

結核菌のカナマイシン耐性に関する研究

第1報 カナマイシン自然耐性菌について

前 田 徹

国立予防衛生研究所 (部長 室橋豊徳博士)

受付 昭和34年5月11日

緒 言

抗結核剤未使用肺結核患者喀痰から分離される抗結核剤自然耐性菌については、従来広く用いられているストレプトマイシン (以下 SM), イソニコチン酸ヒドラジッド (以下 INH) およびパラアミノサリチル酸 (以下 PAS) に関して、すでに諸家による多くの報告がある。すなわち SM についての Youmans¹⁾, Steenken²⁾, 柳沢³⁾, 塚原⁴⁾ らの報告によれば、大部分の菌株は SM 5 γ /cc 以下で完全に発育を阻止されており、6.25~12.5 γ /cc で発育したものは131株中1株を Youmans¹⁾ が報告しているにすぎない。INH については、Hofmann⁵⁾, Lattimer⁶⁾, Hobby⁷⁾, Fust⁸⁾, Basserman⁹⁾, Bünger^{10) 11)}, 柳沢¹²⁾, および諸家¹³⁾ の報告を久世¹⁴⁾ がさきぎに総括しているが、その検査方法において、それぞれ違いがあるので一概にはいえない。しかし培地斜面に2 mg 菌量の大量接種を行なった久世の成績¹⁴⁾ から突然変異菌と思われるものを除去するため、1 斜面平均100 集落以上の発育を示したものを耐性株とみなせば、80 株中1 γ /cc 不完全耐性3株、10 γ /cc 不完全耐性2株となる。またPAS については、Youmans¹⁵⁾, Madigas¹⁶⁾, 小野塚¹⁷⁾, 小酒井¹⁸⁾, 臼井¹⁹⁾ らの報告があり、大部分が低濃度で完全に発育を阻止され、6.4 γ /cc 以上で発育する株はないと報告されている。

このようにして、抗結核剤未使用例における自然耐性菌の耐性度および分布を知ることは、以後その薬剤使用によつて出現する耐性菌の問題を検討するうえにきわめて重要な基礎を与えらるゝと考えられる。

梅沢²⁰⁾ によつて発見され、柳沢²¹⁾ によつて SM に比肩する抗結核剤であると報告された新抗生物質カナマイシン (以下 KM) は、既存の抗結核剤耐性菌にも有効であることが明らかにされているが、今後 KM 使用の結果として KM に対する耐性菌の出現の可能性は既往3剤に対する耐性菌の出現からみて当然期待されることである。そのような将来の問題に対しては、KM 使用前の状態における結核菌の耐性度および自然耐性菌の分布、さらにKM耐性獲得機序について調べておくこ

とが基礎資料として必要であることはいうまでもない。

著者は KM 市販前の KM 未使用肺結核患者144例の喀痰より分離された結核菌144株について KM 耐性度を調べる機会を得たので、少数例ではあるがその成績を報告する。

実 験 I

国立中野療養所入院中の KM 未使用肺結核患者25例の喀痰より3% 小川培地で分離された結核菌25株について予備実験を行なった。

実験方法

a) 使用菌株: 3% 小川培地で分離された結核菌を Dubos' tween-albumin 液体培地に継代し、2代目、10日培養菌液を日光電比色計を用い、フィルター S 53 を使用、目盛 0.2 に合わせるように滅菌蒸留水で稀釈したものをを用いた。これは大体 1 mg/cc の菌液に相当する。

b) 使用培地: Kirchner 寒天培地を用いた。すなわち 30% NaOH 液で pH 7.2 に修正した Kirchner 基礎培地に malachite green を 4 γ /cc、寒天を 1.5% の割合に加えて、高圧滅菌したのち、Berkefeld [N] で濃過した馬血清を 10% の割合に加えて、5 cc 宛中試験管に分注して斜面とした。耐性検査には KM 濃度系列を 1, 10, 100 γ /cc となるように高圧滅菌後 56°C で加えた。

c) 接種方法および成績判定: 上記の菌液の 0.1 cc を KM を含有しない対照培地と KM を含有する培地の各 2 本宛に接種して、4 週間培養後発育した集落をかぞえて判定した。

