

イソニコチン酸ヒドラジット治療患者の 喀痰中結核菌の耐性 population の変動

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)
佐 藤 直 行

(昭和 29 年 6 月 17 日受付)

イソニコチン酸ヒドラジット (INAH) 耐性結核菌は *in vitro* では容易に出現するが、*in vivo* の動物治療実験ではほとんど出現しない。特に後者の場合には Wolinsky, Steenken¹⁾ のストレプトマイシン (SM) パスの実験成績よりみて、動物体内では INAH 耐性結核菌の出現も期待できないであろう。INAH が肺結核症に対し著効を示す反面、その耐性菌が治療早期から相当高率に出現することは、内外の報告にみとめられている。しかし INAH 治療の研究が進むにおよび、治療中止後に一度出現した INAH 耐性菌が消失するともいわれる²⁾ 3)。

さらに INAH 耐性結核菌の菌力は、原株のそれに比べて弱いものもあるという^{4)~7)}。

このような成績から、INAH 耐性結核菌の出現が、単独治療の障碍となりその限界を劃すものとは考えられない。複雑な人体内で出現する INAH 耐性菌については、その出現・増減・消失という変動は、以上の事実を考えさらに研究を進めねばならぬと思う。しかしこの変動は、耐性検査上ほとんど細かく分析されていないけれども、population の面から追求すべきであつて、耐性菌の消失という事実も消失前後の population を比較して初めて断定できることである。

もつとも小酒井⁸⁾らは1日の喀痰中の菌数の消長と、耐性菌の出現増加との関係を報告しているが、全菌数中の耐性菌の率を推定する方法になお難点があり、耐性 population の変動については不明といつてよいであろう。

わたくしは継代培養によつておこる population の変動が、INAH 耐性検査におよぼす影響をさけるため⁹⁾、直接法による喀痰の希釈培養を行つた。5例の患者について喀痰中の INAH 耐性結核菌 population のうごきを、治療開始 26 週後まで追求して、耐性菌の出現、増減、消失の興味ある経過を知ることができたので、ここに報告しようと思う。

実験方法

検査対象：5例の空洞をもっている肺結核患者の喀痰を検査材料とした。これらの患者は INAH 治療以前に SM, PAS, Tb1 いずれかの治療をうけたことはあつても、INAH の治療はすべて初めてである。INAH の治療は5例ともに同時に開始し、その量は1日 200 mg の経口投与であつて、No. 22 の1例を除いて 26 週間単

独治療を行つている。

検査方法：耐性検査は直接法によつて、中試験管に分注してかためた 1% KH_2PO_4 培地(小川培地)を使つた。培地中の INAH の濃度は、0, 0.05, 0.5, 5% cc とした。10 cc を 100 に目もつてあるスピッツグラスに採取した喀痰に、4% NaOH 溶液を加えて2ないし5倍に希釈し、ピペットで十分均等化し、それから滅菌蒸溜水で 10 進法希釈によつて、最高 10^3 倍まで希釈した。この希釈した喀痰を 0.1 cc ずつ INAH を加えた小川培地 2 系列に流し培養した。

成績は培養 4 週後および 6 週後におよんだが、0.5, 5% cc の培地上に発育する集落は、4 週後より 6 週後の方が集落の形成が明瞭で、数も少しく増加する。それで 6 週後にある希釈濃度を培養して数えられた集落数から、喀痰 1 cc 中の生菌数を計算した。対照培地上に発生したものを総生菌数とし、0.05, 0.5, 5% cc の培地上に発育した集落数も、同じように喀痰 1 cc 中の生菌数で表わした。ただ INAH の高濃度の培地に低濃度のものにくらべて集落が多いときには、成績の図示の都合から両者の平均数をとることにした。投与開始前の喀痰中の総生菌数は測定できなかったが、開始後は 10 週までは 2 週毎に、10 週後からは 4 週毎に 26 週まで検査を行つた。なお今後しばらく追求の予定でいる。治療開始前の分離結核菌については、間接法で INAH 感受性検査を行つた。

