

抗結核剤耐性に関する臨床的研究

その1 Pyrazinamide 耐性検査について

平 井 得 夫

長崎大学医学部内科第二教室 (主任 篠島四郎教授)

受付 昭和 34 年 6 月 16 日

I 序 言

最近肺結核症における Pyrazinamide (以下 PZA と略) と Isonicotinic Acid Hydrazide (以下 INH と略) の併用療法はすでに基礎実験, 臨床効果検討の段階を終え, 臨床応用の時期に移った観がある。本療法普及の結果は従来の抗結核剤と同じく当然その耐性検査の必要性が望まれている。

著者は第 45 回日本内科学会九州地方会に臨床例を報告したさい, 従来の方法では PZA 投与の前後とも 500 γ/cc 以上の耐性値を認めたために *in vitro* では測定不能と述べた。当時諸家の報告もほぼ同様でその 2, 3 をあげると Steenken¹⁾ は $H_{37}Rv$ を用い液体培地で PZA の完全発育阻止濃度を 200 γ/cc とし, 中村²⁾ は $H_{37}Rv$ ・小川培地で 1,000 γ/cc でも発育阻止は不能であり, 患者分離菌株では 100~1,000 γ/cc の間で感受性の中が広いと述べている。また厚生省結核療法研究協議会³⁾ でとりあげられた PZA・INH 併用療法 158 例の集計の中で, PZA 耐性については治療前の感受性が種々であり治療月数による耐性上昇については一定の傾向を見出だせなかつたと報告している。PZA 内服後の血中最高濃度は掛見⁴⁾, 高階⁵⁾ によるとそれぞれ 40 γ/cc 前後と測定している。この値をそのまま病巣の濃度とすることはできないにしても高い感受性濃度とは隔差がはなはだすぎる。要するに *in vivo* での強力な抗菌力に比較して, 従来行なわれてきた *in vitro* の検査法ではその阻止力はきわめて弱いかに見える。しかるに Mc Dermott⁶⁾ らは液体培地を用いて pH 4.5~8.0 の範囲で PZA の $H_{37}Rv$ 発育阻止力を調べ, pH 5.0~5.5 では完全発育阻止濃度を 16 γ/cc とし, また他の抗結核剤ではかかる酸性環境での抗菌力に影響はみられなかつたと報告している。本邦でも追試せられ小川⁷⁾, 内藤⁸⁾, 岡野⁹⁾ らによる酸性培地上での PZA 抗菌力および耐性検査の試みがなされている。さらに Wasz-Höckert¹⁰⁾ らは $H_{37}Rv$ 感染マウスに PZA を 12 週投与しその内臓より分離した E11L 菌株は pH 5.0~5.5 液体培地上で PZA 400 γ/cc 以上の耐性値を示し, また E11L 感染マウスに

PZA の治療は無効であつたことを臓器培養で確かめている。また高橋¹¹⁾ は PZA 治療患者 4 例中 1 例に pH 5.5 液体培地で 100 γ/cc の完全耐性を認めている。しかしながら酸性培地を臨床耐性検査に応用した多数の症例報告はまだみあたらず, したがって臨床上の耐性限界も不明の現況である。

ここに著者は pH 5.5 の液体培地および routine test としては普及率の高い固型培地を作製し, $H_{37}Rv$ および PZA 未使用, 既使用の肺結核患者それぞれ 70 例より分離した結核菌株を用いて PZA の抗菌力を検査し, 臨床上の耐性限界を調べ 2, 3 の知見を得たのでここに報告する。

II 検査方法

(1) pH の測定

pH 測定にはすべてケンブリッジガラス電極 pH メーターを用い, その標準調整には同社の緩衝液 pH 7.03 (15°C) を使用し常に測定温度を 15°C に一定した。大量液の場合は Diptype の電極を, 凝固水等少量の試料には血液 pH 測定用の微量電極を用いた。両電極の測定誤差範囲は ± 0.01 である。凝固水の測定にはとくに次のことに留意した。血清凝固器より取出した試験管はキャップを強くしめたのち約 12 時間孵卵器に立て管壁に付着している水滴を十分下に凝固させる。ついでその約 15 本よりピペットで凝固水を集め試料とする。また清浄な微量電極装置は測定前に測定すべき試料の少量で洗う。

