

## 結核菌のサイクロセリンならびにカナマイシンに対する感受性測定結果

宮 部 潤 子

国立東京第一病院内科 (医長 小山善之)

受付 昭和34年3月12日

サイクロセリン (CS) は近年抗結核剤として注目され、人肺結核症に対しても単独投与あるいは INH その他と併用することにより、かなりの治療効果を示すといわれている<sup>1)~6)</sup>。一方カナマイシン (KM) については柳沢<sup>7)~9)</sup>らにより試験管内の抗結核作用とマウスおよびモルモットの実験結核症に対する治療効果が確認され、かつ KM と SM、PAS および INH との間に交叉耐性がないことも認められた。その後の臨床研究によつて、SM にほぼ匹敵する治療効果があるといわれている<sup>10)</sup>。

CS あるいは KM による治療が広く行われるようになれば、これらの薬剤に対する耐性菌の出現が問題になってくる。私は CS に接したことのない結核菌株の CS 感受性と、KM に接したことのない結核菌株の KM 感受性とを測定するとともに、CS 治療患者および KM 治療患者から分離した株のそれぞれの薬剤に対する感受性を経過にしたがって測定し、治療経過と感受性推移の関係を検討した。

なお KM は卵黄に吸着される<sup>11)</sup>ので、鶏卵培地を用いて KM 感受性を測定するのは適当でないといわれている。そこで私は Dubos アルブミン寒天培地を用いて実験を行った。CS については鶏卵培地を用いても差支えないが<sup>12) 13)</sup>、同じく Dubos アルブミン寒天培地を用いた。

## 実験材料および方法

## I. 使用菌株

国立東京第一病院に入院中の肺結核患者のうち CS 治療を受けたことのない患者の喀痰から分離した 18 株について CS 感受性を測定し、CS 治療患者 4 名については治療経過にしたがって数回分離した株の感受性を測定した。同様に KM 未治療患者から分離した 24 株の KM 感受性を測定し、KM 治療患者 5 名については治療経過にしたがって数回測定を行った。これらの菌株は、3%小川培地による新鮮分離株、分離後 岡・片倉培地あるいは Dubos アルブミン寒天培地に 1 代から 3 代継代したもの、INH 10  $\gamma/ml$  耐性分離株をさらに 12 代から 42 代にわたり INH 10  $\gamma/ml$  含有小川培地に継代したものなどから成っている。新鮮分離株は 6~8 週間、継代株は 2~5 週間培養したものをを用い

た。なお測定にあつては毎回 H<sub>37</sub>Rv 株を対照として用いた。

## II. 使用培地

Dubos アルブミン寒天培地を用いた。基礎培地ははじめ結核培地研究協議会の規定により調製したが、途中から Difco 製 Bacto-Dubos oleic agar 粉末<sup>14)</sup>を用いた。これに牛血清アルブミン (榮研) を 1/9 容加え、さらに CS または KM の滅菌蒸溜水溶液を加え、混和して斜面とした。

培地中の薬剤濃度は CS 3, 10, 30, 100  $\gamma/ml$ 、KM 0.3, 1, 3, 10  $\gamma/ml$  とした。なお途中から KM 100  $\gamma/ml$  を加えた。

## III. 接種方法および判定規準

使用菌株の集落をできるだけ多く掻き取り、瑪瑙乳鉢で磨砕し、滅菌蒸溜水を加えてはば 0.01  $mg/ml$  の菌液を作り、その 0.1  $ml$  を各培地に接種した。接種生菌単位を測定するため、菌液をさらに 1,000 倍稀釈し、0.1  $ml$  を薬剤を含まぬ培地に接種した。37°C で培養し、1 週間ごとに 5 週間まで観察し、集落発生状況を肉眼的に一から卅まで 5 段階に分けて記載し、4 週間の成績をもつて判定した。判定にあつては、対照培地と同程度ないし 1 段階差程度の発育を示した培地の薬剤最高濃度をもつて耐性とした。