実験成績

成績は表1に示した。KM 1 γ /cc を含有する培地に対照培地におけると同等に集落の発育を示した菌株、すなわち 1 γ /cc 完全耐性を示すものは1株もなかつた。また 10 γ /cc で1集落、100 γ /cc で1集落の発育をみた株がそれぞれ1株ずつあつた。この 100 γ /cc で発育した eugonic な1集落は1% 小川培地に増菌して、KM 高濃度耐性検査の結果、1,000 γ /cc 完全耐性であつた。

表1 Dubos-albumin 液体培地培養菌液を用いた大量接種によるKM耐性検査

菌株 No.	Kirchner 寒天培地				小川培地								
	KM 濃度 γ/cc				SM 濃度 γ/cc			PAS 濃度 γ/cc			INH 濃度 γ/cc		
	0	1	10	100	0	10	100	1	10	100	0.1	1	10
1	+	-	-	-	冊	冊	冊	冊	冊	+	冊	冊	冊
2	冊	7.5	-	-	冊	冊	冊	冊	冊	+	冊	+	2.5
3	冊	11	-	-	冊	冊	冊	冊	冊	+	冊	+	-
4	冊	冊	-	-	冊	-	-	冊	冊	+	冊	-	-
5	冊	24	-	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
6	冊	-	-	-	冊	冊	-	冊	冊	-	冊	+	-
7	冊	3	-	-	冊	-	-	冊	+	-	冊	-	-
8	冊	12	-	-	+	+	8	10	-	-	-	-	-
9	冊	18	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	冊	20	-	-	冊	冊	-	冊	+	1.5	冊	冊	-
11	冊	+	-	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
12	冊	+	-	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
13	冊	冊	0.5	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
14	冊	-	-	-	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	-	-
15	冊	2.5	-	-	冊	冊	冊	-	-	-	冊	+	-
16	冊	-	-	-	冊	-	-	冊	+	-	冊	冊	冊
17	冊	0.5	-	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
18	冊	+	-	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
19	冊	-	-	-	冊	冊	冊	冊	冊	+	冊	冊	-
20	冊	7.5	-	-	冊	+	-	冊	-	-	冊	+	+
21	冊	+	-	-	冊	-	-	冊	冊	+	冊	冊	-
22	冊	+	-	-	冊	冊	-	-	-	-	冊	冊	冊
23	冊	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
24	冊	+	-	-	冊	-	-	-	-	-	-	-	-
25	冊	39	-	0.5	冊	冊	-	-	-	-	冊	-	-

注：4 週判定

冊～冊：培地全面密に融合して発育した集落
 冊：冊と+の中間に相当する発育を示す集落
 +：100以上の孤立集落
 数字は集落数

この25株のSM, PAS および INH に対する耐性は表1のごとくで、KM耐性との間になんらの関係もみられない。

実験 II

昭和33年厚生省結核実態調査のさいに分離送付された菌株の一部について行なった。

実験方法

a) 使用菌株：現地において、3%小川培地で分離された結核菌のうち119株を1%小川培地に継代し、14日前後の発育良好な菌苔を用いた。直径7mmの水晶球50入りの300cc丸コルベンを用いて、手振法で1mg/ccの均質な蒸留水菌液を調製した。

b) 使用培地：実験Iと同様である。ただし耐性検査にはKM濃度系列が1, 5, 10 γ/cc となるように

KMを加えた。

c) 接種方法および成績判定：1mg/cc菌液を原液として、10倍希釈法により、0.1cc中に $10^{-3}mg$ 菌量を含むように滅菌蒸留水で希釈し、その0.1ccを対照培地とKM含有培地の各2本ずつに接種した。判定は実験Iと同様である。

実験成績

成績は表2のごとくである。KM 1 γ/cc を含有する培地に対照培地と同等の集落発生をみた株、すなわち1 γ/cc 完全耐性株は1株もなかつた。そこで培地1斜面平均10集落以上を生じた菌株を一応耐性株と仮定すれば、119株中1 γ/cc 不完全耐性株は12株(10.1%)であつた。