(2) 液体培地 (キルヒナー培地)

PZA 300 mg を 8% 塩酸で pH 5.50 に修正したキルヒナー基汁 300 cc に溶解する。これを元として同基汁による稀釈液 1,000 γ/cc , 500 γ/cc , 100 γ/cc , 50 γ/cc , 25 γ/cc , 10 γ/cc , 5 γ/cc を作製し, PZA を含有しない基汁を対照とする。PZA 添加による pH の変動はみられない。pH 5.50 のキルヒナー基汁に牛血清を 10% 添加すると pH が 0.21~0.34 アルカリ側に傾き牛血清の保存日数により差がみられるので本研究には市販のアルブミン薬研を用いた。この pH は 6.84 であり基汁への 10% 添加で pH は 0.02~0.03 アル

カリ側に傾くのみである。必要なときに同一 pH 培地
が得られる点で使用した。

(3) 固型培地 (1% 第一磷酸カリ小川培地)

ほぼ小川⁷⁾の原法によつたが以下の点で修正を加
えた。

i) 滅菌凝固操作による凝固水 pH の変動

1% 第一磷酸カリ小川培地 (以下小川培地と略) の
pH を 5.50~5.10 の間で数種作製し 88°C 40 分間滅
菌凝固すると出来上がった培地の凝固水 pH は表 1 の
とおり 5.50~6.06 とアルカリ側に傾く。したがつて
pH 5.5 小川培地作製のためにはあらかじめ pH 5.10
に修正したものを滅菌凝固すべきである。そのさい原法
で基汁 300 cc, 卵液 600 cc を材料とするには 8% 塩酸
を原法より約 4 cc 余分に必要とする。

表 1 1%小川培地の滅菌凝固による培地pHの変化

凝 固 前 の pH	凝 固 後 の pH
5.50	6.06
5.38	5.84
5.20	5.69
5.10	5.50

ii) PZA 稀釈液の調製と培地混入

PZA は常温では蒸溜水にわずか (約 1%) しか溶
解しない。したがつて小川培地では従来の方法¹²⁾によ
つて稀釈液をつくり培地に混入することができず次の方
法を用いた。PZA 2.5 g に蒸溜水 97.5 cc を加え軽
く加温して溶解せしめ、これより順次稀釈液をつくる。こ
れらの 4 cc あるいは 2 cc 宛を i) に調製した培地液
の 96 cc または 98 cc に加えることにより キルヒナー
培地と同様系列の PZA 含有液とする。蒸溜水 2 cc
を培地液 98 cc に加えたものを対照とする。この場合も
PZA 添加による pH の変動はみられない。

(4) 菌液の調製と培養方法

i) H₃₇Rv

ソートン培地に発育した 2 週目の H₃₇Rv を秤量

し、ガラス球入りコルベンで振盪混和したのち蒸溜水で
稀釈し 1 mg/cc の菌液をつくる。

これより順次 10 倍ずつ稀釈し、両培地とも 0.1 cc
宛を接種し、キルヒナー培地は 3 週、小川培地は 4 週
後に判定した。

ii) 患者より分離した結核菌

被検喀痰は当内科ならびに次の 11 施設の御好意で得
られたものである。

国立長崎療養所	県立佐々療養所
国立小浜療養所	市長崎病院
社会保険喜々津病院	愛宕療養所
田上養生園	茂木療養所
三菱高島鉱業所病院	小江原療養所
是真会東望療養所	

喀痰は一たん 3% 小川培地に従来の方法で培養した
のち多数の集落より釣菌し、振盪混和後蒸溜水による均
等液 0.1 cc 宛を接種する。接種菌量はキルヒナー培地
では約 0.1 mg, 小川培地では約 0.05 mg でありそれ
ぞれ 3 週, 4 週後に判定する。

