

# One step selection による抗結核剤への耐性発現について

三浦幸二・林光男

国立療養所大府荘 (指導一莊長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 31 年 9 月 10 日

Szybalski and Bryson<sup>1)</sup>は, *Bacillus megaterium* における isonicotinyl hydrazine 耐性への変異率は  $1(\pm 0.3) \times 10^{-6}$  で, 2重耐性への変異率は, 理論的に期待される値の7~8倍であつたといつている。また, 東村, 三浦<sup>2)</sup>は, 人型結核菌の感性株, Streptomycin(以下SMと略)耐性株, Isonicotinic acid hydrazide(以下INAHと略)耐性株およびPAS耐性株における他薬剤への高度耐性菌出現率を検し, PAS耐性株の population 中のPAS100mcg耐性菌中には, SM耐性菌を mutate する頻度が少ないが, PAS高耐性株では, INAH 10mcg耐性菌を mutate する頻度がやや高い。この成績より, 耐性に関与する genes の配列が, SM耐性, PAS耐性, INAH耐性の順序に配列していることを想像した。

われわれは, 人型結核菌を用い, 2重耐性出現の面より, SM耐性, PAS耐性, INAH耐性に関与する genes の配列を検討する目的にて実験した。

## 実験材料

菌株: 人型結核菌青山B株の感性株を使用した。

培地: 1%小川(辰次)培地を使用した。その組成は, 第1磷酸カリ 1.0gm, グルタミン酸ソーダ 1.0gm, 蒸溜水 100ml を基液とし, これに卵液 200ml, 2%マラヒット緑 6.0ml, グリセリン 6.0ml を加え, 試験管に 10ml ずつ分注, 85°C 1時間凝固滅菌した。

使用薬剤: Streptomycin は, Dihydrostreptomycin sulfate で協和製薬会社製, PASは, Para-aminosalicylic acid で田辺製薬会社製のものを使用した。Isonicotinic acid hydrazide は, 田辺製薬会社製のものであつた。

各薬剤は, 凝固滅菌に先立ち, 所定の濃度に培地に加えられた。ただし, SMのみは, 滅菌後の力価を $\frac{1}{2}$ として, 所定濃度の倍量加えられた。

## 実験方法

人型結核菌青山B株を, ナス型コルベにて振盪, 生理的食塩水にて均等浮游液となし, SM 3mcg/ml と PAS 1mcg/ml を同時に含有する培地, SM 3mcg/ml と INAH 0.1mcg/ml を同時に含有する培地, INAH 0.1mcg/ml と PAS 1mcg/ml を同時に含有する培地に接種し, また元の菌液の10進法による稀釈液を, 薬剤を含有しない培地に接種し, 37°C 6週培養し, 生菌数当りの SM 3mcg-PAS

1mcg 2重耐性菌出現率, SM 3mcg-INAH 0.1mcg 2重耐性菌出現率, および INAH 0.1mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率を計算し, 実測値とした。

また, この実験と並行して, 同様にして調製した菌液を, SM 3mg/ml, PAS 1mcg/ml および INAH 0.1mcg/ml を, それぞれ含有する培地に接種し, その菌液の10進法による稀釈菌液を, 同じく薬剤を含有しない培地に接種して, 生菌数当りの SM 3mcg 耐性菌出現率, PAS 1mcg 耐性菌出現率, INAH 0.1mcg 耐性菌出現率を実測し, この実測値より, SM 3mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率, PAS 1mcg-INAH 0.1mcg 2重耐性菌出現率および INAH 0.1mcg-SM 3mcg 2重耐性菌出現率を計算し, 理論的な2重耐性菌出現率とした。この理論的な2重耐性菌出現率と, それぞれの2重耐性菌出現率の実測値と比較した。

## 実験成績

表1に示すごとく, 生菌数当り INAH 0.1mcg 耐性菌出現率は, 実験1では  $4.61 \times 10^{-7}$ , 実験2では  $1.36 \times 10^{-6}$  であつた。また, 生菌数当り PAS 1mcg 耐性菌出現率は, 実験1では  $1.64 \times 10^{-5}$ , 実験2では  $6.55 \times 10^{-4}$  であつた。生菌数当りの SM 3mcg 耐性菌出現率は, 実験1では  $1.61 \times 10^{-2}$ , 実験2では  $2.27 \times 10^{-1}$  であつた。

