

人型結核菌の交叉耐性に関する研究 第2報

東村道雄・山本昌邦・林光男
鳥居太・野田用

国立療養所大府荘

受付 昭和36年1月17日

梅沢などによつて発見された kanamycin (KM) の登場は人型結核菌の交叉耐性について興味ある現象をもたらした。柳沢・佐藤¹⁾ は人型結核菌の SM 耐性菌および PAS 耐性菌が KM に対して感受性であると報告し、Curci e Guidi²⁾, Daddi et al.³⁾ も同様の所見を認めている。

注目すべき所見は VM, KM, SM 間の一方向的交叉耐性の問題で、Steenken et al.⁴⁾ および東村など⁵⁾ ~⁹⁾ によつて報告された。Steenken などは H₃₇Rv 株で KM 耐性菌が neomycin (NM) 耐性菌と完全交叉耐性を示すこと、および viomycin (VM) 耐性菌が KM 耐性であるが、逆に KM 耐性菌は VM 感性であることを見出した。これを略記すれば次のごとくなる。矢印は一方向的交叉耐性を示す。VM→KM⇌NM。(ただし柳沢¹⁰⁾ はその後 NM と同じ物質である fradiomycin と KM との間の関係として一方向的交叉耐性に近い成績を報告した。) 一方、東村などは人型結核菌 H₃₇Rv 株および青山 B 株で KM 耐性菌は SM に 2~3 倍耐性(感性菌と比較して)であるが、逆は成立しないことおよび VM 耐性菌は KM に 2 倍耐性であることを報告した。この関係を示せば次のごとくなる。VM→KM→SM。この KM, SM 間の一方向的部分交叉耐性の存在は、その後戸田など¹¹⁾ によつて確かめられた。またこの VM→KM→SM の関係は、以前に Szybalski & Bryson¹²⁾ が M. ranae で認めた VM→NM→SM の一方向的交叉耐性(one-way cross-resistance の語は彼らにより作られたものらしい) の関係中、NM を KM でおき変えたものであつた。

われわれは交叉耐性の問題は狭義には従来どおり、個々の菌の耐性度ないし薬剤感受性に関するものと考えながら、広義には耐性菌突然変異頻度の増加も一種の交叉耐性(部分的)と考えるので⁵⁾、このような見地からその後観察した人型結核菌の VM, KM, SM 間の交叉耐性に関する成績をここに報告する。

実験材料および方法

(1) 被検株：主として人型結核菌青山 B 株を用いた

が、H₃₇Rv 株も併用した。

(2) 培地：中試験管に 8 ml 分注の 1% 小川培地を用いた。薬剤はすべて滅菌前に培地に添加し、添加量をそのまま表示した。(とくに SM 量の表示を添加量のままとしたのは、KM 量を添加量のままとしたので比較のためである。)

(3) 薬剤感受性(耐性度)の測定：感受性(耐性度)は 10~100 生菌数の接種量菌を用いたときに菌が発育しうる最高濃度で表示した。これは耐性度が接種生菌数の多少によつて動揺することを除外するためである¹³⁾。薬剤培地の系列はまず大コルベン中に作つて、これを各試験管に分注した。したがつて種々の株の検定には厳密に同一濃度となるようにした。菌液は 6 週培養菌をガラス玉と振盪均一化して作り、これを 10 倍単位でうすめて稀釈菌液を作つた。各菌液から渦巻白金耳で 0.02 ml ずつ接種し、37°C 4 週培養後に発育を観察した。対照培地に 10~100 集落を示す系列で、集落を認める最高濃度を耐性度とした。

(4) 耐性菌突然変異頻度：被検薬剤にふれたことのない株に含まれる耐性菌の総生菌数に対する比率で示した。生菌数の算定は培地 10 本の平均値で出した。測定方法は既報した¹⁴⁾。

(5) 耐性株：青山 B 株の耐性株は一般に感性株から multistep selection で得たものを用いた。KM 耐性株のみは KM 100 γ の one-step selection によつて得たものを用いた。これらの耐性度は表 1 に示されている。H₃₇Rv 株の SM 高耐性株は SM 200 γ, SM 低耐性株は SM 20 γ の one-step selection で得た。KM 高耐性株, KM 低耐性株, VM 耐性株はそれぞれ KM 1,000 γ, KM 100 γ, VM 50 γ の one-step selection で分離した。これらの株は薬剤なし培地に 3 代以上継代して安定であることを確かめた。

実験成績

A 剤耐性菌が B 剤に対して耐性を示し(感性菌と比較して)、B 剤耐性菌が A 剤に対して耐性を示す場合を、A と B との間に交叉耐性(完全または部分的)があるといい、A⇌B と記す。