III 検査成績ならびに小括

(1) PZA の H₃₇Rv 発育阻止

表 2 のとおりであり表 3 は諸家^{6) 8) 9) 11) 13) 14)}の
報告と著者の成績を一覧表にした。それぞれ菌量, 培地,
培養日数, PZA 含有濃度の系列が異なるのであるが
キルヒナー培地で発育する PZA の最高濃度は 8 ~
12.5 γ/cc であり小川培地では 5~25 γ/cc の間と考え
られる。

(2) PZA の患者分離菌株発育阻止

キルヒナー培地は小川培地より 1, 2 段階高度に発育
を示すことがあるがほぼ小川培地と平行した。表 4 は
PZA 未使用者より分離した 70 株の小川培地による
成績であり、発育する PZA 最高濃度は 5 γ/cc をビ
ークとし大部分が 10 γ/cc 以下であり 3 例に 25 γ/cc
までの発育をみた。しかし 50 γ/cc 以上で発育するも
のは 1 例もなかつた。これに対し表 5 は PZA 既使

表 2 PZA の H₃₇Rv 発育阻止

培 地	菌 数	pH	PZA 濃度 γ/cc							
			0	5	10	25	50	100	500	1,000
キルヒナー	2×10 ⁵	5.53	+	+	+	-	-	-	-	-
			+	+	±	-	-	-	-	-
小 川	2×10 ⁵	5.52	+	+	25	-	-	-	-	-
			+	+	56	8	-	-	-	-
	2×10 ⁴	"	+	+	+	-	-	-	-	-
			+	+	-	-	-	-	-	-
			+	52	-	-	-	-	-	-
			+	32	-	-	-	-	-	-

表3 H₃₇Rv を用いた諸家の報告

報告者	菌数	pH	培地	培養期間(週)	完全発育阻止濃度 γ	発育最高濃度 γ
Mc Dermott	1 × 10 ⁶	5.5	Tween Al Oleic Acid Al	2	16	8
高橋 欽一	0.1 mg	5.5	キルヒナー	2	25	12.5
安井 雅典	0.1 mg	5.5	キルヒナー	2	50	10
内藤 益一	0.02mg	5.5	キルヒナー	4	25	12.5
神頭 勝太	0.01mg/cc	5.5	キルヒナー	4	25	12.5
岡野 正光	3.5 × 10 ⁵	5.56	小川	4	50	10
	3.5 × 10 ⁸				10	5
平井 得夫	2 × 10 ⁵	5.52	小川	4	50	25
	2 × 10 ⁸				10	5
	2 × 10 ⁵	5.53	キルヒナー	3	25	10

用者より分離した 70 株の小川培地による成績で、100 γ/cc をピークとして高濃度でもかなりの発育を認めた。推計学的に未使用者、既使用者群間には (表 6) 結核菌発育能力(感受性)に有意の差がある (修正 $\chi^2_{df=1} = 11.05$ $0.001 > p$)。また 25 γ/cc 以下と 50 γ/cc 以上の耐性出現は PZA 使用量 200 g 未満と 300 g 以上両群の間 (表 7) でその出現度に有意の差がある ($\chi^2_{df=1} = 4.08$ $0.05 < p < 0.02$)。

表 4 PZA未使用者70株の発育最高濃度

PZA γ/cc	0	5	10	25	50	100	500	1,000
例数	13	37	17	3	0	0	0	0

表 5 PZA既使用者70株の発育最高濃度

PZAγ/cc 使用量	0	5	10	25	50	100	500	1,000
	100 g 以内	0	1	1	2	0	2	3
200 g "	0	1	2	4	2	5	2	1
300 g "	0	2	0	3	4	8	5	2
400 g "	0	0	1	0	3	7	1	1
500 g "	0	0	0	1	1	1	0	0
500 g 以上	0	0	0	0	1	3	0	0
計	0	4	4	10	11	26	11	4

