10％ Kirchner 培地（pH 6.5）で増量継代培養法で継代約7代にて VM 50 γ 含有 Kirchner 培地に尚増殖する菌を分離したが，之は原株に比し16〜32倍の耐性を獲得した菌である。

2）この VM 耐性菌は他種抗結核剤10種に対し原株に比し感受性の変化を認めない。

〔II〕 CS 耐性菌

1）VM 耐性菌と同様の方法で耐性菌の分離を試みたが，継代10代にて CS 12.5 γ 含有 Kirchner 培地に増殖する菌しか得られず，この菌は原株に比し2倍の耐性であつた。

2）この CS 耐性菌は他種抗結核剤10種に対し感受性の変化を示さなかつた。

〔III〕 KM 耐性菌

1）KM に対する $H_{37}Rv$ 株の耐性獲得の様式は Demerec の SM 型に属するものと考えられ，原株に比し1万倍以上の耐性を獲得した超耐性株の分離にも成功した。

2）KM 超耐耐株の他種抗結核剤10種に対する感受性を原株と比べると，TBI に対し1管差ではあるがやや感受性低下を認めた他は何れの薬剤に対しても感受性に有意の変化は認められなかつた。

（擱筆するに当り終始御指導，御援助を賜つた津久間博士に深謝の意を表します。）

文　　献

1) 梅沢浜夫：綜合医学，14：988，1957
2) Ehrlich, J., Smith, R. M., et al.: Amer. Rev. Tuberc., 63 : 7, 1951
3) Hobby, G. L., Lenert, T. F., et al.: Amer. Rev. Tuberc., 63 : 36, 1951
4) Youmans, G. P. and Youmans, A. S.: Amer. Rev. Tuberc., 63 : 25, 1951
5) Finaly, A. C., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 63 : 1, 1951
6) Werner, C. A., Tompsett, R., et al.: Amer. Rev. Tuberc., 63 : 49, 1951
7) 高階二郎：抗酸菌病研究雑誌，10：108，1954
8) 松田健吉：広島医学，5：276，1957
9) Harned, R. L., et al. : Antibio. & Chemother., 5 : 204, 1955
10) 黒屋英夫：J. of Antib., V-12 : 682, 1952
11) Renzetti, A. D., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 74 : 128, 1956
12) 海老名敏明，他：日本臨床結核，16：30，1957
13) 堂野前維摩郷，他：日本臨床，15：661，1957
14) 内藤益一，他：第6回日本化学療法学会総会（1958）にて発表，
15) 国枝義治：未発表
16) 河盛勇造，他：診療，7：904，1954
17) 津久間俊次，他：胸部疾患発表予定
18) Hobby, G. L., Lenert. T. F. : Amer. Rev. Tuberc., 65 : 771, 1952
19) Hobby, G. L., Lenert, T. F. : Amer. Rev. Tuberc., 72 : 367, 1955
20) Cuckler, A. C., et al. : Antibio. & Chemother., 5 : 191, 1955
21) Demerec, M. : J. Bact., 56 : 63, 1948