一方、A 剤耐性菌が B 剤に耐性を示すが、逆は成立せず B 剤耐性菌が A 剤感性にとどまるときは、A と B との間(一方向的交叉耐性(完全または部分的))があるといい、A→B と記す。

人型結核菌ならびに抗酸菌の場合は、サルファ剤相互の間および前記の KM⇌NM 以外には完全交叉耐性は存しないので、以下に述べるのはすべて部分的交叉耐性に属する。

交叉耐性なる語は元来個々の菌の耐性度ないし薬剤感受性の変化に対して使用される。しかし化学療法立場からみると、A 剤耐性菌の B 剤耐性菌突然変異頻度が増加している場合は、B 剤使用により速やかに B 剤耐性菌集団が出現すると考えられるので、この場合も一種の交叉耐性と考えるのが便利である。本報では、この見地から、(1) 耐性度の面および (2) 耐性菌突然変異頻度の面の両方から交叉耐性の問題を観察することにした。

I. 耐性度(感受性)からみた交叉耐性

成績は表 1(青山 B 株)および表 3(H₃₇Rv 株)に一括した。耐性度に関する交叉耐性のうち、PAS および tibione に関するものは第 1 報¹⁵⁾に記したので省略する。ただし第 1 報と本報の表 1 の数値が少し違うのは、第 1 報が 6 週判定であるのに対して、本報は 4 週判定で成績を示したためである。本報の結果でも PAS 高耐性菌が tibione に耐性を増していることがわかる。

表 1 に示すとおり、INH に関しては交叉耐性は完全、部分、一方向的を通じて全く存在しない。

表 1 人型結核菌青山 B 株の各種耐性菌の抗結核剤感受性

菌 株	耐 性 度 (γ/ml)					
	SM	KM	VM	INH	PAS	TB
SS	6~8	12.5	10	0.02	0.05	0.3
SM R	10,000	12.5	10	0.02	0.02	0.3
KM R	10~20	100	10	0.02	0.05	0.3
VM R	6~8	25	100	0.02	0.05	0.3
INH R	6~8	12.5	10	300.	0.05	0.3
PAS R	4	12.5	10	0.02	500.	1.0
TB R	6~8	12.5	10	0.02	0.05	100.

SS: 感性株 R: 耐性株
SM: dihydrostreptomycin KM: kanamycin VM: viomycin
TB: thiosemicarbazone

もつとも注目すべきものは VM, KM, SM 間の関係である。表 1 に示すように青山 B 株の VM 耐性菌は KM に 2 倍耐性であるが、KM 耐性菌は VM 感性で、ここに VM→KM の一方向的部分交叉耐性が存在する。

また KM 耐性菌は SM に対して 2 倍耐性である

が、逆に SM 耐性菌は KM 感性である。したがってここにも KM→SM の一方向的部分交叉耐性がある。VM と SM 間には全く交叉耐性はない。以上を総括して次の関係が成立する。VM→KM→SM。

しかし H₃₇Rv 株では VM→KM の一方向的交叉耐性はあまり判然とせず、この点 Steenken など⁴⁾のいう VM と KM との間の関係は明らかでなかつた(表 3)。しかし、KM と SM 間の一方向的交叉耐性は判然と認められ、著者たち⁵⁾が前に報告した結果が確認された。すなわち H₃₇Rv 株でも KM 耐性株は 3 倍以上 SM に耐性であつた。なお KM 耐性度と SM 耐性度の関係は、KM 高耐性菌だからといって SM 耐性度が増すわけではなく、かえつて KM 中間耐性菌のほうが若干 SM 耐性度が高い傾向がみられたことは注目される。(表 3)

前述のようにわれわれの実験では VM→KM の関係は青山 B 株では判然と認められたが、H₃₇Rv 株では判然としなかつた。しかしこれは Steenken など⁴⁾とわれわれの使用した H₃₇Rv VM 耐性株の耐性度に関係があるかもしれない。Steenken などの使用した VM 耐性株は 1,000 γ 耐性株であるが、われわれの使用したのは 50 γ 耐性株である。しかしわれわれの実験では種々の条件で VM 選択を繰り返したが、VM 100 γ 以上の耐性株を得ることはできなかつた。

II. 耐性菌変異頻度

青山 B 株では、表 2 に示すように、VM 耐性菌における KM 耐性菌変異頻度は感性菌の 1,000 倍以上に上昇しており、また KM 耐性菌における SM 耐性菌変異頻度も 1,000 倍に上昇していた。興味あることに、これらの SM 耐性菌変異頻度の上昇は、SM 中間耐性菌出現率のみ上昇し、SM 高耐性菌出現率は上昇していないことである。以上の結果は全く感受性ないし耐性度に関する成績と並行するものであつた。遺伝学的な考察をすれば、KM 耐性に関与する因子(高低とも)は SM 中間耐性に関与する因子の変異または酵素系に影響を与えるが、SM 高耐性に関する因子には全く影響しないと考えられるわけである。

