

結核菌の α -ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th)

耐性に関する臨床的研究

とくに直接法による耐性検査ならびに耐性発現様式について

東村道雄・安保孝

国立療養所大府荘

受付 昭和 36 年 4 月 25 日

α -ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th) が有力な抗結核剤であることは Rist ならびにその協力者ら^{1)~7)}により報告された。その後彼らの得た所見はイタリア, 米国, 日本(戸田ら, 堂野前ら, 北本ら)における多くの追試により確認されつつある。1314 Th は副作用の点で若干の欠点を有するが, SM, PAS, INH 3 剤耐性菌が増加しつつある現在, kanamycin (KM) とともに結核化学療法上重要な位置を占めることは疑いない。

1314 Th 耐性菌が治療開始後比較的速やかに出現することは, Daddi ら⁴⁾, Brouet ら⁵⁾, Véran ら⁷⁾, Somner ら⁸⁾, Nitti ら⁹⁾によつて報告されており, 菌陰転不能患者における耐性発現の時期は治療開始後おおよそ 1~4 カ月といわれる。なおわが国ではまだ 1314 Th の耐性出現に関する報告がない。

結核菌の 1314 Th 耐性についての従来^{1)~9)}の報告を要約すれば次の 3 点となる。

(1) 耐性発現の時期が比較的早く, 治療開始後 1~4 カ月である。これは *in vitro* 実験の結果からも推定される¹⁰⁾¹¹⁾。

(2) 比較的少数ではあるが primary resistance (未治療耐性) を示す菌株が患者から分離される。Rist¹⁾ は 1314 Th 未使用の 172 株中 4 株の耐性株を認め, Brouet²⁾ は 83 株中 3 株の耐性株を認めている。この所見は今までの抗結核剤に経験されなかつた特異の所見である。

(3) 今までのところ, 1314 Th 耐性検査は Dubosalbumin 培地または Youmans 培地を用いる間接法で行なわれている。

われわれがここに 1314 Th 耐性をとりあげた理由は, 第一に直接法で耐性検査を行なう方法を決定することであり, 第二には上述の 1314 Th 耐性に関する特異な所見の追試検討にある。われわれは前に KM 耐性検査に使用した“actual count 法”を使用することにより, 小川培地で十分信頼するにたる直接法耐性検査を行ない

えたのでここに報告する。

研究材料ならびに方法

(1) 1314 Th 耐性検査法

(a) actual count 法^{12)~15)}: 1 日痰を集め, これに等量の 5% KOH を加えて 20 分パンピングを行なつて均等化し, 生理食塩水で 100 倍および 1,000 倍稀釈液を作る。これらの原液 および 100 倍, 1,000 倍液から渦巻白金耳で 0.02 ml ずつ 1% 小川培地 (1314 Th 濃度; 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1314 Th は propylenglycol で 5 mg/ml 液を作つて適宜稀釈して滅菌前の培地に加える) に接種し, ただちにゴム栓を施して 37°C 6 週間培養し, 集落数を算定した。結局この検査で全日痰の“population 構成”を知りうるわけであるが, population 構成を % で表現することは複雑であるし, またこの % は測定誤差が大きく (P = 30% でも誤差約 50%¹⁶⁾) 意義が少ないと思われるので, われわれのいわゆる actual count 法で耐性度を表現した。すなわち対照培地の集落数が 50 にもつとも近い系列で集落形成可能の最高濃度でもつて耐性度を表示した。方法は KM 耐性検査法と同じで文献 15 に詳述した。

同時に SM 0, 10, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$, PAS 0, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$, INH 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の系列でも耐性度を actual count 法で測定した (成績省略)。

この actual count 法検査を行なつたのは, 1314 Th 使用群 12 名, 未治療対照群 7 名の計 19 名である。検査は毎月 1 回, 5 カ月間実施した。

(b) routine 法: 略痰に等量の 5% KOH を加えて均等化し, 0.02 ml を渦巻白金耳で同濃度 1314 Th を含む 1% 小川培地に接種し, 6 週培養後に判定した。このわれわれの routine 法は 5% KOH, 渦巻白金耳接種, 1% 小川培地を用いる点で一般に使用される方法と異なるが成績そのものは大差がない (文献