IV 考 案

抗結核剤の臨床耐性限界は年々重ねられる多くの成績によって一歩一歩真の値に近づくものであり、この点 PZA においても例外でなく決定には慎重を期さねば

表 6

~ 25 γ	50 γ ~	
未使用者 210(236)	280 (254)	490
既使用者 262(236)	228 (254)	490
472	508	980

() 内は理論度数

表 7

	~25γ	50γ~	
200 g 以内	11 (6.69)	15 (19.31)	26
300 g 以上	7 (11.31)	37 (32.69)	44
	18	52	70

() 内は理論度数

ならない。

現在「社会保険における PZA の使用基準」によれば他の薬剤に耐性を獲得したもののみに使用を制限している。一方からみればこの適応者はまた PZA の耐性をも獲得しやすい条件をそろえていることを意味する。著者の PZA 使用者群 (70 例) はそのうちでも治療後も排菌を続けている症例のみから構成されている。し

表 8 PZA既使用者X線分類基本型

B 型			C 型			F 型
1	2	3	1	2	3	
0	1	2	1	34	3	31

たがって使用前の胸部 X 線を学研分類にあてはめるとその基本型は表 8 のとおりほぼ線維乾酪型あるいは重症混合型であり、中等度以上の病巣の拡りを持ち、全例に空洞あり、その性状および大きさは表 9 のとおりで硬化壁が多く、とくに多房性が目立ち、中等大以上が多

表 9 同 空 洞

空 洞 壁	空洞の大きさ	例 数
Ka 非硬化輪状空洞	2 (4)	1
Kc 非硬化多房空洞		1
Kx 硬化輪状空洞	1 (小)	4
	2 (中)	4
	3 (大)	2
Ky 硬化巣中の空洞	1 (小)	2
	2 (中)	5
	3 (大)	1
Kz 硬化多房空洞		19

い。著者¹⁵⁾は PZA・INH の初回治療で優れた抗結核作用を報告したが、結核予防会化学療法研究班¹⁶⁾¹⁷⁾の初回治療でも浸潤型および非硬化壁空洞にはいわゆる 3 者併用療法にまさるとも劣らぬ効果を認めたと報告している。今回の著者の集計では社会保険の制限をうけ、また X 線による病理解剖学的変化の推定では他の抗結核剤にても効果が期待しがたい症例で占められている。したがって治療による経過のうち X 線基本型を学研判定基準でみると、2b 軽度改善 2 例、3 不変 62 例、4 増悪 5 例、5 不検 1 例の結果となっている。ここではこれらの症例に PZA の使用が適正であったかどうかの問題を取上げないが、かかる症例は PZA 耐性獲得を疑わせるに十分であることは推定せられ、したがってその集計は PZA の臨床耐性限界の調査目的にはもつとも都合の材料となりえたと考ええる。PZA 未使用者群 (表 4) に 3 例の 25 γ /cc がある。一般に接種菌量と耐性度には密接な関係があり菌量の多少により耐性度に大小の差をみる。あるいはこの 3 例は手技上の接種菌量に問題があるのかもしれない。したがって多量の菌を接種しすぎた場合をも考慮すれば 25 γ /cc を耐性限界とはしがたい。しかし推計学的には 25 γ /cc の

表 10

~ 10 γ	25 γ ~	
耐性株 67(51.85)	3 (18.15)	70
感受性株 133(148.15)	67 (51.85)	200
200	70	270