表 1 INAH 治療開始前に分離した結核菌の
INAH 感受性検査成績

菌 株	接種生菌 単 位 数	INAH 濃度 (% cc)			
		5	0.5	0.05	0
No. 21	60×10^6	22	58	+ 3	+ 4
	30×10^5	0.5	1.5	19	+ 3
No. 22	260×10^5	26.5	57	+ 3	+ 4
	130×10^4	0	0	+ 1.5	+ 3
No. 24	190×10^5	56	+	+ 1.5	+ 4
	95×10^4	8.5	20	60	+ 3
No. 29	120×10^5	0	1	+	+ 4
	60×10^4	0	0.5	0.5	+ 3
No. 31	130×10^5	0	22	+	+ 4
	65×10^4	0	0.5	14	+ 3

小川培地使用、4 週培養後の判定

結核菌の発育量を肉眼的に +4, +3, +2, +とわけた

実験成績

治療開始前の分離結核菌 5 株の INAH 感受性検査の成績は表 1 に示した。すなわち小川培地継代 1 代 20 日培養菌によってつくった菌液 2mg, 0.1mg を培養した。この結果 0.1mg 中に 10^6 の生菌単位をふくむ菌液を培養して、0.05% の培地上に +1.5 から 0.5 の集落をみた。従つてこれら 5 株の結核菌は INAH 感受性菌であると考えられる。また 5% の培地上に集落をみたものは No.21, No.22, No.24 の 3 株であつたが、これもある程度 in vitro における偶然の結果ともみられる。

表 2 INAH 治療患者より分離した結核菌の INAH 耐性検査成績 No. 31 の場合

分離 週	接種量 (稀釈倍数)	INAH 濃度 (%/cc)			
		5	0.5	0.05	0
2	3×10^0	0	0	0	2.5
	3×10^2		0	0	0
4	5×10^0	2	9	9.5	+2
	5×10^2	0	2.5	1	57.5
	5×10^3		0	0	17
6	2×10^0	101	+0.5	+	+2
	2×10^2	23	18.5	60	82
	2×10^3				10
8	1.5×10^0	+	+	+2	+2
	1.5×10^2	125	140	+1.5	+1.5
	1.5×10^3	34	28	78	95
10	2×10^0	+2	+2	+3	+3
	2×10^2	+0.5	+0.5	+2	+2
	2×10^3	44	40	49	85.5
14	2×10^2	25	85	+2	+3
	2×10^3	6.5	10.5	62	+
	2×10^4	0	1	10.5	42
18	3×10^0	+	+	+3	+4
	3×10^2	25	22.5	+2	+3
	3×10^3	0	1	+1.5	+2
	3×10^4	0	0	37.5	24.5
22	2×10^0	+	+	+4	+4
	2×10^2	58.5	81.5	+3	+3
	2×10^3	8.5	21	+2.5	+2.5
	2×10^4	0	1.5	*(250)	(250)
26	3×10^0	0	18.5	+2.5	+3.5
	3×10^2	0	5.5	+2.5	+3
	3×10^3	0	2.5	+1.5	+1.5
	3×10^4	0	0	61	60

小川培地使用, 6 週培養後の判定

* 大略数の発生集落を示す

表 2 は実際検査の代表成績として No. 31 の場合を示した。この成績から喀痰 1cc 中の総生菌数, 0.05, 0.5, 5% の耐性菌数を算出した。均等化した喀痰を稀釈培養しても, 割合信頼できる定量培養が行われることはこの表から明らかである。

喀痰 1cc 中の総生菌数と, INAH 0.05, 0.5, 5% の培地上に発生した全生菌数の出現と消長の経過は図 1 に示す通りである。5 例のうちおくれ耐性菌の出現した No.21, No.29 の 2 例では, 耐性菌の消長は今後の経過を待たねばならない。No.22, No.24, No.31 の 3