12, 13 および未発表成績)。

検査施行患者数は 1314 Th 未使用者 61 名である。

1314 Th 投与患者ならびに对照患者の耐性度は上述 actual count 法の原液接種によつた。

(2) 1314 Th 投与法

1314 Th 投与患者 12 名ならびに对照患者 (1314 Th

以外の抗結核剤投与) 7 名はいずれも過去に SM-PAS - INH 3 者併用療法を少なくとも 12 カ月以上施行して菌陰転をきたさない入院患者である。いずれも慢性空洞性結核に属し、大部分は数年以上の化学療法の既往がある。また治療前に actual count 法で SM, PAS, INH の 3 者に耐性を示していた (例外 1

表 1 1314 Th 投与開始直前の排菌状態および耐性
(Number of viable bacilli excreted per day and drug resistance before treatment)

症 例	1 日排出生菌数	耐 性 度 (actual count 法)		
		SM	PAS	INH
1. ■■■■	2.22×10^6	1,000 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
2. ■■■■	2.94×10^4	1,000	10	1
3. ■■■■	4.30×10^8	1,000	1	10
4. ■■■■	1.61×10^8	1,000	1	0.1
5. ■■■■	1.20×10^6	10	1	0.1
6. ■■■■	3.44×10^7	1,000	10	0.1
7. ■■■■	1.96×10^8	10	1	1
8. ■■■■	1.50×10^5	1,000	10	1
9. ■■■■	2.20×10^6	<10	10	10
10. ■■■■	5.60×10^5	1,000	1	0.1
11. ■■■■	1.80×10^8	1,000	1	0.1
12. ■■■■	1.50×10^7	1,000	1	0.1
13. ■■■■	3.96×10^7	10	100	1
14. ■■■■	1.36×10^7	1,000	1	0.1
15. ■■■■	1.20×10^7	1,000	1	0.1
16. ■■■■	9.30×10^7	1,000	1	1
17. ■■■■	9.10×10^7	10	1	0.1
18. ■■■■	3.72×10^7	100	100	1
19. ■■■■	4.60×10^7	10	1	0.1

例)。表 1 にこれら患者の耐性度ならびに 1 日排菌数 (生菌単位数) を示す (測定は投与開始前 3 日以内に行なつた)。

1314 Th 投与法は 1 日量 0.5 g で十分有効であるとの最近の発表¹⁷⁾を参照して、原則として 1 日 0.5 g (0.25 g ずつ朝夕 2 回) 毎日投与した。耐性薬剤 (SM, PAS, INH) は中断することなく, 1314 Th 投与群にも对照群にも投与を続けた。1314 Th の投与期間は 4 カ月である。

成績ならびに考察

(1) 1314 Th 未使用者の 1314 Th 耐性度 — primary resistance の問題

routine 法による耐性検査成績を表 2 として掲げた。完全耐性度をとれば大部分の未使用者 喀痰中結核菌の 1314 Th 耐性度は 5 $\mu\text{g/ml}$ までに入る。しかし 4 例 (6.6%) は 30 $\mu\text{g/ml}$ 耐性度を示した。不完全耐性度

をとると耐性度の分布は 5 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ の広い範囲に分布する。個人差は抗結核剤中もつとも大きいように思われた。

actual count 法によつても未治療耐性は表 3 のごとく 5 ~ 30 $\mu\text{g/ml}$ の広い分布を示す。このように広い分布を示すのは 1314 Th に特異的であると思われる。KM の例でもわれわれの actual count 法のごとく接種生菌数を control すれば未治療の耐性度分布はおおよそ 1:2 の範囲に入るが, 1314 Th では変動は 1:6 以上である。ただし大多数の耐性度は 10 $\mu\text{g/ml}$ までであるから, 30 $\mu\text{g/ml}$ 耐性のごときはいわゆる primary resistance (未治療耐性, 厳密に言えば「未治療耐性度が比較的高い例」とみなされよう。後述するごとく actual count 法による 1314 Th の臨床的耐性の境界は 30 $\mu\text{g/ml}$ 付近と思われるから, 30 $\mu\text{g/ml}$ を「未治療耐性」とする定義は大体当たつていると思われる。このように未治療耐性の存在することは Rist¹⁾ および

Brouet²⁾の間接法による成績とよく一致する。

表2 1314 Th 未使用患者の 1314 Th 耐性度 (routine 法)
(Degree of 1314 Th resistance in tuberculous patients previously not exposed to 1314 Th (routine method))