青山 B 株については表 2 に示すとおり、突然変異頻度についても広義の VM→KM→SM の関係が成立するが、これ以外には広義交叉耐性の関係は認められない。

H₃₇Rv 株でも KM 耐性菌における SM 耐性菌頻度は 100~1,000 倍に高まつている。しかも、この場に

表2 人型結核菌青山B株の種々の耐性菌におけるSM耐性, KM耐性およびVM耐性突然変異頻度

菌株	SM 40 γ 耐性菌出現率			SM 2,000 γ 耐性菌出現率		
	培地当り接種生菌数	培地当り耐性菌数	耐性菌数: 総生菌数	培地当り接種生菌数	培地当り耐性菌数	耐性菌数: 総生菌数
SS	21.4×10^6	7.3	$3.4/10^7$	158.2×10^6	0.7	$4.4/10^9$
SM R	/	/	/	/	/	/
KM R	45.7×10^3	15.5	$3.4/10^4$	45.7×10^6	0.1	$2.2/10^9$
VM R	75.8×10^5	7.5	$9.9/10^7$	85.6×10^6	0.2	$2.3/10^9$
INH R	40.0×10^6	19.0	$4.8/10^7$			
PAS R	35.6×10^6	16.8	$4.7/10^7$			
TB R	18.5×10^6	15.0	$8.1/10^7$			

菌株	KM 100 γ 耐性菌出現率			VM 100 γ 耐性菌出現率		
	培地当り接種生菌数	培地当り耐性菌数	耐性菌数: 総生菌数	培地当り接種生菌数	培地当り耐性菌数	耐性菌数: 総生菌数
SS	68.8×10^6	34.6	$5.0/10^7$	45.1×10^6	8.0	$1.8/10^7$
SM R	16.3×10^6	13.2	$8.1/10^7$	44.9×10^6	18.4	$4.1/10^7$
KM R	/	/	/	45.7×10^5	1.8	$3.9/10^7$
VM R	20.1×10^2	4.5	$2.2/10^3$	/	/	/
INH R	155.3×10^6	23.1	$1.5/10^7$	55.5×10^6	24.6	$4.4/10^7$
PAS R	112.7×10^6	11.0	$9.8/10^8$	102.8×10^6	17.2	$1.7/10^7$
TB R	40.6×10^6	57.6	$1.4/10^6$	105.0×10^6	35.0	$3.3/10^7$

表1参照。 * 数値は培地10本の平均値。本表のみ6週判定。

もKM低耐性菌における頻度のほうがKM高耐性菌よりもかえって高い(表3)。一方VM耐性菌におけるKM耐性菌変異頻度およびSM耐性菌変異頻度は不変であり、またSM耐性菌におけるKMまたはV

M耐性菌変異頻度も不変である。以上から、耐性菌変異頻度に関する広義交叉耐性についてもH₃₇Rv株ではKM→SMの関係が成立した。

表3 人型結核菌H₃₇Rv株のSM, KM, VMに関する一方向的交叉耐性

菌株	SM耐性度	SM 40 γ R出現率	SM 200 γ R出現率	KM耐性度	KM 100 γ R出現率	VM耐性度	VM 50 γ R出現率
SS	4	$3.5/10^6$	$7.6/10^9$	20	$1.3/10^7$	10	$2.3/10^7$
SM R (h)	10,000			10	$3.7/10^8$	10	$3.7/10^8$
SM R (i)	40			20	$2.3/10^7$	10	$9.6/10^7$
KM R (h)	14	$2.1/10^4$		1,000		10	$2.7/10^8$
KM R (i)	20	$8.4/10^3$	$1.1/10^7$	100		10	$1.5/10^7$
VM R	6	$2.3/10^6$	$1.4/10^7$	20	$1.1/10^7$	70	

(h): 高耐性菌 (i): 中間耐性菌 耐性度は γ/ml 1。

考 察

以上の結果は、耐性度についてもまた耐性菌変異頻度についても、青山B株では、VM→KM→SMの関係が成立し、H₃₇Rv株ではKM→SMの関係が成立することを示した。