例では早期に耐性菌が出現し, その増減ないし消失の経過をみる事ができた。

個々の例についてみると, まず No.21 の例では喀痰 1cc 中の総生菌数が, 2 週時には 10^5 の order であり, 4, 6, 8 週時には 10^2 とほぼ一定数を保ち, 10 週時には菌の分離ができなかつた。それが 14 週になつて急に 10^4 と増加し, 5% の耐性菌が 10^2 に 1 コの割合で出現した。18, 22 週時には再度総生菌数が 10^2 となり, 5% の耐性菌は証明できなかつたが, 26 週時には総生菌数が 10^5 の order となり, 5% の耐性菌もみとめられた。

No.29 の例では総生菌数が, 2 週時から 4, 6, 8 週と減少し, 10 週時には 10^3 近くなり, 14 週ではさらに増加して総菌数の一頂点となつてゐる。しかし 22 週時になつて初めて 5% の耐性菌が, 10^2 の生菌中に 1 コの割合でみとめられ, 26 週時にはさらにその分布の割合が増し, 菌数も増加していた。

No. 22 では 2 週時に約 10^6 の総生菌数をみたが, 4 週時には 10^3 と減少し, 6, 8 週時にはそれぞれ 10^4 , 10^6 と急に増加し, 以後 10^6 の総生菌数が常にみられた。もつともこの例では治療開始後 58 日目から 25 日間 INAH の投与が中止され, その後再び INAH の治療が 26 週まで続けられている。しかし 14 週から 22 週の間, SM 10g (14 週から 17 週まで) につづいて PAS 156g (17 週 + 4 日から 21 週 + 3 日まで) と INAH + SM, INAH + PAS の併用が行われている。18 週時に菌陰性という結果は, この併用薬剤の影響によるものと推察される。しかし 6 週時に 3 濃度の培地上に集落をみとめ, 8, 10 週とともにその菌数と総菌数中に占める分布の割合も多くなつた。10 週時のそれが頂点であつて 14 週時以後には 5% の耐性菌が, 22 週, 26 週では 0.5% のものがみとめられなくなつた。

No.24 の場合には 2 週時に 10^4 の order の排菌があつたが, 4 週時には菌の分離ができなかつた。これは排出菌数の最少の時期に相当していたためであろう。6 週時には再び 10^5 の総生菌数となり, 以後増加の傾向を示し, 14 週時には 10^6 の order となり, 以後 10^5 ないし 10^6 の総菌数をみている。6 週時に高率の分布を示していた 0.05, 0.5, 5% の培地上發育菌は, 10 週時までは総生菌数の増減と併行した消長をとつていた。しかし 14 週時には総生菌数中に占める分布の割合は 500 : 1 にひらき, これを最後に 5% の耐性菌は 26 週までみとめることができなかった。

No. 31 の成績では, 2 週時に 10^2 の総生菌数であつたものが, 4 週時には急に 10^5 となり, 以後 26 週まで次第に増加している。この場合 INAH 耐性菌の出現は最も早く, 4 週時に 5% の耐性菌が 10^3 に 1 コの割合でみとめられた。以後 6, 8, 10 週と菌数と分布の割

合も増加し 10 週では最高となつていた。

それが 14, 18, 22 週時には、耐性菌数には大きな変化がないにもかかわらず、総生菌数の増加があつて、耐性菌の総生菌中に占める割合は、それぞれ 70:1, 100:1, 300:1 とひらき 26 週時には 5 Y/cc の耐性菌がみつめられなくなった。

以上 5 例の実験成績から、一度出現した INAH 耐性結核菌は、その菌数の増加と population 中の割合が増加している時期のあるにもかかわらず、INAH 治療の経過中に全く小川培地上に分離できなくなるという、3 例の現象をみとめることができた。ただこの実験でとつた