耐性度 resistance level	完全耐性 complete resistance	不完全耐性 partial resistance
<5 µg/ml	41	5
5	11	12
10	4	14
20	1	15
30	4	9
50	0	2
100	0 計 61 例	4 計 61 例

control が countable のときは control の集落数の 25% 以上を完全耐性とみなした。

(2) 1314 Th の治療成績

1314 Th の治療成績についてはすでに仏、伊の報告をはじめとして多数の内外の追試があるので表 3, 4 に

一括するにとどめる。これらは SM, PAS, INH, sulfa 剤による治療によつて菌陰転に失敗した例であるから、12 例中 3 例の菌陰転をみたことはかなりよい成績と思われる。副作用は食欲不振、悪心、嘔吐であつた。4 カ月投与を継続したのは 11 例、1 カ月投与したのは 1 例で、7 例は 3 日以内に服薬不能となつた。悪心は胃そのものの障害によるよりは、1314 Th の臭気が呼気に排泄されるものごとくであつた。

(3) 1314 Th 耐性検査成績と臨床効果との関係

まず routine 法で未治療の対照患者の耐性度を追求してみると同一人でも相当の動揺がある。1314 Th 投与群では投与月数が進むにつれて大体上昇の傾向はあるが

動揺がはなはだしい。したがつて臨床上的おおよその参考程度ならば routine 法でも用いられるが研究的観察の資料となりうとは思われない(成績省略)。

表3 1314 Th 使用時の耐性出現 (actual count 法による)

(Emergence of 1314 Th resistance in patients treated with 1314 Th when observed through "actual count method" of the resistance test)

症 例	1314 Th 耐性度 1314 Th resistance (actual count method)					
	治 療 前 before treat.	1314 Th 投与期間 (月数)				
		1 M.	2 M.	3 M.	4 M.	
1314 Th 投与群 (0.5 g daily)	1. ■■■■	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
	2. ■■■■	<5	5	5	20	20
	3. ■■■■	5	20	20	30	30
	4. ■■■■	5	10	5	5	30
	5. ■■■■	<5	5	5	30	50
	6. ■■■■	10	30	50	50	50
	7. ■■■■	10	5	50	50	100
	8. ■■■■	30	30	30	100	100
	9. ■■■■	5	10	(-)	(-)	(-)
	10. ■■■■	5	(-)	(-)	(-)	(-)
	11. ■■■■	5	(-)	(-)	(-)	(-)
	12. ■■■■*	20	20	20	20	20
未治療群 control	13. ■■■■	10	10	20	20	10
	14. ■■■■	30	fatal			
	15. ■■■■	5	5	5	5	5
	16. ■■■■	10	10	10	10	20
	17. ■■■■	5	10	5	5	5
	18. ■■■■	10	10		5	10
	19. ■■■■	10	10			

* 1314 Th 投与 1 カ月で中止。(-) は菌陰転を示す。

表 4

	症 例	1314 Th との 併 用 薬 剤	レントゲン所見の変化 [#]	赤 沈	自 覚 症 状	
1314 Th 4 カ月 治 療 群	1. ■■■	SM・INH _G	CB ₃ Kz→CB ₃ Kz	空洞 縮小	好転	不変
	2. ■■■	SM・INH _G ・ PAS	F → F	不変	不変	咳・痰減少
	3. ■■■	SM・PAS・INH	CB ₃ Kz→CB ₃ Kz	不変	好転	咳・痰減少
	4. ■■■	SI・INH	B ₃ Ky ₃ →B ₃ Ky ₃	不変	不変	体重増加
	5. ■■■	SI・INH _G ・PAS	B ₃ KcKb ₁ →B ₃ Kc	空洞 縮小	不変	不変
	6. ■■■	SM・PAS・INH	CB ₃ Kz→CB ₃ Kz	不変	不変	不変
	7. ■■■	SM・PAS・INH	CB ₂ Kz→CB ₂ Kz	不変	不変	不変
	8. ■■■	SM・PAS・INH	CB ₃ Kx ₃ Kz→CB ₃ Kx ₃ Kz	不変	不変	不変
	9. ■■■	SI・INH _G	CB ₃ Ky ₃ →CB ₃ Ky ₃	空洞 縮小	好転	平熱化, 咳・痰減少
	10. ■■■	SM・PAS・INH	CB ₂ Ky ₂ →CB ₂	空洞 消失	好転	咳・痰減少
	11. ■■■	INH _G ・PAS	C ₃ Kz→C ₃ Kz	不変	好転	咳・痰減少
	12. ■■■*	SM・PAS・INH	CB ₂ Kz→CB ₂ Kz	不変	不変	不変
1314 Th 未 使 用 群	13. ■■■	INH・PAS	CB ₃ Kz→CB ₃ Kz	不変	不変	不変
	14. ■■■	SM・PAS・INH	F → F	不変	不変	死亡
	15. ■■■	SI・INH _G	B ₃ Kc→B ₃ Kc	不変	不変	不変
	16. ■■■	INH・PAS	F → F	不変	不変	不変
	17. ■■■	SM・PAS・INH	F → F	不変	不変	不変
	18. ■■■	INH・PAS	F → F	不変	不変	不変
	19. ■■■	SM・PAS・INH	F			1 カ月後手術