表 1

実験	接種生菌数 試験管当り	本数	IN 0.1 $\gamma$ 培地生菌数 試験管当り	INAH 0.1 Mutant 出現率
1	65.3 $\times 10^3$	17	29.2	4.61 $\times 10^{-7}$
2	85.6 $\times 10^3$	10	11.7	1.36 $\times 10^{-6}$
			PAS 1 $\gamma$ 培地生菌数 試験管当り	PAS 1 $\gamma$ Mutant 出現率
1	65.3 $\times 10^3$	20	10.4	1.64 $\times 10^{-5}$
2	85.6 $\times 10^3$	10	561.0	6.55 $\times 10^{-4}$
			SM 3 $\gamma$ 培地生菌数 試験管当り	SM 3 $\gamma$ Mutant 出現率
1	65.3 $\times 10^3$	20	102.1	1.61 $\times 10^{-2}$
2	85.6 $\times 10^3$	10	195.0	2.27 $\times 10^{-1}$

したがつて, 理論的な2重耐性菌出現率は, SM 3mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率は, 実験1では,  $(1.61 \times 10^{-2}) \times (1.64 \times 10^{-5}) = 2.64 \times 10^{-7}$ , 実験2では,  $(2.27$

$\times 10^{-1}) \times (6.55 \times 10^{-4}) = 14.8 \times 10^{-5}$  となる。また、理論的な SM 3mcg-INAH 0.1mg 2重耐性菌出現率は、実験1では  $(1.61 \times 10^{-2}) \times (4.61 \times 10^{-7}) = 7.42 \times 10^{-9}$ 、実験2では  $(2.27 \times 10^{-1}) \times (1.36 \times 10^{-6}) = 3.10 \times 10^{-7}$  と

なる。同じく理論的な INAH 0.1mg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率については、実験1では  $(4.61 \times 10^{-7}) \times (1.64 \times 10^{-5}) = 0.00856 \times 10^{-9}$ 、実験2では  $(1.36 \times 10^{-6}) \times (6.55 \times 10^{-4}) = 2.4 \times 10^{-9}$  となる。

表 2

実験	接種生菌数 試験管当り	本数	SM 3+PAS 1 培地 生菌数(試験管当り)	SM3-PAS1Mutant 出現率(実測値)		SM3-PAS1Mutant 出現率(理論値)
1	$65.5 \times 10^3$	20	21.2	$3.54 \times 10^{-7}$	=	$2.64 \times 10^{-7}$
2	$85.6 \times 10^3$	9	3.2	$3.37 \times 10^{-7}$	<	$14.8 \times 10^{-5}$
			SM 3+IN 0.1 培地 生菌数(試験管当り)	SM3-IN0.1Mutant 出現率(実測値)		SM3-IN0.1Mutant 出現率(理論値)
1	$65.5 \times 10^3$	20	0.5	$4.73 \times 10^{-9}$	=	$7.42 \times 10^{-9}$
2	$85.6 \times 10^6$	10	27.5	$3.18 \times 10^{-7}$	=	$3.10 \times 10^{-7}$
			IN 0.1+PAS 1 培地 生菌数(試験管当り)	IN0.1-PAS1Mutant 出現率(実測値)		IN0.1-PAS1Mutant 出現率(理論値)
1	$65.5 \times 10^6$	20	0.15	$2.37 \times 10^{-9}$	>	$0.00856 \times 10^{-9}$
2	$85.6 \times 10^6$	10	1.6	$186.0 \times 10^{-9}$	>	$2.4 \times 10^{-9}$

生菌数当りの2重耐性菌出現率の実測値は、表2に示すごとく、SM 3mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率については、実験1では  $3.34 \times 10^{-7}$ 、実験2では  $3.73 \times 10^{-7}$  であり、SM 3mcg-INAH 0.1mcg 2重耐性菌出現率は、実験1では  $4.73 \times 10^{-9}$ 、実験2では  $3.18 \times 10^{-7}$  であった。同じく INAH 0.1mcg-PAS 1mg 2重耐性菌出現率は、実験1では  $2.37 \times 10^{-9}$ 、実験2では  $186.0 \times 10^{-9}$  であった。