() 内は理論度数

耐性出現 (表 10) は偶然と推定されている ($\chi^2=22.94$ $df=1$ $0.001 > p$)。

臨床上の耐性限界を 50 γ /cc 以上とした場合、この値はまた前述 PZA の血中最高濃度をやや上まわつた値でもあり合理的と考える。小川⁷⁾は 10 γ /cc, 100 γ /cc, 1,000 γ /cc, 5,000 γ /cc 系列培地を製し感性菌では 10 γ /cc で阻止されるものは半分にすぎず、100 γ /cc 以上で発育するものは耐性菌と考えると述べているが症例の記載がない。第 34 回日本結核病学会総会のシンポジウムでは著者のあと 旗野¹⁸⁾は 10 γ /cc 以上と述べ、司会者報告では単に著者との間がとられて臨床上の限界を 10 γ /cc ~ 50 γ /cc と決定報告された。討議時間がなかつたが 10 γ /cc の値は表 3 諸家の報告でみられるように H₃₇Rv が発育する濃度であり、小川⁷⁾の感性株の半数にも発育する濃度であり取上げることはできない。キルヒナー培地は他の液体培地と同じくときにはその判定で 1, 2 段階の間で発育程度判別困難な場合がある。これに対して固型培地は製作が容易であり汚染率が少なく肉眼的判定が確実でありかつ定量的である。小川培地はこの点使用できる培地である。鶏卵培地を使用した他の報告はきわめて少なく、宮本¹⁹⁾は 1, 3, 5 % 第一磷酸カリ小川培地で H₃₇Rv の阻止力を調べ pH の酸性移行によつて発育阻止力の増強はみられなかつたと報告しているが精密な pH の測定は行なわれていない。また岡野⁹⁾はガラス電極 pH メーターを用い、小川培地の pH 5.0~5.5 の環境では結核菌は対照培地にも発育せず 5.56~5.79 が適当であると述べ、さらに患者より分離した 10 株のうち未使用者 7 株中にも低くない耐性値を認め、酸性条件下における臨床的意義については今後追求さるべき課題であると述べている。実際上小川培地作製にあたっては常に小数点以下 2 桁まで正確に pH 5.50 とすることは困難であり、10 数回測定した凝固水は pH 4.98~5.53 の測定値を示した。これは鶏卵という安定性のない組成の材料を用い、滅菌凝固操作や pH メーターの読みの誤差等を考慮しなければならないので著者は pH 4.98~5.53 の巾を便宜上 pH 5.5 培地と称している。岡野の報告では培地 pH は凝固操作により 0.2~0.3 上がると述べ著者の表 1 の成績と相違がある。おそらく凝固水という微量の試料測定に問題があるのではないかと思われるが小数点以下 2 桁の値を論ずるにしては 0.2~0.3 の値は粗雑にすぎると述べている。また同論文中 pH 5.79 培地で H₃₇Rv が 500 γ /cc までも不完全発育を示している事実が示すように pH 5.79 では意味がない。しかし著者の pH 5.5 培地が pH 4.98~5.53 より以上にどれほどの巾を許容できるかは今後の問題である。

次に pH 5.5 の低水素イオン濃度と生体との関係および、酸性培地上の発育最高濃度をただちに PZA 薬

耐性と同意義に解釈してよいかの問題がある。内藤⁸⁾は酸性培地で阻止作用を認めるが、生体細胞の pH がまだ直接に細かく測定できない点より、現在のところ pH の問題だけで PZA 効果の秘密がとけるものか不明であると述べている。藤田²⁰⁾によれば正常人の血液 pH は 7.24~7.42 (37°C), 7.50~7.63 (15°C) であり、また結核菌の発育最適 pH は 6.8~6.9 といわれている。これらの値からすれば pH 5.5 培地は強い酸性度と思われる。しかし永井²¹⁾はガラス電極で肺臓の pH を測定し、健常肺では pH 7.15~7.2 であるが結核病巣では 6.8~6.2 と測定している。従来行なわれている Gräff の測定法からすればガラス電極の発達は pH 測定に画期的な影響を及ぼしさらに電極の改良で臓器に刺入して測定することすら可能となった。しかし血液という中性領域の pH で強い緩衝能をもつ液を否定することはできず、前述計測値もこの点を考慮したうえでみなければならぬ。また次の 2 つの実験は細胞内 pH を考慮した点で興味がある。すなわち Sprick²²⁾はカゼインナトリウム水溶液で動物の腹腔内に細胞を産出せしめたのち指示薬で染色した H₃₇Rv 死菌を接種しこれら細胞に貪食された結核菌の色調検鏡にて、マウス、モルモットの単球および好中球の pH を 4.7~5.5 と報告している。また Mackaness²³⁾は生理的 pH 範囲内の培地で家兎の単球に H₃₇Rv 生菌を貪食せしめたのち PZA を 10 日間接触せしめたところ、12.5 γ/cc 以上では発育を阻止し、50 γ/cc では消化されてしまつていと述べている。これらを考えあわせると pH 5.5 の酸性環境は生体でありえない低水素イオン濃度ではなく、pH 5.5 培地を利用した耐性検査方法は意義があると考える。