考案

表2 少量接種 (10^{-3} mg 菌量) によるKM耐性度

KM濃度 γ/cc	0(対照)	1 γ	5 γ	10 γ
発育菌株数	119	12	0	0
百分率 %	100	10.1	0	0

本実験では、まず大量接種による予備実験(実験I)でKMの完全発育阻止濃度に概略の見当をつけ、それが10 γ/cc 以下であることがわかつたので、実験IIにおいてはなにかば定量的に119株を調べた訳である。その結果、1 γ/cc 不完全耐性12株(10.1%)を得たが、1 γ/cc 完全耐性株および5 γ/cc 以上の耐性株はみられなかつた。この成績は今後臨床で行なわれるKM耐性評価に対して、一指標となりうるであろう。また自然耐性菌に関して、KMが使用当初のSMとほぼ同等の臨床的立場にあることを示すように思う。

なお表1に示したようにSM, PAS およびINHのごとき抗結核剤に高濃度の耐性を示した結核菌がKMに対してはKM感性菌として著明に発育を阻止されているが、この点は金井がこれらの抗結核剤耐性菌を用いて行なつた動物実験成績とよく一致している。

結 論

KM未使用肺結核患者の喀痰より分離された結核菌144株について、KM耐性度を検査し、次のような成績を得た。

1) Dubos' tween-albumin 液体培地培養菌液を用いて、比較的大量の菌を接種した場合にも、25株中10 γ/cc 以上の耐性を示す株はなかつた。

2) 手振法による菌液の少量接種 (10^{-3} mg 菌量) の場合、119株中1 γ/cc 不完全耐性12株がみられたのみで、1 γ/cc 完全耐性株および5 γ/cc 以上の耐性株は1株もなかつた。

したがつて、KM未使用患者からの分離結核菌のKM感受性の程度をこの成績から推察することができるように思う。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜つた予研柳沢副所長、室橋部長ならびに佐藤博士に敬意を表し、実験に協力された丸山、岡本両技官ならびに菌株の分与を戴いた国立中野療養所研究検査科御一同に深く謝意を表す。

文 献

- 1) Youmans, G.P. & Karlson, A.G. : Amer. Rev. Tuberc., 56 : 344, 1948.
- 2) Bernstein, S., D'Esopo, N.D. & Steenken, W., Jr. : Amer. Rev. Tuberc., 58 : 344, 1949.
- 3) 柳沢謙・白井茂 : 抗研誌, 7 : 248, 昭26.
- 4) 塚原兵衛・伊沢幸夫・阿部久代 : 結核, 25 : 566, 昭25.
- 5) Hofman, P. & Nickel, L. : Beitr. Klin. Tbk., 112 : 191, 1954.
- 6) Lattimer, J.K. : J. Amer. Med. Assoc., 1950 : 981, 1952.
- 7) Hobby, G.L. & Lenert, T.F. : Amer. Rev. Tuberc., 65 : 771, 1952.
- 8) Fust, B. & Böhni, E. : Schweiz. Med. Wschr., 16 : 377, 1953.
- 9) Basserman, Fr. J. : Klin. Wschr., 31 : 272, 1953.
- 10) Bünger, P. & Lass, A. : Dtsch. Med. Wschr., 78 : 1193, 1953.
- 11) Bünger, P. & Lass A. : Z. Tbk., 103 : 202, 1953.
- 12) 柳沢謙 : 日本医事新報, 1516 : 3, 昭28.
- 13) 厚生省結核療法研究協議会報告, 昭28.
- 14) 久世彰彦 : 結核の研究, 2集, 55, 昭30.
- 15) Youmans, G.P., Raleigh, G.W. & Youmans, A.S. : J. Bact., 54 : 409, 1947.
- 16) Madigas, D.G., Griffichs, L.L., Lynch, M.J.G., Bruce, R.A. & Sidney Kay : Lancet, -6598, 239, 1950.
- 17) 小野塚隆勇 : 抗研誌, 6 : 183, 昭25.
- 18) 小酒井望 : 診断と治療, 38 : 5, 昭25.
- 19) 白井茂 : 抗研誌, 8 : 24, 昭27.
- 20) Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondō, S., Okami, Y., Utahara, R., Ōsato, Y., Nitta, K. & Takeuchi, T. : J. Antibiotics Ser A, 10 : 181, 1957.
- 21) 柳沢謙・佐藤直行 : 日本細菌学雑誌, 12 : 857, 昭32.
- 22) 柳沢謙・金井興美 : 日本細菌学雑誌, 13 : 95, 昭33.