## 実験結果

## I. CS 感受性

H<sub>37</sub>Rv は CS 10  $\gamma/ml$  まで発育し 30  $\gamma/ml$  で阻止された。CS 治療を受けたことのない患者から分離した 18 株のうち 17 株は 10  $\gamma/ml$  まで発育したが、1 株のみは 30  $\gamma/ml$  まで発育した。分離株の中には SM 10  $\gamma/ml$  耐性株 1, PAS 1  $\gamma/ml$  耐性株 1, INH 1  $\gamma/ml$  耐性株 1, 10  $\gamma/ml$  耐性株 3, SM-PAS・INH 3 重耐性株 1 が含まれているが、それらはいずれも CS 10  $\gamma/ml$  まで発育し、30  $\gamma/ml$  で阻止された。

CS 治療患者 4 例は、いずれも長期間各種の化学療法を受けながら好転せずに排菌を続けている例で、INH に対しては表 2 のような耐性を示している。今回は CS 0.5 g と IHMS 1.5 g 毎日内服を 4 カ月ないし 8 カ月行つたが、第 2 例のみは 3 カ月の終りからさらに

PZA 1.5 g 毎日内服を併用した。治療日数とCS耐性の関係は表2のとおりであった。第1例と第2例は治療90日付近で、第3例は105日付近で耐性が10  $\gamma/ml$  から30  $\gamma/ml$  に上昇した。第4例は治療開始後2日目の分離株が30  $\gamma/ml$  耐性を示したが、その後の測定では毎回10  $\gamma/ml$  耐性であった。

これらの患者の1日喀出生菌数とCS感受性の推移を検討したところ、第1例において図1のような変動がみられた。すなわち治療前の1日喀出生菌数は $10^7$ 程度であったが治療開始と同時に減少しはじめ、45日ころには $10^4$ 程度となった。しかし90日目の喀痰で $10^6$ に急増し、このときCS耐性が10  $\gamma/ml$  から30  $\gamma/ml$  に上昇した。なおこの例は120日でCS治療を中

表1 CSまたはKM未使用患者より分離せる菌株のCSまたはKM耐性 ( $\gamma/ml$ )

薬剤	測定株数	各濃度における耐性株数					
		0.3	1	3	10	30	100
CS	18				17	1	
KM	24	3	17	4			

H<sub>37</sub>Rv の耐性 { CS 10  $\gamma/ml$   
KM 1 "

接種生菌単位 10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup>

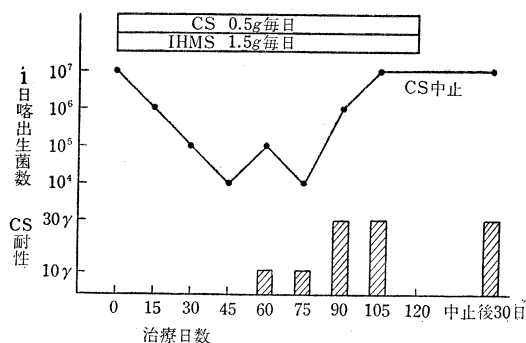
判定 4週間

表2 CS治療と耐性

症例	併用薬剤とその耐性 $\gamma/ml$	治療日数	CS耐性 $\gamma/ml$									
			2	35	60	75	90	105	120	150	165	180
1	IHMS	INH 1			10	10	30	30	中止	* 30	* 50	* 30
2	IHMS PZA	INH 1			10		30	30		30	30	30
3	IHMS	INH 0.1			10		10	30				
4	IHMS	INH 1	30	10	10	10						

\* CS治療中止後

図1 1日喀出生菌数とCS感受性の推移〔症例1〕



止したが、その後2ヵ月までの検査では毎回30  $\gamma/ml$  耐性を保持している。第2例は喀痰量が少なく、1日喀出生菌数の消長に変動が多く、感受性低下との間に特別の関係は認められなかったが、第1例と同じところに10  $\gamma/ml$  から30  $\gamma/ml$  まで耐性上昇を示した。第3例、第4例は1日喀出生菌数に著変がなく、CS感受性との関係にも特別のものはなかった。

II. KM感受性

H<sub>37</sub>Rv は KM 1  $\gamma/ml$  まで発育し、3  $\gamma/ml$  で阻止された。KM治療を受けたことのない患者から分離した24株のうち、3株は0.3  $\gamma/ml$ 、17株は1  $\gamma/ml$ 、