IV 結 語

pH 5.5 のキルヒナー培地と 1% 小川培地に PZA を 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1,000 γ/cc 含有せしめ、H₃₇Rv および PZA 未使用者、既使用者それぞれ 70 例より分離した結核菌株を用いて発育阻止力を *in vitro* で観察し、臨床上の PZA 耐性限界を調べ以下の成績を得た。

1) キルヒナー基汁に 10% 牛血清を添加すると pH を著しくアルカリ側に傾かせるので、本研究には不適當であり、アルブミン榮研を代用した。小川培地は滅菌凝固操作による pH のアルカリ側移行を考慮しあらかじめ pH 5.10 に修正して滅菌凝固すべきであり、小川[の原法に修正を加えた。小川培地は routine test として推奨できる培地である。

2) キルヒナー培地、小川培地上での発育はほぼ平行する。H₃₇Rv が発育する最高濃度は 10~25 γ/cc であり、PZA 未使用者群では 5 γ/cc をピークとし 50

γ/cc 以上で発育した例はなかつた。これに対し使用者群では 100 γ/cc をピークとして高濃度の側によつてゐる。

3) pH 5.5 の生理的意義について文献的考察を加え、また PZA 使用者群の胸部 X 線および同経過と発育成績より臨床上の耐性限界を pH 5.5 培地で 50 γ/cc 以上と考える。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を戴いた恩師篠島四郎教授に深く感謝します。また種々便宜を与えられた 11 施設、ならびに推計学的処理に関し御指導を賜つた本学公衆衛生大沢忠好学士に感謝します。

本論文の要旨は第 34 回日本結核病学会総会で発表した。

引用文献

- 1) Steenken, J.R. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 367, 1954.
- 2) 中村善紀 : 呼吸器診療, 11 : 195, 昭31.
- 3) 厚生省結核療法研究協議会 : 日本医事新報, 1646 : 3, 昭30.
- 4) 掛見喜一郎 : 薬学雑誌, 76 : 906, 昭31.
- 5) 高階二郎 : 総合医学, 12 : 631, 昭30.
- 6) Mc Dermott, W. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 748, 1954.
- 7) 小川辰次 : 日本医事新報, 1746 : 119, 昭32.
- 8) 内藤益一 : 総合臨床, 6 : 151, 昭32.
- 9) 岡野正光 : 結核研究の進歩, 22 : 47, 昭33.
- 10) Wasz-Höckert, O. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 572, 1956.
- 11) 高橋欽一 : 日本臨床結核, 15 : 853, 昭31.
- 12) 小川辰次 : 結核菌検索の基礎と応用, 保健同人社, 225, 昭28.
- 13) 安井雅典 : 神戸医科大学紀要, 9 : 31, 昭32.
- 14) 神頭勝太 : 胸部疾患, 1 : 198, 昭32.
- 15) 平井得夫 : 総合診療, 1 : 36, 昭33.
- 16) 結核予防会 : 結核, 32 : 431, 昭32.
- 17) 結核予防会 : 結核, 34 : 107, 昭34.
- 18) 箕野脩一 : 結核, 34 (増刊号) 掲載予定.
- 19) 宮本泰 : 結核, 31 : 674, 昭31.
- 20) 藤田秋治 : pH 測定の実論と実際, 南江堂, 161, 昭29.
- 21) 永井純太 : 結核, 32 : 609, 昭32.
- 22) Sprick, M.G. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 552, 1956.
- 23) Mackaness, G.B. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 718, 1956.