

7年間1%小川培地に継代保存した耐性結核菌 の耐性度の変化について

京都大学結核胸部疾患研究所内科学第一部門

山鳥 英世, 柴田 安宅, 稲掛 英男

(昭和59年2月3日受付)

I 緒 言

結核化学療法の最終的な目標は生体内の結核菌を根絶することにある。しかし、今日の streptomycin (SM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP) を主軸とする強化化学療法をもってしても、生体内結核菌のすべてを殺菌することはまことに困難である。結核の再発、悪化を論じる場合、外因性再感染がなければ、生体内のいわゆる生残菌 (persisters) が問題になる。この生体内で生残している結核菌の薬剤感受性は長い年月を経過しても変化しないものであろうか。この問題に対するひとつの手がかりとして著者らは、試験管内で増量継代法により作製した H37Rv 薬剤耐性菌株を、4週毎に1%小川培地に、7年間にわたり継代保存し、これらの薬剤耐性菌株をもちいて、それぞれの薬剤に対する耐性度を再検査した。同時にアミノ配糖体およびポリペプチド系抗生物質については交叉耐性の変化の有無をも検討した。すなわち、同一の手技で実施された継代開始前と、7年継代後の薬剤耐性菌株の耐性度を比較検討したので、その概要を報告する。

II 実験材料及び実験方法

A) 実験材料

菌株：試験管内で増量継代法により作製した SM, kanamycin (KM), viomycin (VM), capreomycin (CPM), enviomycin (EVM), それぞれ 1 mg/ml 耐性の H37Rv 株, および, ethiona-

imide (TH), 125 mcg/ml, cycloserine (CS) 62 mcg/ml, para-aminosalicylic acid (PAS) 125 mcg/ml, INH 125 mcg/ml, ethambutol (EB) 500 mcg/ml, RFP 125 mcg/ml 耐性の H37Rv 株を約4週ごとに、1%小川培地に7年間継代したものを使用した。

培地：10%ウシ血清を加えたキルヒナー培地 (pH ca. 6.5) を使用した。

シリコン被覆スライド：東の方法¹⁾により作製した。シリコン被覆スライド (silicone-coated slide, 以下 SS と略す) とはスライドガラスに所定の処理を加えてその表面をシリコンの薄膜で被覆したもので、スライドガラスは普通のスライドガラスを縦に3切したもの (9×75 mm) を使用した。すなわち、上記のスライドガラスをクロム硫酸中に24時間浸漬後、流水中で洗浄したものを、室温で乾燥させ、次いでこれを粘度 350~500 centistokes の dimethyl silicone (Dow Corning 社製 “DC 200 Fluid”) の2% (V/V) クロロホルム溶液に約1分間浸漬後、室温で1~2時間風乾し、300°C, 1時間熱処理を加えたものである。

B) 実験条件及び実験方法

1) 菌液および菌接種方法：上述の1%小川培地上に発育した耐性菌株に約7mlの石油ベンジンを加え、よく振盪して菌液とし、これを別の試験管に移し、2~3分間静置して粗大菌塊を沈殿せしめた後、上清を他の試験管に移し、硫酸バリウム標準液と肉眼的に比濁することによって約0.1 mg/mlの石油ベンジン菌液を作

製した。池田の方法²⁾, すなわち, 実験に必要な数の SS を縦に並列させることのできる金属製の網セット (1つのセットに50枚の SS を並列できる, つまり 50枚の SS を同時に同じ深さで浸漬できる) を使用することによって, 上記のベンジン菌液中に SS を同時に数秒間浸漬して結核菌を付着させた。

2) 薬剤: SM, KM, VM, CPM, EVM は蒸留水で 10 mg/ml まで希釈した。その後は培地を用いて希釈した。PAS, EB は70%エチールアルコールを用いて溶解希釈した。TH はプロピレングリコールを用いて溶解希釈して 1 mg/ml とし, その後は培地を用いて希釈した。CS は蒸留水で溶解希釈して 1 mg/ml とし, その後は培地を用いて希釈した。RFP の溶解希釈には dimethyl formamide (DFA) を用い, 1 mg/ml とし以後培地を用いて希釈した。

3) 薬剤作用温度: 37°C とした。

4) 実験操作: 各薬剤耐性菌株の検討に際し薬剤濃度はいずれも第1管を 1 mg/ml とし, 以後培数希釈法にて第19管まで倍数希釈した。第20管は薬剤を含まない対照とした。アミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の交叉耐性検

