

## 結核菌のカナマイシン耐性に関する研究

## 第3報 試験管内におけるカナマイシン交叉耐性について

前 田 徹

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受 付 昭和34年8月21日

## 結 言

すでに柳沢ら<sup>1)</sup>によつてカナマイシン (以下 KM) が PAS, INH および SM に対して交叉耐性を示さないことが報告された。しかし, Steenken ら<sup>2)</sup>は Neomycin (Fradimycin および Dexamycine と同物質, 以下 FM) および Viomycin (以下 VM) と KM との交叉耐性を検討し, KM と FM とは complete cross resistance であり, VM 1,000  $\gamma/ml$  耐性菌は KM 1,000  $\gamma/ml$  に耐性であると報告した。著者は前報告<sup>3)</sup>で KM 耐性菌が SM 1  $\gamma/ml$  前後において感受性低下を示し, SM 耐性菌も KM 1  $\gamma/ml$  前後において同様に感受性低下を示したことを述べたが, これらの耐性菌の相手薬剤に対する耐性獲得態度は感性菌と同様であつた。またこれらの耐性菌感染動物に対して KM あるいは SM が著効を奏した柳沢らの成績<sup>1)</sup>からも, かかる低濃度の交叉耐性は化学療法の見点からすれば問題にならないと思われる。したがつて本実験では対象として高濃度耐性菌を選んだ。

臨床的に FM は副作用<sup>4)5)</sup>のため抗結核剤として用いられていないが, VM は SM 耐性菌喀出患者に対して適時用いられている。Steenken らの報告<sup>2)</sup>によれば KM 治療計画は VM 耐性の有無によつて左右されることになる。著者は本実験において, 人型結核菌の KM, FM および VM に対する交叉耐性について検討したので報告する。

## 実験方法および実験材料

- 1) 使用結核菌: 研究室保存の人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を用いた。
- 2) 使用培地: 前報告<sup>3)</sup>と同様, Kirchner 寒天培地を用いた。KM は明治製菓の「カナマイシン」硫酸塩, FM は武田薬品工業の「デキストロマイシン」硫酸塩, VM は Pfizer の「Viocin」硫酸塩を用いた。
- 3) 耐性菌の分離ならびに交叉耐性検査法: 大量の菌を薬剤含有培地に接種し, step by step 法<sup>3)</sup>によつて速やかに薬剤 200  $\gamma/ml$  および 1,000  $\gamma/ml$  に発育した各耐性菌を分離し, 培養 4 週後に白金耳で 1% 小川培地に継代増菌した。1% 小川培地で 2 週培養後の発育旺盛の菌を相手薬剤含有培地にも接種して, 培養 4 週後に発育集落数を数えて, 接種菌量 1 mg 中の生菌数 (v.u.) として, 相手薬剤に対する感受性低下を検討した。

## 実 験 成 績

〔実験1〕耐性菌の分離経過ならびに H<sub>2</sub> 株の KM, FM および VM に対する感受性

まず表1のごとく, H<sub>2</sub> 感性株の大量の菌を含む菌液を接種し, step by step 法によつて耐性の上昇はかつた。初代の分離では KM, FM および VM ともに秤量重量によつたので, 濃度を力価濃度に換算し, KM 13  $\gamma/ml$ , 33  $\gamma/ml$ , FM 13  $\gamma/ml$ , 32  $\gamma/ml$ , VM 16  $\gamma/ml$ , 39  $\gamma/ml$  とした。2代目以後はすべて力価濃度である。3代目にそれぞれの薬剤 200  $\gamma/ml$  を含有する培地に発育した菌を被検菌とした。

被検菌の感受性低下を検討するに先立ち, 表2のごと

表1 KM 耐性菌, FM 耐性菌および VM 耐性菌分離のための step by step 法による耐性上昇

継代代数	対照培地	KM mcg/ml						FM mcg/ml						VM mcg/ml					
		13	33	50	100	200	1,000	13	32	50	100	200	1,000	16	39	50	100	200	1,000
I	■	+	39#	/	/	/	/	■	##	/	/	/	/	■	+#	/	/	/	/
II	■	/	/	■	##	/	/	/	/	■	##	/	/	/	/	■	+#	/	/
III	■	/	/	■	■	■	■	/	/	■	■	■	0.5	/	/	■	■	+	0