* 1314 Th 1 カ月治療。赤沈好転は 1 時間値で $\frac{1}{2}$ 以下となつたもの。
症例 6, 7, 8 は総合して不変と判定した。症例 9, 10, 11 は菌陰転

学研分類による治療前後の所見。

actual count 法 によつて観察した投与患者と未治療対照患者の耐性度の経過は表 3 のとおりである (SM, PAS, INH 耐性度の成績は省略)。表 3 のように未使用群では耐性度はわずかの動揺 (1:2 程度) を示すにすぎない。各個人の耐性度の差は個人特有のものであることがうかがわれる。1314 Th 投与群では菌陰転が起こらぬかぎり、1~4 カ月の間に耐性度は約 4 倍に上昇し、同時に臨床効果が減退するごとく思われた。この表 3 と表 4 に示した結果から「耐性」の臨床的境界は 20~30 $\mu\text{g/ml}$ まで 30 $\mu\text{g/ml}$ 付近とするのが妥当のように思われた。耐性の出現時期は上記のごとく 1~4 カ月で、仏、伊における先人の報告 (間接法)^{4)~9)} と一致する。耐性出現の平均期間は 2.5 カ月である。表 3 の結果からわれわれの方法は臨床に十分用いるにたるところと思われる。

(4) primary resistance (未治療耐性) と臨床効果の関係

1314 Th の特徴は未治療患者の耐性度の個人差が大きいことである。この治療前の耐性度と治療効果とが関係があるかどうかはおおいに注目される問題である。われわれの成績は比較的少数例ではあるが、治療前の耐性度と治療効果とが関係深いことを示している。4 カ月治療を継続しえた 11 例中 3 例 (症例 6, 7, 8) は治療前に 10~30 $\mu\text{g/ml}$ 耐性を示したが、これら 3 例の治療効果は不変と判定された (耐性度測定と治療効果判定は無関係に行ない、後で照合した)。一方治療前に 5 $\mu\text{g/ml}$ 以下の耐性度を示した 8 例は多少とも臨床的好転が認められた。菌陰転の 3 例はすべて耐性度 5 $\mu\text{g/ml}$ の例であつた。さらに 1314 Th 耐性上昇の経過をみても、治療前にすでに耐性度の高いものは速やかに高耐性に達した (表 3, 4 参照)。

以上の結果から **actual count 法** による直接法耐性検査は十分実用に供しようと思われた。

(5) primary resistance (未治療耐性) とチピオン

投与との関係

1314 Th の未治療耐性は上述のごとく注目に値する問題と思われるが、最近 Bartmann¹⁸⁾ は興味ある報告を行なっている。すなわち *in vitro* 実験では Rist¹⁰⁾ がすでに指摘したごとく、1314 Th 耐性菌が thiosemicarbazone (tibione) 耐性を増しているのみで他の交叉耐性は認めえない (tibione 耐性菌は 1314 Th 感性)。しかし人体内の tibione 耐性菌は 1314 Th にも耐性であるというのである。

われわれの routine 法で 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 完全耐性を示した 4 例 (actual count 法の 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性 2 例を含む) の過去の化学療法を調べるのに、tibione 投与を受けたのは 1 例のみであった。この 1 例は 1952～1958 年の間に計 57 g の tibione を服用していた。他の 3 例は tibione を服用したことがない。なお被検 61 例中 tibione 服用者は上述の例のほかは 2.1 g (1957 年) 服用の 1 例のみで、後者の耐性は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった (ただし routine 法)。すなわちわれわれの成績では 1314 Th 耐性が tibione の投与と関係があるとは考えがたかつた。この問題については現在喀痰中結核菌について 1314 Th 耐性と tibione 耐性を比較検討中である。