査も同様に第1管を 1 mg/ml とし, 以後倍数希釈法にて第19管まで倍数希釈し, 第20管は対照とした。これらの各試験管に結核菌の付着した SS を1枚ずつ投入した。

5) 判定方法: 4週後に実施した。肉眼的に観察して SS 上に発育した結核菌の集落が SS 表面積 (SS のベンジン菌液付着部分) の2/3以上を被うとき(卅), 2/3~1/3のとき(十), 1/3以下のとき(+), 集落数 100以下の場合には大略その数を記録した。

III 実験成績

各薬剤耐性株の保存前後の耐性度ならびにアミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の各薬剤間の交叉耐性成績を表 1, 2, 3, 4, 5, 6 に示した。表 1 の TH 125 mcg/ml 耐性株の継代保存後の耐性度は試験管番号で第6管, すなわち, 31.2 mcg/ml で, 保存前の耐性と比較し試験管にして2管の低下を認めた。同様に CS は3管, PAS は2管, INH は4管, RFP は1管の耐性低下を認めた。EB 500 mcg/ml 耐性株の継代保存後の耐性度は試験管番号で第7管, すなわち, 15.6 mcg/ml で, 試験管にして5管の低下

表1 各薬剤耐性株の耐性度 (継代保存前との比較)

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	C*
薬剤濃度	1000 [§]	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9	0.97	0.48	0.24	0.12	0.06	0.03	0.01	0.007	0.003	0
耐性菌株																				
TH 125※	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
H37Rv-St†	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
CS 62※	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
H37Rv-S	—	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
PAS 125※	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
H37Rv-S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅
INH 125※	—	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
H37Rv-S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 ⁱⁱ	+	卅
EB 500※	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
H37Rv-S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
RFP 125※	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
H37Rv-S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

※ 継代保存前の耐性度 (mcg/ml)

* 薬剤を含まない対照

† 感受性結核菌 (H37Rv)

§ mcg/ml

ii 集落实数

表2 アミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の SM に対する耐性

[illegible]

※ SM, KM, VM, CPM, EVM 耐性菌

表3 アミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の KM に対する耐性

[illegible]

表4 アミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の VM に対する耐性

[illegible]

表5 アミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の CPM に対する耐性

[illegible]

表6 アミノ配糖体およびポリペプチド耐性株の EVM に対する耐性

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	C
薬剤濃度	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9	0.97	0.48	0.24	0.12	0.06	0.03	0.01	0.007	0.003	0
菌 株																				
H37Rv-S	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SM-R	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KM-R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VM-R	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CPM-R	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EVM-R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

を認めた。

アミノ配糖体およびポリペプチド相互間の交叉耐性の成績では、表2のごとく SM に対しては SM-R は第1管より菌の発育を認めた。KM-R の耐性度は試験管番号で第14管、すなわち、0.12 mcg/ml であった。VM-R, CPM-R, EVM-R は第10管、すなわち、1.9 mcg/ml であった。KM に対しては SM-R は H37Rv-S と同様で耐性度は試験管番号第13管、すなわち、0.24 mcg/ml であった。KM-R, VM-R, CPM-R はいずれも第1管より菌の発育がみられた(表3)。VM に対しては SM-R, KM-R はほとんど H37Rv-S とかわからず、試験管番号第10管、すなわち、1.9 mcg/ml であった。VM-R は第3管、すなわち、250 mcg/ml であった。CPM-R, EVM-R は第4管、すなわち、125 mcg/ml であった(表4)。CPM に対しては SM-R は H37Rv-S と同様で第11管、すなわち、0.97 mcg/ml であった。KM-R は第7管、すなわち、15.6 mcg/ml であった。VM-R, CPM-R, EVM-R はいずれの場合も第1管より菌の発育が認められた(表5)。EVM に対しては SM-R で第9管、KM-R で第10管、それぞれ 3.9 mcg/ml, 1.9 mcg/ml の耐性度であった。VM-R は第3管、すなわち、250 mcg/ml の耐性度であった。CPM-R は第4管、すなわち、125 mcg/ml の耐性度であった。EVM-R は第1管より菌の発育が認められた(表6)。

IV 考 案

試験管内(増量継代法)で作成した TH, CS,

PAS, INH, EB, RFP 耐性諸菌株を1%小川培地に7年間継代し、これらの菌株の長期継代保存後の耐性を検討した。その結果、INH および EB 耐性菌株では耐性度の明らかな低下が認められた。他の耐性菌株では著明な耐性度の低下は認められなかった。