注: # : 次代の耐性菌分離に使用, 数字は集落数平均値

+ : 100 以上の孤立集落, ■ : 一部分融合集落, ■ : 大部分融合集落, ■ : 培地全面に融合集落

く、H<sub>2</sub> 株の KM, FM および VM に対する感受性を 3 回検査した。1 回目と 3 回目の接種生菌数はそれぞれ 25×10<sup>6</sup> v.u. と 19.6×10<sup>6</sup> v.u. (以下 v.u. を省略) ではほぼ同数であったが、FM 5 γ/ml ではそれぞれ 28×10<sup>3</sup> と 10×10<sup>4</sup>, FM 10 γ/ml ではそれぞれ 10×10<sup>2</sup> と 15×10<sup>4</sup> の相違があった。また、VM 5 γ/ml ではそれぞれ 2×10<sup>5</sup> で同数であったが、VM 10 γ/ml では 3 回目のみに 3×10<sup>3</sup> を数えた。2 回目は接種生菌数が 40×10<sup>5</sup> で少なかったが、FM 5 γ/ml では 3 回目と同数の生菌数を示しながら FM 10 γ/ml では発育が阻止された。また、VM 1 γ/ml では 1 回目とほぼ同数の生菌数を示し、VM 5 γ/ml では発育が阻止された。すなわち、FM と VM に対して、H<sub>2</sub> 株には不安定な感受性があるかのごとく思われた。しかし、5 γ/ml の KM ならびに本実験では 20 γ/ml の含有培地を用いながつたが、大体 20 γ/ml から 50 γ/ml の FM および VM により H<sub>2</sub> 株の発育は完全に阻止されるといえるであろう 6)~10)。

表 2 H<sub>2</sub> 株の KM, FM および VM に対する感受性検査

薬剤	実験回数	薬剤濃度 mcg/ml				
		0	1	5	10	50
KM	I	25×10 <sup>6</sup>	/	0	0	0
	II	4×10 <sup>3</sup>	/	0	0	0
	III	19.6×10 <sup>6</sup>	15×10 <sup>3</sup>	0	0	0
FM	I	25×10 <sup>3</sup>	/	28×10 <sup>3</sup>	10×10 <sup>2</sup>	0
	II	4×10 <sup>6</sup>	/	11×10 <sup>4</sup>	0	0
	III	19.6×10 <sup>6</sup>	30×10 <sup>4</sup>	10×10 <sup>4</sup>	15×10 <sup>4</sup>	/
VM	I	25×10 <sup>6</sup>	50×10 <sup>4</sup>	20×10 <sup>4</sup>	0	/
	II	4×10 <sup>3</sup>	30×10 <sup>4</sup>	0	0	/
	III	19.6×10 <sup>3</sup>	/	20×10 <sup>4</sup>	30×10 <sup>2</sup>	0

注：数は接種菌量 1 mg 中の生菌数を示す。

〔実験 2〕 200 γ/ml 薬剤含有培地で分離した KM 耐性菌 (H<sub>2</sub>R-KM), FM 耐性菌 (H<sub>2</sub>R-FM) および VM 耐性菌 (H<sub>2</sub>R-VM) の交叉耐性

実験 1 に述べた step by step 法によつて耐性を上昇せしめた被検菌について行なつた。その成績は表 3 のごとくである。

H<sub>2</sub>R-KM は対照培地で 81×10<sup>6</sup>, 200 γ/ml まで 25×10<sup>6</sup> であるが、1,000 γ/ml では 22×10<sup>3</sup> の KM 耐性菌である。この菌は FM に対しては 5 γ/ml で 22×10<sup>6</sup> であるが、200 γ/ml にも発育集落を認め、FM に対する感受性低下を示した。また、VM に対しては 10 γ/ml で 20×10<sup>6</sup> であるが、100 γ/ml では 6×

表 3 200 γ/ml 薬剤含有培地で分離した H<sub>2</sub>R-KM, H<sub>2</sub>R-FM および H<sub>2</sub>R-VM の交叉耐性