4株は3  $\gamma/ml$  まで発育した(表1)。これらの中にはSM 10  $\gamma/ml$  耐性株1、100  $\gamma/ml$  耐性株1、PAS 1  $\gamma/ml$  耐性株1、100  $\gamma/ml$  耐性株1、INH 3  $\gamma/ml$  耐性株1、10  $\gamma/ml$  耐性株3、SM・PAS・INH 3重耐性株2が含まれているが、それらとKM感受性との間には特別の関係は認められなかった。

KM治療患者5例について治療日数とKM耐性の関係を示すと表3のとおりであった。第1例は各種薬剤耐性菌を有する重症例で、KM 1 g 週2回筋注とIHMS 1.5 g 毎日内服を併用した。INH耐性は1  $\gamma/ml$ 、KM耐性は治療前1  $\gamma/ml$ 、治療60日以後は3  $\gamma/ml$  となった。1日喀出生菌数にはほとんど変化がなかった。第2例も同様の重症例で、KM 1 g 週2回筋注、IHMS 0.6 g 毎日内服、PZA 2 g 毎日内服を併用した。INH耐性は1  $\gamma/ml$ 、KM耐性は治療前1  $\gamma/ml$  であったが、治療60日以後は常に100  $\gamma/ml$  の培地にも対照培地と同程度の菌発育を認めるようになった。1日喀出生菌数にはほとんど変化がなかった。第3例は中等症で、その分離株はSM 1  $\gamma/ml$ 、PAS 1  $\gamma/ml$ 、INH 0.1  $\gamma/ml$  のいずれによつても発育阻止された。KM 1 g 週2回、IHMS 0.4 g 週2回、PAS 10 g 毎日を併用した。KM耐性は75日に3  $\gamma/ml$  に上昇したが、1日喀出生菌数は45日ころから減少し

表3 KM 治療と耐性

症例	併用薬剤とその耐性 $\gamma/ml$	治療日数	KM 耐性 $\gamma/ml$								
			0	15	30	45	60	75	90	105	120
1	IHMS	INH 1	1	1			3	3		3	
2	IHMS PZA	INH 1	1				100	100		100	
3	PAS IHMS	PAS <1 INH <0.1	1	1			1	3			
4	PAS	PAS <1		1			1	1	1	1	1
5	PAS IHMS	PAS <1 INH <0.1		3	1	1	1	1			

はじめ、120日ころに培養陰性となった。第4例は初回治療に近い中等症で、分離株は SM 1  $\gamma/ml$ , PAS 1  $\gamma/ml$ , INH 0.1  $\gamma/ml$  のいずれによつても発育阻止された。KM 1 g 週2回と PAS 10 g 毎日を併用し、KM 耐性は現在まで 1  $\gamma/ml$  に留まっているが、1日喀出生菌数はやや増加する傾向にある。第5例は初回治療の中等症で、SM 耐性 3  $\gamma/ml$ , PAS 耐性 1  $\gamma/ml$  以下、INH 耐性 0.1  $\gamma/ml$  以下であった。KM 2 g 週2回、IHMS 0.4 g 週2回、PAS 10 g 毎日を併用した。KM 耐性は治療開始後15日目の株で 3  $\gamma/ml$  であつたが、その後の検査では毎回 1  $\gamma/ml$  であつた。1日喀出生菌数はやや減少する傾向にある。

