

結核菌の α -ethyl-thioisonicotinamide (1314Th) 耐性 に関する基礎的研究

耐性形式、交叉耐性ならびに併用効果について

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

受付 昭和 36 年 6 月 13 日

結核菌の α -ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th) 耐性については基礎的研究として 3 つの観点がある。

第 1 は耐性形式の問題であつて、耐性獲得形式 (Demerec¹⁾, Hsie & Bryson²⁾, Bryson & Szybalski³⁾) がいかなる形式か、また耐性段階数 (東村⁴⁾) および耐性上限がいくつまたはどこにあるかという問題である。これについては現在のところまだ報告がない。ただ 1314 Th 耐性の特徴としてあげうることは、(a) 未使用患者の菌株による耐性度の差が大きいこと (Rist⁵⁾, Brouet⁶⁾, 東村⁷⁾), (b) この primary resistance と臨床効果とが関係深いこと (東村⁷⁾), および (c) 人体内でも⁷⁾~¹²⁾ 試験管内でも¹³⁾~¹⁵⁾ 耐性出現が速いことである。

第 2 は交叉耐性の問題である。INH, SM, P A S, KM (kanamycin) 耐性菌が 1314 Th に感受性を示すことは Rist その他の研究者⁵⁾ ¹⁶⁾~¹⁹⁾ により報告された。もつとも興味深いのは 1314 Th と Tb₁ (4-acetylaminobenzaldehyde-thiosemicarbazone) の間の関係である。Rist など¹³⁾ は Tb₁ 耐性菌は 1314 Th 感受性であるが、1314 Th 耐性菌は Tb₁ 耐性で一方的交叉耐性を示すと報告している。最近 Bartmann²⁰⁾ は in vitro ではそうであるが、人体内で Tb₁ 耐性となつた菌は 1314 Th 耐性で交叉耐性が成立すると述べている。この問題は非常に重要と思われるが、本報では in vitro 実験だけにとどめて、生体における 1314 Th 耐性と Tb₁ 耐性との関係については別報することとした。

第 3 は 1314 耐性阻止の問題である。この問題はいうまでもなく併用効果と表裏一体の関係にある。これについて Rist⁵⁾ は SM または INH 併用により 1314 Th 耐性を遅延させたと述べている。Véran など¹⁰⁾ は KM, VM (viomycin), CS (cycloserine), P A S との併用を試み、Daddi など²¹⁾ も KM との併用の臨床効果を報告している。またわが国でも KM, CS, sulfa 剤との併用²²⁾ が試みられつつある。以上はいずれも臨床面における研究段階にあるもので、いかなる薬剤が 1314 Th との併用薬剤としてもつとも有効かという点についてはまだ結論が得られていない。

本報は以上の 3 点について基礎的な面から寄与することを目的とした。

実験材料および方法

人型結核菌 H37Rv 株および青山 B 株を用いた。培地は 1% 小川培地を用いた。この理由および生菌数算定法についての詳細は文献²³⁾ ²⁴⁾ にゆずる。要するにわれわれのとつた基本的態度は耐性研究方法を生菌数算定の基礎に立つ定量化なものとすることにあることを強調したい⁴⁾。1314 Th は一たん propylenglycol に溶解したのち、適当に稀釈し滅菌前の培地に添加した。集落数は 37°C 4 週後にかぞえた。

実験成績および考察

(1) 耐性形式

(a) H37Rv 株感性菌の 1314 Th 感受性

1314 Th にふれたことのない感性菌は 8 γ/ml 耐性 (以下 8 γ 耐性とよぶ) である。原株中には 10^{-3} ~ 10^{-4} の割合で 16 γ/ml 培地に小集落を発生する菌がある。しかし、この小集落を分離して薬剤なし培地で増菌し population 構成を調べると原株と同じ構成を示すから、一見 16 γ 耐性にみえた性質は非遺伝的のものであることが分かる。一方 16 γ/ml 培地および 32 γ/ml 培地に大集落を作る菌は原株中に 10^{-8} ~ 10^{-9} の割合で見出だすことができる。これらの大集落をとつて population 構成を調べると、どの集落に由来する菌も 32 γ 耐性を示す。したがつて原株中に現われる耐性菌は 32 γ 耐性菌 1 種だけであることが分かつた。これ以上の耐性菌はみつからない。