薬剤含有濃度 mcg/ml	菌株 H <sub>2</sub>			
	R-KM	R-FM	R-VM	
KM	0	81×10 <sup>6</sup>	17×10 <sup>6</sup>	72×10 <sup>6</sup> +×10 <sup>5</sup>
	5	/	81×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>5</sup>
	10	25×10 <sup>6</sup>	71×10 <sup>5</sup>	19×10 <sup>3</sup>
	50	/	78.5×10 <sup>5</sup>	8×10
	100	25×10 <sup>6</sup>	77×10 <sup>5</sup>	3.5×10
	200	25.5×10 <sup>6</sup>	85×10 <sup>5</sup>	/
	500	60×10 <sup>3</sup>	/	/
FM	1,000	22×10 <sup>3</sup>	/	/
	5	22×10 <sup>6</sup>	/	235×10 <sup>5</sup>
	10	28×10 <sup>5</sup>	83×10 <sup>5</sup>	73×10 <sup>5</sup>
	50	20×10 <sup>3</sup>	90×10 <sup>5</sup>	64×10 <sup>3</sup>
	100	4×10	89×10 <sup>5</sup>	+×10
	200	+×10	97.5×10 <sup>5</sup>	+×10
	500	/	91×10 <sup>5</sup>	/
VM	1,000	/	98.5×10 <sup>5</sup>	/
	5	25×10 <sup>6</sup>	/	+×10 <sup>5</sup>
	10	20×10 <sup>6</sup>	41.5×10 <sup>5</sup>	+×10 <sup>5</sup>
	50	10×10 <sup>6</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>	+×10 <sup>5</sup>
	100	60×10 <sup>2</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	7.5×10 <sup>5</sup>
	200	/	56×10 <sup>3</sup>	2.5×10 <sup>3</sup>
	500	/	/	+×10
1,000	/	/	+×10	

注：1) +, 4: 表 1 に同じ。  
2) 数: 表 2 に同じ。

10<sup>3</sup> を示し、ある程度の感受性低下を示した。

H<sub>2</sub>R-FM は対照培地に 17×10<sup>6</sup> を生じ、FM 含有培地上 10 γ/ml では 83×10<sup>5</sup>, 1,000 γ/ml では 98.5×10<sup>5</sup> で、FM 10~1,000 γ/ml ではほぼ同数の発育集落を生ずる FM 耐性菌であつた。KM 含有培地では用意した最高含有濃度 200 γ/ml まで FM 含有培地上と大体同等の発育集落を生じ、明らかな感受性低下を示した。しかし、VM に対しては 10 γ/ml で 41.5×10<sup>5</sup>, 100 γ/ml で 2.5×10<sup>5</sup> であつたが、200 γ/ml では 56×10<sup>3</sup> となり、ある程度の感受性低下を示した。

H<sub>2</sub>R-VM は対照培地で 72×10<sup>6</sup> であつたが、VM 含有培地上 50 γ/ml までは対照培地と同等の発育を示

した。しかし 500  $\gamma/ml$  以上で生じた集落は小さく dysgonic であった。この  $H_2R-VM$  は  $KM$  含有培地上 10  $\gamma/ml$  で  $14 \times 10^5$ , また,  $FM$  に対しても 10  $\gamma/ml$  では  $73 \times 10^5$ , 100  $\gamma/ml$  では  $2.5 \times 10^3$  を示している。すなわち  $KM$  および  $FM$  に対して感受性低下を示している。

〔実験3〕 1,000  $\gamma/ml$  薬剤含有培地で分離した  $H_2R-KM$ ,  $H_2R-FM$  および  $H_2R-VM$  の交叉耐性

表 4 1,000  $\gamma/ml$  薬剤含有培地で分離した  $H_2R-KM$ ,  $H_2R-FM$  および  $H_2R-VM$  の交叉耐性

薬剤含有濃度 $mcg/ml$	菌株 $H_2$	R-KM	R-FM	R-VM
		0	$8 \times 10^5$	$17 \times 10^5$
KM	100	$6 \times 10^5$	$17.5 \times 10^5$	0
	500	$4 \times 10^5$	$14 \times 10^5$	0
	1,000	$5 \times 10^5$	$21 \times 10^5$	0
FM	100	$5 \times 10^5$	$19 \times 10^5$	( $500 \times 10$ )
	500	$8.5 \times 10^5$	$16 \times 10^5$	0
	1,000	$8 \times 10^5$	$13 \times 10^5$	0
VM	50	$82 \times 10^3$	( $500 \times 10$ )	$3 \times 10^5$
	100	$66 \times 10^3$	0	( $5 \times 10^4$ )
	500	$2 \times 10^3$	0	0
	1,000	0	0	0