0.05 Y/cc の培地上に発育して来る結核菌は、ときにお規則なカーブを示すことはあつても、まず総菌数のそれとはほぼ一致した増減を示すことが明らかにされた。

考 察

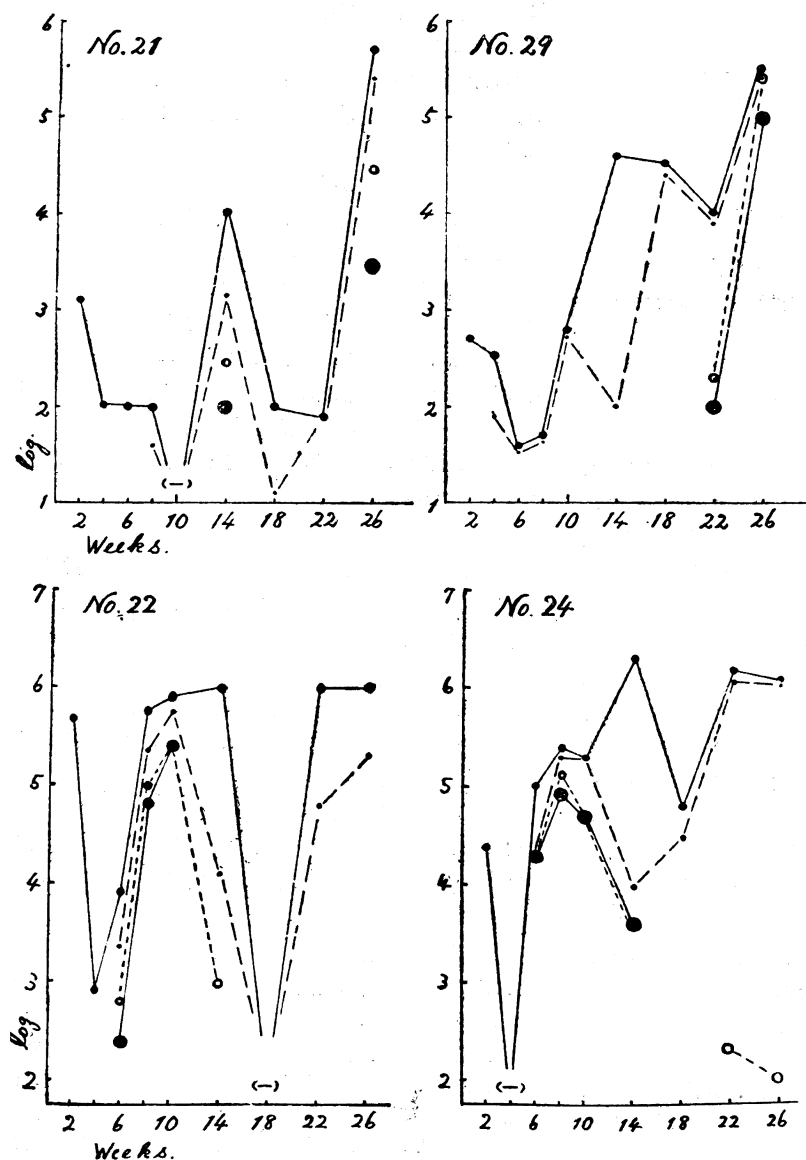
結核菌を排出する肺結核病巣が一カ所のみであり、また多くの結核病巣が組織学的に同一条件にあるものとは考えられない。さらに INAH の治療が進むとともに、病巣の様相にも変化が起り、時期を異にして喀痰中に排出されてくる、結核菌の由来する病巣も異となしければならぬかもしれない。