(b) 耐性段階数と耐性上限

次に 32 γ 耐性菌の population 構成を調べると大部分の菌が 32 γ 耐性であることはもちろんであるが、約 10^{-6} の割合で 63 γ 耐性菌と 125 γ 耐性菌が見出だされる。これらの菌の population 構成を調べると両者同じであるから、一見 63 γ 耐性にみえた菌 (63 γ/ml 培地発育菌) も実は 125 γ 耐性菌であつたことが分かる。この場合も 63 γ 培地に小集落を作る菌があるが、

population 構成を調べると 32 γ 耐性で、63 γ 培地に生えたのは非遺伝的で一過性な現象であることが分かった。次に 125 γ 耐性菌からさらに上の耐性菌をとろうとして 125 γ 以上の濃度で 3 回淘汰を繰り返したが、これ以上の耐性菌を発見することはできなかった。

以上から、H37Rv 株が変異しうる 1314Th 耐性の上限は 125 γ 耐性 (感性菌の 16 倍耐性) までであり、感性菌の耐性度 (感受性) は 8 γ 耐性菌の種類は 32 γ

耐性と 125 γ 耐性の 2 種であることが分かった。すなわち耐性段階数 (または表現型数, clone の population 構成の型数) は 2 段階であることが分かった (表 1)。

これ以上の中間的な段階は存在しない。

注: 以上の研究は倍数稀釈濃度を用いたので、なお細かく調べる必要があるわけであるが、すでに行なつた INH 耐性^{25) 26)} や PAS 耐性²⁷⁾ の例を考慮して上述の結論はまず大過はないものと考えられる。

Table 1

Pattern of Resistance to 1314Th for *M. tuberculosis* var. *Hominis*, Strain H37Rv

	Phenotype (resistance level)	Mutation frequency to low resistance	Mutation frequency to high resistance
Sensitive cells	8 $\mu\text{g/ml}$	10^{-8}	$<10^{-9}$
Low resistant cells	32	/	10^{-6}
High resistant cells	125	/	/

Remark: There was no intermediate level of resistance among sensitiveness, low resistance and high resistance. Therefore, the number of phenotypes in regard to 1314Th resistance was considered to be two types. Pattern of resistance development was concluded as a "two-step" pattern, since the highest level of resistance was obtained by the second-step selection alone.

(c) 耐性獲得形式

上述の実験で最高耐性度の 125 γ 耐性菌は原株中に見出だせなかつたので、形式が SM のごとき facultative single-step pattern でないことは明らかである。また 125 γ の最高耐性菌は second-step selection で得られたので multi-step pattern (Penicillin 型) でないことも明らかである。1314Th 耐性獲得形式は最高耐性度の菌が second-step selection によつての

み得られるという "two-step pattern"^{4) 26)} であることは明らかである。この形式は今のところ、人型結核菌に特異的なものごとくで、人型結核菌の INH 耐性^{25) 26)} および PAS 耐性^{27) 28)} ではじめて記載された形式である。

(2) 交叉耐性

使用した耐性菌は multi-step (記号 m), 2nd-step (記号 s) または one-step (記号 o) selection で得られ

Table 2

Resistance of Different Resistant Strains Isolated from *M. tuberculosis* var. *Hominis*, H37Rv and Aoyama-B, to 1314Th

Strain		Resistance to 1314Th (=the highest concentration on which small inocula can grow) #
H37Rv	Sensitive	8 $\mu\text{g/ml}$
	SM-Resistant	8
	INH-Resistant	8
	PAS-Resistant	8
	Tb ₁ -Resistant	8
	Kanamycin-Resistant	8
	Viomycin-Resistant	8
Aoyama-B	Sensitive	8 $\mu\text{g/ml}$
	SM-Resistant	8
	INH-Resistant	8
	PAS-Resistant	8
	Tb ₁ -Resistant	8

Inoculum consisted of 10 to 100 viable cells per medium.

1314Th concentrations; 500, 250, 125, 62.5, 32, 8, 4, 2, 0 $\mu\text{g/ml}$.

たもので耐性度は下記のとおりである。

H37Rv株系：SM 20 γ 耐性菌 (o), INH 10 γ 耐性菌 (s), PAS 1,000 γ 耐性菌 (s), Tb₁ 100 γ 耐性菌 (s), VM 50 γ 耐性菌 (m), KM 100 γ 耐性菌 (o)。青山 B 株系：SM 10,000 γ 以上耐性菌 (m), INH 300 γ 耐性菌 (s), PAS 500 γ 耐性菌 (m), Tb₁ 50 γ 耐性菌 (o)。

これらの耐性菌の 1314 Th 耐性度はわれわれのいう actual count 法 (培地当りの接種生菌数を 20~100 (できれば 50 の近く) としたときの最高発育可能濃度²⁹⁾で測定した。その結果は表 2 のとおりで、これらの