考案

I. CS 感受性について

CS の結核菌発育阻止濃度については多くの報告があるが、測定値にかなり開きがあるのは菌株、培地組成、接種菌量、判定までの培養期間などによるものであろう。H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub>, 患者からの分離株など人型菌を用いた成績では、液体培地による培養2週間以内の判定で最少発育阻止濃度 5~12.5  $\gamma/ml$  との報告が多く<sup>13) 15) 16)</sup>、液体培地に 4~5 週間培養したものでは 12.5~31.3  $\gamma/ml$  程度との報告がある<sup>12) 17)</sup>。固形培地による成績のうち、Steenken<sup>16)</sup> らは ATS 培地で最少発育阻止濃度が 20  $\gamma/ml$ , Middlebrook 7 H 9 変法寒天培地で 40  $\gamma/ml$  と述べている。私が Dubos アルブミン寒天培地を用いて得た 10  $\gamma/ml$  に発育、30  $\gamma/ml$  で阻止という成績は従来の報告と大差ない。Steenken<sup>12)</sup> らは試験管内実験によつて CS 感受性がきわめて徐々に低下することを示し、その様相は PAS 耐性の試験管内発現状況とよく似ていると述べている。しかし、試験管内では比較的容易に CS 耐性を獲得するともいわれる<sup>13)</sup>。臨床的には耐性獲得はあまり問題にならないという報告も多いが<sup>1) 3) 18)</sup>, Schwartz<sup>19)</sup> ら, Lester<sup>20)</sup>

らは、治療中徐々に感受性低下をきたすという。しかしあまり高い耐性値は得られず、10カ月治療を行つても 100  $\gamma/ml$  に発育するものは現われなかつたという<sup>19)</sup>。私の成績でも 100  $\gamma/ml$  に発育したものはなかつたが、4例中3例は3カ月の終りから4カ月にかけて感受性低下をきたした。なお化学療法によつて一たん減少した喀出生菌数が再び増加するのと同じころにその薬剤に対する菌の感受性が低下することはしばしばみられるが<sup>21)~25)</sup>、第1例はちょうどこのような推移を示している。治療90日に現われた 30  $\gamma/ml$  耐性菌は、この症例に対するこのCS投与量という条件では、もはや発育を阻止されない臨床的耐性菌と考えて差支えないと思われる。

II. KM 感受性について

液体培地を用いて測定した KM の最少発育阻止濃度は、やはり培地組成、培養日数その他によつて多少異なるが、KM に接したことのない人型菌についてはほぼ 0.5~5  $\gamma/ml$  の範囲にある<sup>7) 26) 27)</sup>。小川<sup>28) 29)</sup> らの Kirchner 変法寒天培地を用いての研究によれば、耐性は 1  $\gamma/ml$  以下~2  $\gamma/ml$  である。私の Dubos アルブミン寒天培地を用いての値も 0.3  $\gamma/ml$  から 3  $\gamma/ml$  の間にあり、ほぼ同様の成績であつた。KM に接したことのない株にも少数ながら 3  $\gamma/ml$  耐性株があるのは、菌株による差異や測定誤差によるものと考えられる。したがつて治療中に 3  $\gamma/ml$  耐性株が現われたとしても、1回の測定結果からただちに耐性獲得とはいひがたいが、第1例のように治療60日ころ 3  $\gamma/ml$  耐性となり、その後引き続き同耐性を維持している例は、一応治療によつて感受性が低下したのと考えて差支えないと思われる。また第2例は治療60日ころに高耐性菌を生じたが、堂野前<sup>28)</sup> らの試験管内実験でも KM の耐性獲得様式は SM のそれと似ており、かなり急速に高耐性菌を生じうるのである。堂野前<sup>28)</sup> らの臨床成績によれば、KM に PAS を併用すると KM 耐性菌出現を著しく遅延せしめうるとされ、治療2カ月で 10  $\gamma/ml$

耐性菌を生じたものは 39 例中 2 例となっている。私の例は入院当時から SM 100  $\gamma/ml$ , PAS 10  $\gamma/ml$ , INH 3  $\gamma/ml$  の耐性菌をもっており、2 カ月あまり IHMS と PZA 併用を試みたが好転しないので止むをえずこれに KM を加えたもので、おそらく IHMS, PZA の併用によって KM 耐性獲得を防止されることも少なく、実質的には KM 単独投与に近かつたのではないかと思われる。第 3 例、第 4 例および第 5 例からの分離株は治療 75~120 日の現在までいずれも著明な感受性低下を示していないが、これらはいずれも併用薬剤に感受性であるから、それら併用薬剤によって耐性獲得が抑えられているのではないかと思われる。