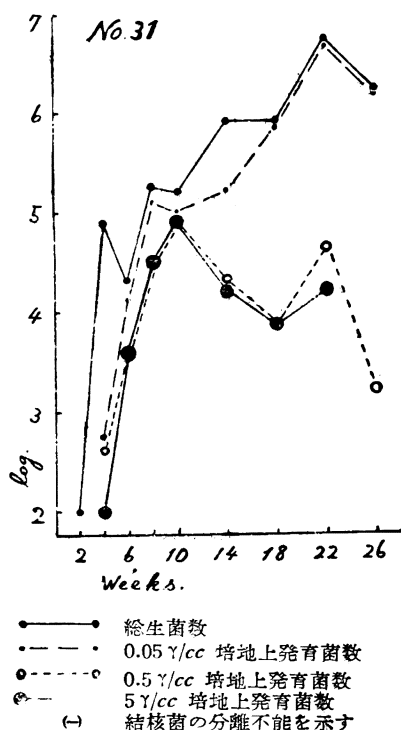
また生体内では、結核菌に対し攻撃を加えるものとして、

INAH の作用に加えて生体の防禦能力があり、in vitro の結核菌対 INAH という反応にくらべて、複雑な因子が反応形式の中に入つて来る。したがつてここに示した実験現象を細かく分析することは不可能である。それで肺結核病巣から排出されてくる結核菌全体として考えを進め、これまで臨床的に耐性検査を行つた結果、報告されている事実を裏づけてみる。それとともに、INAH 耐性結核菌の特異性に結びつけて二、三考察してみる。

INAH 耐性結核菌の出現機序はともかくとして、上の実験成績から、喀痰中の総生菌数が急激に減少して再び増加したときに、耐性菌が出現して来ることは小酒井らの報告⁸⁾と一致する。しかし No. 29 の例のように、総生菌数の減少再増加という経過に大分おくれで出現して来ることもある。また一度出現した INAH 耐性結核菌は、population 中に占める分布の割合が大となる時期につづいて、INAH の治療中にもかかわらず、その割合が次第に小となつて、ついには培地上で分離できなくなつてしまう。この現象からして、INAH 治療中止後に耐性菌が消失するという事実は当然の結果であるといえるで

図 1 INAH 治療患者の喀痰中結核菌の耐性 population の変動、
喀痰 1 cc 中の生菌数をとつて示す





縦軸: 喀痰 1cc 中の生菌数を対数でとつて示す
横軸: INAH 治療週日
あろう。

この点おくれで耐性菌の出現した No. 21, No. 29 の 2 例については、今後の経過に興味がある。

さらに INAH 耐性菌が消失した 3 例においては、大体 10 週時以後 1 日 200 mg の INAH 投与によつて、喀出痰中の生菌数に対して何らの影響をも及ぼしていない。すなわち排出結核菌が 0.5 % INAH 感受性菌からなっているため、ほとんど INAH の治療効果が期待できないものなのか、病巣の様相からして INAH の作用が及ばぬものなのか興味深い研究課題である。それとともに、総生菌数として表現されるこれら結核菌の分裂増殖力が強いために、population 中に占める INAH 耐性菌の割合が小となつて、やがて消失という現象がみられるとも考えられる。

もつとも問題となつている INAH 耐性菌の菌力の点からみると、この実験でした 5 % INAH 耐性結核菌は、治療開始前に分離した原株にくらべて、天竺ネズミに対する菌力発現能力は非常に弱くなつてゐる。すなわち皮下接種によつて、天竺ネズミに結核性病変をひきおこすことができない。この事実については改めて詳細に報告する予定である。

このように INAH 耐性菌の菌力が、人体内でも弱くなつてゐるとすれば、一時相当の菌数の増加があつても、やがて消失してしまう現象は、その菌力が弱くなつてゐるために起るものと説明することができよう。

SM 耐性菌について Linz¹⁰⁾ はすでに人体内で耐性菌の消失を報告し、in vitro で SM 感受性菌と耐性菌との混合菌群が、継代培養によつて SM 感受性菌のみからなる菌群になつてしまうという現象を in vivo の生体に移して考へてゐるようである。この場合も、population の点より消失前後の成績を比較しておらず、さらに SM 感受性菌、耐性菌の菌力については不明であつて、in vitro の現象を in vivo に移して考へることは早急にすぎでであらう。