種々の耐性菌の 1314 Th 耐性度はいずれも感性菌に等しく交叉耐性に関する内外の報告を追試確認した。

次に 1314 Th 耐性菌の他抗結核剤感受性であるが、これについてはわずかに Rist など¹³⁾の報告があるのみで、Tb₁ 感受性が低下することが知られている。上述の実験でわれわれは H₃₇Rv 株の 1314 Th 耐性度の表現型は 32 γ 耐性と 125 γ 耐性の 2 種しかないことを確かめたので、one-step selection で得た 1314 Th 32 γ 耐性株および two-step selection で得た 1314 Th 125 γ 耐性株とを用いて、同じく actual count 法で種々の抗結核剤感受性 (耐性度) を測定した。その結果は

Table 3
Resistance of 1314Th-resistant Strains Isolated from *M. tuberculosis* var. *Hominis* H37Rv to Different Antituberculous Agents

Drug	Strain	Highest concentration of drug on which small inocula can grow #		
		Sensitive	1314Th-low-resistant	1314Th-high-resistant
Streptomycin		3. $\mu\text{g/ml}$	3. $\mu\text{g/ml}$	3. $\mu\text{g/ml}$
INH		0.03	0.03	0.03
PAS		0.05	0.05	0.05
Kanamycin		10.	10.	10.
Viomycin		10.	10.	10.
Thiosemicarbazone		0.16	0.16	0.32

Inoculum sizes were 71.4, 48.0, and 86.0 viable cells per medium for sensitive, 1314Th-low-resistant and 1314Th-high-resistant strains, respectively.

表 3 のとおりで Tb₁ を除いては感受性は感性原株と変りはなかつた。ただ 1314 Th 125 γ 耐性菌では Tb₁ 耐性度が 2 倍に上昇していた (感受性が半分に低下していた)。しかし 1314 Th 32 γ 耐性菌の Tb₁ 耐性度は感性菌と変りない。なお 1314 Th 耐性菌は高、低耐性ともに catalase および peroxidase 陽性である。

すなわち、1314 Th と Tb₁ の間には Rist など¹³⁾のいうごとく (ただしどの程度か度合いは明らかでない)、1314 Th \rightarrow Tb₁ への一方向的交叉耐性があることが知られたが、その度合いは 1314 Th 耐性の 16 倍上昇に対して、Tb₁ 耐性の上昇は 2 倍にすぎなかつた。またこの一方向的交叉耐性は 1314 Th 高耐性菌のみに認められて、低耐性菌には認められないことは注意を要する。

前述のごとく、1314 Th 耐性が 2 表現型式を示し、かつ "two-step pattern" の耐性獲得形式を示すことは、1314 Th 耐性がおそらく 2 遺伝子によつて支配されていることを示唆する (文献⁴⁾ 参照)。その場合、低耐性は 1 遺伝子変異により、高耐性は 2 遺伝子変異により生じると考えられるので、Tb₁ 耐性の上昇を起こすのは、高耐性をもたらす第 2 遺伝子の作用であることが想像される。

問題は上述の交叉耐性が人体内で成立するかどうかであるが、1314 Th 投与によつて得た耐性例を検したわれわれの成績 (別報) では明らかに同じ関係が成立した。

(3) 1314 Th と他抗結核剤との併用効果

現在まで数々の抗結核剤が 1314 Th と併用されているが、これは判然とした作用上の根拠があるわけではないし、また臨床上の結論も出されるにいたっていない。したがつていかなる薬剤と 1314 Th との組合せが有用であるかを決定するのは重要かつ有意義と思われるので、試験管内における併用効果の検討を行なつてその一助とした。

しかしながら、併用効果について論ずるさいには、その定義および条件を明らかにしてかからないと無用の混乱を招くのみであることは、著者が再三指摘したことである³⁰⁾³¹⁾。昭和 35 年の日本化学療法学会における大平など³²⁾ および 河盛など³³⁾ の 1314 Th の併用効果に関する成績の不一致をみてもそれがうかがわれる (INH と 1314 Th 併用効果の成績が逆)。併用効果の実験にさいして、すでに明らかに selective な薬剤濃度を用いれば陽性併用効果 (2 剤を合したさいに単独より発育が減少する) を得ることは自明の理であつて、この

種の実験は意義は少ないものごとく思われる。さりとて単独で全く無効（生菌数および発育速度の両面から30）の濃度を用いたのでは陽性の結果も見逃がすおそれがある。そこで著者はあらかじめ行なつた予備実験か