注: 1) ( ) 内は推定生菌数  
2) 数は表 2 に同じ。

実験 2 において, 1,000  $\gamma/ml$  薬剤含有培地上に培養 4 週後発育した  $KM$  耐性菌,  $FM$  耐性菌および  $VM$  耐性菌を被検菌とした。成績は表 4 に示すごとくである。

$H_2R-KM$  は対照培地にも  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  あるいは  $FM$  1,000  $\gamma/ml$  のそれぞれの含有培地上にも同等の集落数を生じ,  $VM$  100  $\gamma/ml$  に  $66 \times 10^3$ , 500  $\gamma/ml$  に  $2 \times 10^3$  を生じた。

$H_2R-FM$  は対照培地, 1,000  $\gamma/ml$  までの  $KM$  含有培地にも,  $FM$  1,000  $\gamma/ml$  含有培地におけると同等の集落を生じた。しかし,  $VM$  に対してはむしろ実験 2 の場合より  $FM$  耐性が上昇したにもかかわらず  $VM$  耐性菌の出現率は低下している。

$H_2R-VM$  は  $VM$  1,000  $\gamma/ml$  含有培地で分離した耐性菌であったが, 実験 2 の場合よりその耐性は低下し,  $KM$  に対しては 100  $\gamma/ml$  でも発育が阻止され,  $FM$  100  $\gamma/ml$  に  $5 \times 10^3$  の集落(推定)の発育を認めにすぎなかった。

## 考 察

交叉耐性<sup>11)~15)</sup>をある薬剤に対する耐性菌がかつて一度も接触したことのない他の薬剤に感受性低下を示した場合と一応定義して, 本実験成績の  $KM$ ,  $FM$  および  $VM$  に対する感受性低下を検討したところ, 交叉耐性にも種々の場合があるように思われた。

交叉耐性の程度を耐性菌の任意の薬剤濃度における生菌数とその薬剤濃度に対する相手薬剤含有培地上の生菌数とそれら薬剤濃度の比較においてみると, 本実験例では, 200  $\gamma/ml$   $KM$  含有培地で分離した  $KM$  耐性菌の  $FM$  耐性は  $FM$  5  $\gamma/ml$  の生菌数が  $KM$  200  $\gamma/ml$  までの生菌数と大体同等であり,  $FM$  50  $\gamma/ml$  の生菌数は  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  の生菌数と同等である。しかし,  $KM$  200  $\gamma/ml$  までの生菌数は  $FM$  5  $\gamma/ml$  の生菌数と同等であるが,  $FM$  50  $\gamma/ml$  以上の生菌数は同等以下である(表 3)。しかし, 1,000  $\gamma/ml$   $KM$  含有培地で分離した  $KM$  耐性菌の  $FM$  耐性は  $FM$  1,000  $\gamma/ml$  までの生菌数が  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  までの生菌数と同等または同等以上であった(表 4)。そこで前者のごとく同一濃度における生菌数が同等以下の交叉耐性を示す場合を不完全交叉耐性 (slight cross resistance), 後者のごとく同等または同等以上の交叉耐性を示す場合を完全交叉耐性 (complete cross resistance) と分けてみた。この分け方によると,  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  までの  $H_2R-KM$  は  $VM$  に不完全交叉耐性を示し, また,  $FM$  200  $\gamma/ml$  耐性菌 (大体完全耐性) および  $FM$  1,000  $\gamma/ml$  完全耐性菌は  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  までの検査では  $KM$  に完全交叉耐性を示し, かつ  $VM$  に不完全交叉耐性を示したことになる。 $H_2R-VM$  は  $VM$  1,000  $\gamma/ml$  含有培地で分離しても不安定な耐性を示す傾向があり,  $VM$  1,000  $\gamma/ml$  耐性菌については確定した交叉耐性を把握できなかつたが, 200  $\gamma/ml$  の  $VM$  含有培地で分離した  $H_2R-VM$  は  $KM$  および  $FM$  に不完全交叉耐性を示した。次に薬剤相互間についてみると, 薬剤 1,000  $\gamma/ml$  含有培地で分離した  $KM$  耐性菌と  $FM$  耐性菌の  $KM$  および  $FM$  に対する交叉耐性は相互の完全交叉耐性 (reciprocal complete cross resistance) であるといえるであろう。また,  $KM$  と  $VM$  は相互の不完全交叉耐性 (reciprocal slight cross resistance) を示したことになるし, かつ  $FM$  と  $VM$  についても同様, 相互の不完全交叉耐性といえるであろう。Steenken らの成績<sup>2)</sup>では  $VM$  1,000  $\gamma/ml$  耐性菌は  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  にも耐性で,  $KM$  1,000  $\gamma/ml$  耐性菌は  $VM$  10  $\gamma/ml$  で発育が阻止されたと報告しているが, かかる場合は一方的交叉耐性 (one-way cross resistance) というべきであろう。この点について本実験では確認できなかつたが, さらに検討を加えている。