この2重耐性菌出現率の実測値と、2重耐性菌出現率の理論値を比較すると、SM 3mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率については、実験1では、実測値( $3.34 \times 10^{-7}$ ) = 理論値( $2.64 \times 10^{-7}$ ) であり、実験2では実測値( $3.73 \times 10^{-7}$ ) < 理論値( $14.8 \times 10^{-5}$ ) で、理論値の方が、実測値より大であるかまたは等しかつた。また SM 3mcg-INAH 0.1mcg 2重耐性菌出現率については、実験1では実測値( $4.73 \times 10^{-9}$ ) = 理論値( $7.42 \times 10^{-9}$ )、実験2では実測値( $3.18 \times 10^{-7}$ ) = 理論値( $3.10 \times 10^{-7}$ ) でほぼ等しかつた。INAH 0.1mcg-PAS 1mg 2重耐性菌出現率については、実験1では実測値( $2.37 \times 10^{-9}$ ) > 理論値( $0.00856 \times 10^{-9}$ ) で、実験2では実測値( $186.0 \times 10^{-9}$ ) > 理論値( $2.4 \times 10^{-9}$ ) で、明らかに、実測値の方が理論値より大であった。

考 察

INAH 0.1mcg/ml と PAS 1mcg/ml の併用での one step selection により出現する INAH 0.1mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率は、INAH 0.1mg-耐性菌出現率と PAS 1mcg 耐性菌出現率より計算により期待される INAH 0.1mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率より大であ

つた。

この事実より、次の事項が考えられる。

- (a) ある1つの薬剤の耐性菌は、他の薬剤耐性性に対し、高い変異率を持つているかもしれない。
- (b) 感性株の中に、INAH, PAS の両薬剤に同時に耐性になる菌が多く含まれているか。
- (c) PAS と INAH との薬剤的作用によるものであるか。

以上の3つが考えられる。

(c)については、われわれ<sup>3)</sup>は、PAS と INAH の作用は、単に additive なものであると報告したが、少なくともPASとINAHの併用により耐性は出現しにくくなる筈である。

(a)については、東村、三浦、野田<sup>4)</sup>は、人型結核菌において、感性株、INAH耐性株、PAS耐性株よりの SM 20mcg耐性菌出現率は  $22.1 \sim 114 \times 10^{-8}$  で、感性株、SM耐性株、PAS耐性株よりの INAH 1mcg 耐性菌出現率は  $15.0 \sim 50 \times 10^{-8}$  であり、また感性株、SM耐性株、INAH耐性株よりの PAS 10mcg 耐性菌出現率は  $66.1 \sim 83.1 \times 10^{-8}$  であり、これらの成績より、耐性菌の出現率は、いずれの薬剤への変異によつても影響されないと結論を下した。すなわち、或る1つの薬剤の耐性菌は、他の薬剤耐性性に対し、高い変異率を持つことはない。

しかし、その後、東村、三浦<sup>2)</sup>は、PAS耐性株から INAH耐性菌を select する場合には、PAS併用の選択で、生菌数当りの INAH耐性菌数は、むしろやや大である傾向があるのを認めた。また PAS耐性株における INAH 10mcg 耐性菌出現率は、感性株およびSM耐性株より若干大きい傾向があるのを認めた。

この結果よりすれば、PAS-INAH 2重耐性菌の出現率が理論的な値よりも大となることは期待されうる。

SM 3mcg-INAH 0.1mcg 2重耐性菌出現率については、理論値(実験1では $7.42 \times 10^{-9}$ 、実験2では $3.10 \times 10^{-7}$ )と実測値(実験1では $4.73 \times 10^{-9}$ 、実験2では $3.18 \times 10^{-7}$ )で、ほぼ等しかつた。

これは、上述のわれわれ<sup>4)</sup>の成績よりみて、当然のことと思われる。

しかるに、SM 3mcg-PAS 1mcg 2重耐性菌出現率については、実験1では理論値 $2.64 \times 10^{-7}$ に対し、実測値は $3.34 \times 10^{-7}$ で、ほぼ等しかつたが、実験2では理論値は $14.8 \times 10^{-5}$ で、実測値 $3.73 \times 10^{-7}$ よりも低い値を示した。