ら、無効と微小有効の境界濃度を選んで³⁴、この濃度の薬剤を添加したときの 1314 Th 最小発育阻止濃度に及ぼす影響を観察してみた。また接種生菌数も actual count 可能な約 100 から 10^7 まで変えてみた。得られ

Table 4
Combined Effect of 1314Th with Other Antituberculous Agents
(Test organism: *M. tuberculosis* var. *Hominis* H37Rv)

Drug *	Minimum inhibitory concentration of 1314Th			
	Number of viable cells inoculated per medium			
	10^7	10^6	10^3	10^2
1314Th alone	30 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
+ SM 1 $\mu\text{g/ml}$	30	20	15	10
+ INH 0.01 $\mu\text{g/ml}$	20	20	15	10
+ PAS 0.05 $\mu\text{g/ml}$	10	10	1	1
+ Tb ₁ 0.05 $\mu\text{g/ml}$	30	20	15	10
+ KM 10 $\mu\text{g/ml}$	20	15	10	8
+ VM 10 $\mu\text{g/ml}$	15	15	8	4
+ SI 3 $\mu\text{g/ml}$	30	20	20	10
+ CS 10 $\mu\text{g/ml}$	30	30	15	10

* 1314Th concentrations; 40, 30, 20, 15, 10, 8, 4, 2, 1, 0 $\mu\text{g/ml}$.

た結果を一括すれば表 4 のごとくなる。

被検条件では、1314 Th の最小発育阻止濃度を減少させたのは、PAS, KM, VM の 3 者であつて、他の SM, INH, Tb₁, CS, sulfa 剤はほとんど影響がなかつた。また拮抗現象は見出だせなかつた。

以上のごとく拮抗現象がみられなかつたことは——併用薬剤の濃度が一濃度だけであるためなお検討の余地を残しているが³¹——1314 Th といずれの既知抗結核剤との併用も有効であることを示している。なかんずく、陽性結果を得た PAS, KM, VM の 3 者は 1314 Th の併用薬剤として望ましいものであることが示唆される。この結果の意味は、これら 3 剤がぎりぎりの境界濃度（微量）で、かつなお 1314 Th と併存して菌の発育を遅延または阻止させることを示すものと思われ、ひいてはまた 1314 Th 耐性阻止にも比較的有效であることが考えうる。

結 論

(1) 人型結核菌 (H₃₇Rv) の 1314 Th 耐性形式は、耐性段階数 2 段階（感性菌の耐性度 8 γ のほかに低耐性菌の 32 γ 耐性と高耐性菌の 125 γ 耐性の 2 種）換言すれば 2 表現型形式であり、耐性上限は 16 倍である。耐性獲得形式は two-step pattern で INH 耐性または PAS 耐性と同型である。

(2) 1314 Th と SM, PAS, INH, KM, VM との間には交叉耐性は存在しない (H₃₇Rv 株および青山

B 株)。Tb₁ との間には、1314 Th \rightarrow Tb₁ の方向の一方向的交叉耐性がある。ただしこれは 1314 Th 高耐性菌 (125 γ 耐性菌) のみに認められる現象で、1314 Th 耐性度 16 倍の増加に対して Tb₁ 耐性度の増加は 2 倍である。1314 Th 低耐性菌 (32 γ 耐性菌) の Tb₁ 耐性度は不変である。

(3) 1314 Th は SM, INH, PAS, Tb₁, KM, VM, CS, sulfa 剤といずれとも拮抗しない。したがつていずれの薬剤とも併用可能である。

勝沼荘長ならびに日比野教授の御校閲と研究室の水野、外山、村瀬、岡田、水野の諸氏の御協力を感謝する。

文 献

- 1) Demerec, M.: *J. Bact.*, 56: 63, 1948.
- 2) Hsie, J. & Bryson, V.: *Am. Rev. Tuberc.*, 62: 286, 1950.
- 3) Bryson, V. & Szybalski, W.: *Adv. in Genet.*, 7: 1, 1955.
- 4) 東村道雄: 結核病学会総会特別講演集, 昭36.
- 5) Rist, N.: *Bull. Union Internat. cont. Tuberc.*, 28: 220, 1958.
- 6) Brouet, G.: *ibid.*, 28: 228, 1958.
- 7) 東村道雄・安保孝: 結核, 36: 361, 昭36
- 8) Daddi, G. et al.: *Giorn. ital. Tuberc.*, 12: 1,