KM 耐性菌は FM に対して不完全交叉耐性から完全交叉耐性へと移行を示したが、さらに低濃度耐性菌の交叉耐性を検討してみたいと考えている。

さらに本実験では便宜的に完全および不完全の2種類に交叉耐性を分類し、その分類基準には同一薬剤濃度含有培地上における生菌数を比較したが、方法論的になお不十分であるかもしれない。なぜならば、薬剤によって感性菌に対する発育阻止濃度が違い、耐性菌の出現率もまた異なるからである。この点はさらに検討し、より十分にこれらの事象を説明するにたる基準要因を見出すべきであろう。

### 結 論

人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を用いて、KM, FM および VM の試験管内交叉耐性を検討して、次の成績を得た。

1) KM と FM の 1,000  $\gamma/ml$  耐性結核菌は相互に完全交叉耐性を示した。しかし KM 耐性菌は FM に対して、不完全交叉耐性から完全交叉耐性へ移行するようである。

2) KM 1,000  $\gamma/ml$  までの KM 耐性菌では VM に不完全交叉耐性を示した。

3) FM 1,000  $\gamma/ml$  までの FM 耐性菌では VM に不完全交叉耐性を示した。

4) 200  $\gamma/ml$  で分離した VM 200  $\gamma/ml$  不完全耐性菌は KM および FM に不完全交叉耐性を示した。また、1,000  $\gamma/ml$  で分離した VM 耐性菌の耐性度は不安定であり、交叉耐性について確定した成績は得られなかった。

稿を終わるにあたり、終始御指導、御校閲を賜わった予研柳沢副所長、室橋部長、佐藤博士ならびに技術的援助を頂いた丸山技官に深く感謝する。

### 文 献

- 1) 柳沢謙・金井興美：日本細菌学雑誌，13：95，昭33。  
金井興美・中島誠・柳沢謙：日本細菌学雑誌，13：496，昭33。
- 2) W. Steenken, Jr., V. Montalbaine, & J.R. Thurston : Ann. N.Y. Acad. Sci., 76 : 103, 1958 ; Amer. Rev. Tuberc., 79 : 66, 1959.
- 3) 前田徹：結核，35 : 92, 昭35.
- 4) W. Steenken, Jr., E. Wolinsky, & B.J. Bolinger : Amer. Rev. Tuberc., 62 : 300, 1950.
- 5) D.T. Carr, K.H. Pfeutze, H.A. Brown, B.E. Douglass, & A.G. Karlson : Amer. Rev. Tuberc., 63 : 427, 1951.
- 6) S.A. Waksman, D. Hichison, & E. Katz : Amer. Rev. Tuberc., 60 : 78, 1949.
- 7) W. Steenken, Jr., & E. Wolinsky : Amer. Rev. Tuberc., 63 : 30, 1951.
- 8) G.P. Youmans, & A.S. Youmans : Amer. Rev. Tuberc., 63 : 25, 1951.
- 9) 佐藤直行：医学と生物学，23 : 205, 昭27.
- 10) 国枝義治：京都大学結核研究所紀要，7 : 116, 昭34.
- 11) Jen-Yah Hsie, & V. Bryson : Amer. Rev. Tuberc., 62 : 286, 1950.
- 12) W. Szybalski, & V. Bryson : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 267, 1954.
- 13) Y. Morikubo : J. Antibiotics Ser. A, 11 : 171, 1958.
- 14) R. Utahara, H. Hamazaki, Y. Okami, & H. Umezawa : J. Antibiotics Ser. A, 12 : 28, 1959.
- 15) 東村道雄・野田用・山本昌邦・林光男・鳥居太：医学と生物学，50 : 4, 昭34.