### 総 括

Dubos アルブミン寒天培地を用いて、患者喀痰から分離した菌株の CS と KM に対する感受性を測定し、次の結果を得た。

1. CS を使ったことのない患者からの分離株は、H<sub>37</sub>Rv と同じく CS 10  $\gamma/ml$  まで発育し 30  $\gamma/ml$  で阻止された。
2. CS 治療患者 4 例中 3 例は 3 カ月から 4 カ月目に CS 感受性低下をきたし、そのうち 1 例において、一たん減少した 1 日喀出細菌数が再び増加すると同時に感受性低下がみられた。
3. KM を使ったことのない患者からの分離株は、大部分が H<sub>37</sub>Rv と同じく KM 1  $\gamma/ml$  まで発育し 3  $\gamma/ml$  で阻止されたが、0.3  $\gamma/ml$  まで発育するもの、3  $\gamma/ml$  まで発育するものも少数ずつみられた。
4. KM 治療患者 5 例中 1 例は、治療 2 カ月に KM 100  $\gamma/ml$  でも全く阻止されない耐性菌を生じた。

擲筆するに当り御指導戴いた内科医長小山善之博士、検査科小酒井望博士、御協力下さった結核病棟三上次郎博士に深謝する。

なお本研究の要旨は第 50 回日本結核病学会関東地方会において発表した。

本研究に要した費用の一部は厚生科学研究費「結核菌培養法の改良に関する研究」によつた。

### 文 献

- 1) Epstein, I.G., et al. : Diseases of the Chest, 29 : 241, 1956.
- 2) Epstein, I.G., et al. : Tr. Fifteenth Conference on

the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration, Army, and Navy, Feb., 1956.

- 3) Epstein, I.G., et al. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 553, 1957.
- 4) Scalfi, G.F., et al. : Ann. Med. Sondalo, 5 : 141, 1957. (Abstr. in Am. Rev. Tuberc., 77 (1) : 7, 1958)
- 5) 堂野前維摩郷 他 : 最新医学, 12 : 1051, 昭32.
- 6) 島本多喜雄 他 : 診断と治療, 44 : 1138, 昭31.
- 7) 柳沢謙 他 : 日本細菌学雑誌, 12 : 857, 昭32.
- 8) 金井興美 他 : 日本細菌学雑誌, 13 : 1, 昭33.
- 9) 柳沢謙 他 : 日本細菌学雑誌, 13 : 94, 昭33.
- 10) 堂野前維摩郷 他 : 日本臨牀結核, 17 : 525, 昭33.
- 11) 梅沢浜夫 : カナマイシン明治 (文献集), 1-16, 明治製菓株式会社, 東京, 昭33.
- 12) Steenken, W. Jr., et al. : Am. Rev. Tuberc., 73 : 539, 1956.
- 13) 海老名敏明 他 : 日本臨牀結核, 16 : 30, 昭32.
- 14) Difco Manual : 107, Difco Laboratories, Detroit, 1953.
- 15) 原義雄 : 最新医学, 12 : 109, 昭32.
- 16) Barclay, W.R., et al. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 236, 1955.
- 17) Freerksen, E., et al. : Tuberkulosearzt, 12 : 39, 1958.
- 18) Le Lourd, R., et al. : J. Méd. Bordeaux, 134 : 316, 1957. (Abstr. in Am. Rev. Tuberc., 77 (1) : 9, 1958)
- 19) Schwartz, W.S., et al. : Am. Rev. Tuberc., 76 : 1097, 1957.
- 20) Lester, W. Jr., et al. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 121, 1956.
- 21) 小酒井望 他 : 結核, 27 : 432, 昭27.
- 22) 小酒井望 他 : 結核, 29 : 6, 昭29.
- 23) 勝木司馬之助 他 : 日本臨牀結核, 12 : 102, 昭28.
- 24) 中村善紀 他 : 日本臨牀結核, 12 : 179, 昭28.
- 25) 亀山禧 : 結核, 33 : 457, 昭33.
- 26) 堂野前維摩郷 他 : 診断と治療, 47 : 171, 昭34.
- 27) Patnode, R.A., et al. : Am. Rev. Tuberc., 78 : 138, 1958.
- 28) 小川辰次 他 : 結核, 33 : 749, 昭33.
- 29) 小川辰次 他 : 結核, 33 : 807, 昭33.