以上の結果から考えると、KM耐性菌の存在下でSMを使用すると速やかにSM耐性菌が生じることを示している。しかもKM-SM2重耐性結核菌は安定

であるから¹⁶⁾、KM先行SM後行の化学療法の使用順序は不利であることが想像される。逆にSM耐性菌ではKM耐性度は感性菌と同じであるし、KM耐性菌出現率も増加していないから、SM先行KM後行の化学療法使用順序は適当ということになる。

柳沢など¹⁷⁾は動物実験でKM耐性菌を感染させたモルモットにSMが有効であったと主張している。しかしその実験ではKM耐性菌感染に対する同条件の対照がないから、はたしてKM耐性菌に対するSM治

療が感性菌に対すると同様に有効であつたかどうかは明らかでない。また次のような可能性も考える。動物実験では空洞形成がないので耐性菌出現も少なく、化学療法における耐性菌の役割が空洞結核である人体ほど重要でないことも十分考えることである。もちろん *in vitro* 実験における部分的交叉耐性が人間の化学療法にただちに適用できるかどうかは問題で、最終的結論は人体における観察をまつよりほかはない。しかし現状では、基礎実験の結果から明らかに不利と思われる KM 先行 SM 後行の化学療法方式を採用するのは適当ではなく、やはり SM 先行 KM 後行の治療方式をとるのが妥当な態度であると思われる。以上を総合して化学療法施行の順序は一方向的交叉耐性の順列の逆をとつて、SM→KM→VM の順序に使用するのが妥当と思われる。

結 論

1) 人型結核菌 H₃₇Rv 株および青山 B 株では、KM 耐性菌の SM 耐性は 2～3 倍増加しており、また KM 耐性菌における SM 耐性菌変異頻度も 100 倍以上増加している。しかし、この逆の関係は成立しない。

以上の (KM 耐性→SM 耐性) の一方向的部分交叉耐性は KM 耐性には関係がない。また SM 中間耐性菌出現率は KM 耐性獲得によつて上昇するが、SM 高耐性菌出現率は影響を受けない。

2) 人型結核菌青山 B 株では、VM 耐性菌の KM 耐性は 2 倍に上昇し、VM 耐性獲得により KM 耐性菌変異頻度が約 1,000 倍に上昇したが、H₃₇Rv 株ではこの関係は明らかでなかつた。以上の逆の関係は存在しない。

3) I NH に関する交叉耐性関係は存在しない。

4) 以上の結果から、VM 耐性→KM 耐性→SM 耐性の一方向的部分交叉耐性が存在することが知られるので、化学療法の使用順序は上の逆の順序、すなわち、SM→KM→VM の順序に使用するのが適当である。

勝沼六郎荘長ならびに日比野進教授の御校閲に感謝の意を表す。

本報の一部は昭和 33 年 10 月、厚生省国立病院療養所総合医学会の「重症結核シンポジウム」(東村)で、大要は昭和 34 年 5 月、日本化学療法学会総会で報告した。

文 献

- 1) Yanagisawa, K. & Sato, N. : J. Antibiotics, A, 10 : 233, 1957.
- 2) Curci, G. e Guidi, V. : Arch. Tisiol., 8 : 533, 1958.
- 3) Daddi, G., Corda, M., Grassi, C. e Leidi, F. : Giorn. ital. Tuberc., 12 : 3, 1958.
- 4) Steenken, W. Jr., Montalbaine, U. & Thurston, J. R. : Am. Rev. Tuberc., 79 : 66, 1959.
- 5) 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.
- 6) Torii, F., Yamamoto, M., Hayashi, M., Noda, Y. & Tsukamura, M. : J. Antibiotics, A, 12 : 103, 1959.
- 7) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M., Hayashi, M. & Torii, F. : J. Antibiotics, A, 12 : 314, 1959.
- 8) Tsukamura, M., Noda, Y. & Yamamoto, M. : J. Antibiotics, A, 12 : 323, 1959.
- 9) Tsukamura, M. : J. Antibiotics, A, 12 : 189, 1959.
- 10) 柳沢謙 : 日本結核病学会シンポジウム, 昭 34.
- 11) 戸田忠雄・久垣和仁・荻原義郷・渡辺京子 : 日結 : 19 : 590, 昭 35.
- 12) Szybalski, W. & Bryson, V. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 267, 1954.
- 13) 東村道雄・河西榮文 : Chemotherapy, 4 : 227, 1956.
- 14) 東村道雄・野田用 : 結核, 32 : 639, 昭 32.
- 15) 東村道雄 : Chemotherapy, 8 : 354, 1960.
- 16) 東村道雄 : 日細, 15 : 531, 昭 35.
- 17) Yanagisawa, K., Kanai, K., Sato, N., Hashimoto, T. & Takahashi, H. : Ann. New York Acad. Sci., 76 : 88-102, 1958.