この場合、或る1つの薬剤の耐性菌は、他の薬剤耐性に対し、低い変異率を持つことが考えられるが、これは上述の如く<sup>3)</sup>、SM耐性菌からのPAS耐性菌出現率も、PAS耐性菌からSM耐性菌出現率も、ほぼ等しかつたが、これから考えると、このようなことは、まず否定できるものと思われる。

しかるに、その後、東村、三浦<sup>2)</sup>は、PAS耐性株における生菌数当りのSM耐性菌出現率を、SMのみのone step selectionで計算した場合と、SMとPASの併用でのone step selectionで計算した場合と比較すると、後者が著しく少ないのを認めた。また、東村<sup>5)</sup>は、人型結核菌において、SM、PASの併用効果は、単にadditiveなものでなく、SMによるmutationにPASが拮抗するのを認めている。

すなわち、PAS耐性菌が、PASにより選択されるのと、SM-PASの併用効果により、理論値よりも実測値の方が、より低い値を示したと思われる。

2重耐性菌出現率のみをもつて直ちに、genesのLocusにむすびつけることは、飛躍感があるが、PAS-INAHの2重耐性になりやすいということは、東村、三浦<sup>2)</sup>が既に報告せるごとく、PAS耐性に関与するgenesと、INAH耐性に関与するgenesが(少なくとも2~3コ)、共通のgenesを持つていることが想像され、SM-INAHの2重耐性が、理論値と実測値が一致することは、SM耐性に関与するgenesとINAH耐性に関与するgenesは、相互に影響のないほど、相当離れていることが考えられる。

SM-PAS 2重耐性出現率が、実測値と理論値が、ほぼ等しいか、または、実測値の方が理論値よりも低いことは、お互に1つのgenesを共有しており、PAS耐性になつたため、その共通のgenesが、変化したため、SM耐性に関与するgenesが変化して、SM耐性になりやすいことが考えられる。したがって、2重耐性菌出現率よりも、PAS耐性株よりのSM耐性およびINAH耐性への

mutation<sup>2)</sup>の場合と同じく、genesの配列として、INAH耐性、PAS耐性、SM耐性の順序であると思われる。

#### 臨床的応用

このin vitroの成績を、今直ちにこれを臨床的に応用するということはどうかと思えるが、PAS-INAH 2重耐性出現率は、理論値と実測値が、ほぼ等しく、SM-PAS 2重耐性菌出現率が、理論値に比し実測値が、ほぼ等しいか、または、低率であつたことは、2重耐性菌出現率の点よりみた場合には、SM-PAS併用療法が最も有利であり、SM-INAH併用療法がこれに次ぎ、PAS-INAH併用療法が、それにつづくものと思われる。

#### 結 論

人型結核菌青山B株を使用し、one step selectionにより2重耐性菌出現率を検討し、PAS-INAH 2重耐性菌出現率は、Szybalskiの成績に一致し、計算上より期待される値(理論値と記載)よりも高かつた。SM-INAH 2重耐性菌出現率については、理論値とほぼ同率であつた。

SM-PAS 2重耐性菌出現率については、理論値に比し、ほぼ等しいかあるいは、やや低率を示した。

御指導ならびに御校閲を賜つた国立療養所大府荘長勝沼六郎博士、名古屋大学医学部内科第一講座日比野進教授に感謝します。なお本研究を行うに当り、終始御協力を賜つた大府荘研究室加藤千代氏、鈴木初枝氏に感謝します。

#### 参 考 文 献

- 1) Szybalski and Bryson : One step resistance development to isoniazid and sodium-p-aminosalicylate. J. Bact., 66(4) : 468~469, 1953.
- 2) 東村・三浦 : PAS耐性結核菌におけるSM耐性およびINAH耐性出現へのMutationsについて、医学と生物学, 39(1) : 31~35, 1956.
- 3) 三浦・安保・東村 : 人型結核菌におけるINAH耐性に対するPASの作用機作について、(Chemotherapy 掲載予定)
- 4) Tsukamura, M., Miura, K., Noda, Y. : Studies on the drug resistance in Mycobacterium tuberculosis var hominis. (J. Antibiotics, ser. A. in press)
- 5) Tsukamura, M. : The mechanism of action of para-aminosalicylic acid in preventing the emergence of resistance to streptomycin in Mycobacterium tuberculosis. J. Antibiotics, ser. A. 8(6) : 196~200, 1955.