- 1958.
- 9) Brouet, G. et al., *Am. Rev. Tuberc.*, 79 : 6, 1959.
 - 10) Véran, P. et al. : *Presse Med.*, 68 : 1597, 1959.
 - 11) Somner, A. R. et al. : *Brit. Med. J.*, 5120 : 486, 1959.
 - 12) Nitti, V. et al. : *Arch. Tisiol.*, 15 : 971, 1960.
 - 13) Rist, N. et al. : *Presse Med.*, 67 : 625, 1959.
 - 14) Lucchesi, et al. : *Ann. Ist. Forlanini*, 19 : 451, 1959.
 - 15) Steenken, W., Jr. & Montalbino, V. : *Am. Rev. Tuberc.*, 81 : 761, 1960.
 - 16) Nitti, V. : *Arch. Tisiol.*, 14 : 819, 1959.
 - 17) 戸田忠雄 他 : 日結, 18 : 862, 昭34.
 - 18) 戸田忠雄 他 : 日胸, 19 : 590, 昭35.
 - 19) 北本治 他 : 日胸, 19 : 785, 昭35.
 - 20) Bartmann, K. : *Tuberk. arzt*, 14 : 525, 1960.
 - 21) Daddi, G. et al. : *Giorn. ital. Tuberc.*, 13 : 267, 1959.
 - 22) 堂野前維摩郷 他 : 日本医事新報, 1897 : 9, 昭35.
 - 23) 東村道雄 : 衛生検査, 9 : 134, 昭35.
 - 24) 東村道雄・野田用 : 結核, 32 : 639, 昭32.
 - 25) Tsukamura, M. et al. : *Jap. J. Microb.*, 3 : 113, 1959.
 - 26) 東村道雄 : 医学と生物学, 55 : 165, 昭35.
 - 27) Tsukamura, M. : *J. gen. Microbiol.*, 23 : 203, 1960.
 - 28) Tsukamura, M. et al. : *Ann. Rep. Jap. Soc. Tuberc.*, 5 : 135, 1960.
 - 29) 東村道雄 他 : 結核, 34 : 625, 昭34.
 - 30) 東村道雄 : 日結, 18 : 170, 昭34.
 - 31) 東村道雄 : 日胸, 19 : 342, 昭35.
 - 32) 大平一郎 他 : 化学療法学会演説, 昭35.
 - 33) 河盛勇造 他 : 同上
 - 34) Tsukamura, M. & Noda, Y. : *Am. Rev. Tuberc.*, 78 : 121, 1958.

Studies on the Resistance of Tubercle Bacilli to Alpha-ethylthioisonicotinamide (1314Th). Pattern of resistance, cross resistance and combined effect. Michio TSUKAMURA (The Obuso National Sanatorium, near Nagoya.)

INTRODUCTION

Resistance of tubercle bacilli to alpha-ethylthioisonicotinamide (1314Th) was studied with special reference to the pattern of resistance, cross resistance problem and combined effect with other antituberculous drugs.

METHODS

M. tuberculosis var. *hominis*, H₃₇Rv and Aoyama-B, were used. Numbers of viable cells were calculated on Ogawa's egg medium after 4 weeks of incubation. Drug resistance levels were determined as the highest concentration of drug, on which small inocula consisting of 10 to 100 viable cells, if possible, of a number near 50. For this purpose, inoculation was always made utilizing different dilutions of cell suspension.

CONCLUSIONS

1) Pattern of resistance.

The H₃₇Rv strain developed two types of resist-

ant mutants, one resistant to 32 $\mu\text{g/ml}$ and another resistant to 125 $\mu\text{g/ml}$, whereas sensitive cells not exposed to the drug previously were resistant to 8 $\mu\text{g/ml}$. The upper limit of resistance was 125 $\mu\text{g/ml}$ and any mutant showing higher resistance level could not be isolated after successive selection. It was shown thus that this organism develops two phenotypes of resistance and the pattern of resistance development is a "two-step pattern" like the pattern of resistance development to isoniazid and PAS.

2) There was no cross resistance relationship between 1314Th and any of the following known antituberculous agents; streptomycin, isoniazid, PAS, kanamycin, viomycin, excepting thiosemicarbazone.

There was a "one-way" partial cross resistance between 1314Th and thiosemicarbazone. However, this was observed only in regard to high resistance type to 1314Th (mutants resistant to 125 $\mu\text{g/ml}$). Such a one-way cross resistance could not be found in regard to low resistance type to 1314Th (mutants resistant to 32 $\mu\text{g/ml}$). Mutants 16-fold more resistant to 1314Th were 2-fold more resistant to thiosemicarbazone and not vice versa.

3) Experiments on the combined effect of