文献によれば、佐藤³⁾は試験管内で分離した INH 耐性 H37Rv 株は INH の存在の有無にかかわらず、小川培地で5代継代後ではその耐性菌 population に変化がなく、完全に INH 耐性を保持していたが、患者より分離した INH 耐性菌株では、INH を加えない小川培地に継代すると、その耐性菌の population に大きな変動を起す例もある、すなわち、耐性度の低下をきたす場合もあると報告している。一方、立花⁴⁾は KM 治療患者より分離した KM 100 mcg/ml 耐性株を、Dubos 液体培地を用いて、6代継代し、その後、KM 耐性検査を施行し、耐性の低下は認めなかったと報告している。また、大藤⁵⁾は H37Rv の INH 耐性株を小川培地に10代継代したが、耐性の低下は認められなかったし、同様に、SM 耐性株を14代継代しても、耐性の低下は認めなかったと報告している。すなわち、INH 耐性菌も population が均一であると容易には耐性低下は認められないのであって、臨床的にみられる耐性の自然低下は感性菌増殖による耐性菌の増殖制限にもとづく面が強いことがわかると結論している。

著者らも長期間継代培養後の耐性検査成績において、一部の薬剤耐性株を除き、著明な耐性度の低下を認めなかったのは、大藤⁵⁾の報告と

同様に各薬剤耐性株の population が均一であったためと考えている。

次に特に興味をもって検討したアミノ配糖体およびポリペプチド相互間の交叉耐性に関しても、長期継代保存による交叉耐性パターンの変化を、ほとんど認めなかった。

稲掛⁶⁾ はアミノ配糖体およびポリペプチド相互間の交叉耐性に関して、増量継代法を用いた高度耐性菌の交叉耐性検査成績を報告しているが、今回著者らの耐性検査成績もほぼ同様の実験成績であった。すなわち、7年間にわたり長期継代保存した耐性株においても交叉耐性パターンの変化を、ほとんど認めなかった。

V 結 語

試験管内で作成した各薬剤耐性菌株の耐性度は、1%小川培地で7年間継代培養後も、INH および EB 耐性株を除き、はっきりした低下を認めなかった。また、アミノ配糖体およびポリペプチド系抗生物質相互間の交叉耐性パターンについても変化を認めなかった。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御

鞭撻を賜った池田宣昭講師に深甚なる謝意を表する。

また、終始御協力頂いた研究室の西尾貞子、本間トキエの各氏に心から感謝する。

なお、本論文の要旨は第56回日本結核病学会総会で発表した。

文 献

- 1) 東向一郎：結核菌の Silicone-coated Slide Culture Method (SSC), 京大結研紀要, 7:増刊1号, 461, 1959.
- 2) 池田宣昭：結核化学療法剤の毎日投与法と間歇投与法との効果比較に関する試験管内実験的研究, 京大結研紀要, 12-1, 21, 1963.
- 3) 佐藤直行：Isonicotinic acid hydrazide 耐性結核菌 population の継代培養による変動, 医学と生物学, 31-5, 250, 1954.
- 4) 立花暉夫：結核菌のカナマイシン耐性に関する研究, 大阪大学医学雑誌, 11-10, 335, 1959.
- 5) 大藤真：結核菌薬剤耐性に関する実験的ならびに臨床的研究, 結核研究の進歩, 26, 188, 1959.
- 6) 稲掛英男：結核菌におけるアミノグリコシッドおよびポリペプチド系薬剤相互間の交叉耐性について, 結核, 55:281, 1980.

THE CHANGE IN DRUG RESISTANCE OF RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv STRAINS AFTER SUCCESSIVE TRANSFERS ON OGAWA MEDIUM FOR SEVEN YEARS

Hideyo YAMADORI*, Ataka SHIBATA and Hideo INAGAKE

*From the First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan*

Mycobacterium tuberculosis H37Rv strains resistant to various antituberculous drugs, originally made *in vitro*, had been successively transferred on 1% Ogawa medium for a prolonged period of time (every four weeks for seven years).

In vitro susceptibilities of the resistant strains were evaluated in comparison with the original susceptibilities previously done with the same method (silicone-coated slide culture method).

The degree of resistance to various antituberculous drugs (TH, CS, PAS, and PFP) showed

no significant changes after prolonged successive transfers, except INH and EB, which demonstrated more potent activities to the transferred strains than to the original strains.

The patterns of cross resistance of the transferred strains between various aminoglycoside and peptide antibiotics showed essentially no differences with those in the original strains.