しかし INAH 耐性結核菌の栄養要求の特異性¹¹⁾¹²⁾ や、Kirchner-Sy-Ser 培地の serial transfers method¹³⁾ によつて分離した INAH 耐性菌の耐性度が、Kirchner 培地と小川培地とは異なることも観察しており¹³⁾、INAH 耐性検査培地として小川培地使用の可否、性能まで検討しなければならぬと考へてゐる。

さらに肺結核の INAH 治療という実際面よりすると、耐性菌の出現が治療の障碍となるのは、比較的高率に in vitro の検査で高濃度の INAH の作用に抗する耐性菌が出現し、しかもその菌力が強い場合である。この実験では、治療の障碍となり効果が期待できなかつたのは、INAH 耐性菌によるものではなく、さきにのべたように 0.5 % INAH の感受性菌のためであるともいへよう。これは空洞のある重症結核症を治療対象としたためとも解されるが、これまでの観察では INAH 単独療法の効果には、自然一定の限界があるとも推察される。したがつて、治療開始当初の著明な喀出菌数に及ぼす INAH の作用に加えて、他の化学療法剤との併用が必要になつてくると思う。

結 論

1) 空洞のある 5 例の INAH 治療患者の喀痰中の結核菌について、直接法によつて喀痰の稀釈培養を行い、population 中の INAH 耐性結核菌の出現とその消長とをみた。

2) INAH 耐性菌は喀痰中の総生菌数が減少し再増加する 4 週ないし 6 週時に出現した 3 例と、これよりおくれた例とをみた。

3) INAH 耐性菌は一時その菌数の増加があり、population 中の分布の割合も大となるけれども、10 週以後は population 中の分布が次第に小となり、3 例ともに耐性菌が消失してしまつた。

4) 耐性菌が排出されなくなつた後でも、0.5 % INAH 感受性結核菌の發育は、1 日 200 mg の INAH の投与で生体内で何ら抑制されてゐなかつた。

患者の検査材料を提供され、治療に協力された国立中野療養所春木所長以下諸先生、特に終始協力された研究室の諸氏に深く感謝する。最後に柳沢部長の御指導に感謝し、上野一恵、岡本茂広両君の実験上の助力に感謝する。

文 献

- 1) Wolinsky, E. & Steenken, W. Jr. : J. Bact. 66 : 229, 1953.
- 2) 熊谷岱蔵 : 日結, 12 : 217, 1954.
- 3) Yoshihisa, Ashino : Rep. Res. Inst. Tuberc. & Leprosy. 5 : 249, 1953.
- 4) Middlebrook, G. & Cohn, M. L. : Science. 118 : 297, 1953.
- 5) Peizer, L.R., Widelock, D. & Klein, S. : Amer. Rev. Tuberc. 68 : 290, 1953.
- 6) Steenken, W. Jr. & Wolinsky, E. : Amer. Rev. Tuberc. 68 : 548, 1953.
- 7) Morse, W. C., Weisner, O. L., Kuhn, D.M., Fusillo, M., Dail, M.C. & Evans, J.R. : Amer. Rev. Tuberc. 69 : 464, 1954.
- 8) 小酒井望・三上次郎・中島三郎・武正勇造・石川哲也 : 結核, 29 : 6, 1954.
- 9) 佐藤直行 : 医学と生物学, 31 : 1954 掲載予定
- 10) Linz, R. : Compt. rend. soc. biol. 145 : 935, 1951. ibid. 145 : 149, 1951.
- 11) Fischer, M. W., Montross, F.L. & Palecek, N.M. : Amer. Rev. Tuberc. 66 : 626, 1952.
- 12) Fischer, M.W. : Amer. Rev. Tuberc. 69 : 797, 1954.
- 13) 佐藤直行・上野一恵 : 未発表