(6) われわれの直接法耐性検査の特徴

直接法耐性検査の利点は、第一に成績が早く得られることであり、第二には喀痰中結核菌の直接的成績である点である。小川培地のごとき卵培地では継代による population change は起こりがたいので、直接法と間接法の成績は接種生菌数を同一にすればよく一致するはずである。ただし分離または継代した Dubos-albumin 寒天培地や Kirchner 寒天培地を使用する場合は、INH 耐性株のあるものが population change を起こして耐性菌含有率が低下することがあるので注意を要する。いずれにしても直接法のほうが勝るのは疑いない。

われわれの actual count 法の直接法は次の特徴を有する。(1) 今までの 1314 Th 耐性検査はすべて間接法によっているが、われわれは今回、直接法で 1314 Th 耐性検査を行なう方法を提出した。われわれの方法は直接法であるから、検査成績を得るまでの期間が間接法より速い。(2) いずれの培地を用いても「接種生菌数」による成績の動揺は避けがたいが、われわれの方法ではこれを一定化したため、安定した再現性ある成績が得られる。(3) 常用される小川培地を用いた。(4) ただし、喀痰の稀釈の繁雑さという欠点は免れえない。

結 論

1) 直接法による 1314 Th 耐性検査法を提出した。われわれの actual count 法によれば小川培地を用いて十分再現性のある耐性検査が可能である。

2) actual count 直接法の耐性検査成績は 1314 Th 治療効果とよく一致した。1314 Th 耐性の臨床的境界は 20～30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 付近と考えられる。なお routine 法でも臨床上のおおよその見当づけは可能であるが再現性

に乏しいうらみがある。

3) 1314 Th 未治療患者中にも 6～7% の率で primary resistance が認められた。1314 Th 未治療患者でも耐性度の個人差は大きい。治療前にすでに耐性度の高いものは耐性の上昇も速やかで治療成績も悪い傾向を示した。

1314 Th 4 カ月の投与により慢性空洞性結核 (S.M., P.A.S., INH 耐性) 11 例中 3 例に菌の陰転を認めたが、この 3 例はいずれも治療前の耐性度 (actual count 法) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のものであった。

4) 1314 Th 耐性の出現は投与開始後 1～4 カ月 (平均 2.5 カ月) であった。

勝沼六助荘長ならびに日比野進教授の御校閲に謝意を表す。本研究に用いた 1314 Th は塩野義製薬株式会社からの供与によつた。耐性検査は大府荘検査室の河西栄文、鬼頭義弘両氏の協力によつた。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) Rist, N. : Bulletin de l'Union Internationale contre le Tuberculose, 28 : 220, 1958.
- 2) Brouet, G. : *ibid.*, 28 : 228, 1958.
- 3) Scherding, J.P. : Bull. l Mém. Soc. méd. Passy, 45 : 13, 1958.
- 4) Daddi, G., Corda, M., Grassi, C., & Sacerdoti, C. : Giorn. ital. tuberc., 12 : 1, 1958.
- 5) Brouet, G., Marche, J., Rist, N., Chevallier, J., & Le Meur, G. : Am. Rev. Tuberc., 79 : 6, 1959.
- 6) Chambatte, Ch., Pernod, J., Moreau, A., Bousquet, C., Enjalbert, M., & Lededente, A. : Rev. Tuberc. Pneumol., 23 : 407, 1959.
- 7) V éran, P., Rist, N., Trichereau, R., & Moigneteau, C. : Presse Medicale, 67 : 1597, 1959.
- 8) Somner, A. R., Ross, J. D., MacLeod, H. M., Stewart, S. M., Horne, N. W., & Crofton, J. W. : Brit. Med. J., 5120 : 486, 1959.
- 9) Nitti, V., Miraglia, E., & Virgilio, R. : Arch. Tisiol. Mal. App. Resp., 15 : 971, 1960.
- 10) Rist, N., Grumbach, F., & Libermann, D. : Presse Medicale, 67 : 625, 1959.
- 11) Lucchesi, M., Zubiani, M., & Termine, A. : Ann. Ist. C. Forlanini, 19 : 451, 1959.
- 12) 東村道雄・安保孝・勝沼六助 : 結核, 34 : 625, 昭34.
- 13) 東村道雄 : 結核, 35 : 397, 昭35.
- 14) 東村道雄・河西栄文 : 結核, 36 : 38, 昭36.
- 15) 東村道雄 : 衛生検査, 9 : 134, 昭35.
- 16) 東村道雄・山本昌邦・林光男・中村栄一 : Chemotherapy, 6 : 65, 昭33.
- 17) Chambatte, Ch., & Pernod, J. : 未発表成績.
- 18) Bartmann, K. : Tuberkulosearzt, 14 : 525, 1960.