

咯痰中結核菌の 1314Th 耐性とチビオン耐性ととの関係(臨床的観察)

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

受付昭和36年12月12日

Ristら¹⁾, Brouetら²⁾は結核患者咯痰中結核菌の alpha-ethyl-thioisonicotinamide (1314Th) 耐性を測定し, 1314Th 未治療患者に 2~4% の 1314Th 自然耐性株があることを報告している。東村・安保³⁾は直接法の“actual count 法”^{3)~5)}で 1314Th 耐性を比較的正確に測定した結果, 1314Th 未使用患者に相当数の自然耐性株(ある患者の排泄する結核菌の大部分が耐性であるから, 耐性株というほうが適切である)が存在することを認めるとともに, これら自然耐性例では 1314Th の治療効果が少ないことを見出した。有力な新抗結核剤 1314Th にかんがりの自然耐性株があることは注目すべき現象であり, 1314Th の治療効果の個人差の重要な因子としてこの自然耐性株の存在をあげることができる。すなわち, ある患者の結核菌はほとんど全部 1314Th に感受性が高いことがあると同時に, 一方では他のものの結核菌は治療前からほとんど全部 1314Th に耐性である。

このような現象の原因として Bartmann⁶⁾が 4-acetylaminobenzaldehyde-thiosemicarbazone (Tb₁) の使用の有無を考えたのは一応当然の経路であろう。しかし, 1314Th 耐性と他の抗結核剤との間には Tb₁ を例外として交叉耐性がないことが知られている^{1)2)7)~9)}。Tb₁ のみは例外で, Ristら¹⁾によれば, 1314Th と Tb₁ との間には一方向的交叉耐性があり, 1314Th 耐性菌は Tb₁ 耐性であるが, Tb₁ 耐性菌は 1314Th 感性にとどまるといふ。著者⁹⁾はさらにこの一方向的交叉耐性は 1314Th 高耐性菌のみに認められる現象であり, 1314Th 低耐性菌は Tb₁ 感受性であることを見出した。以上は *in vitro* 実験の結果であるが, Bartmann⁶⁾によれば *in vivo* では事情が異なり, 1314Th と Tb₁ の間に交叉耐性が成立するという。この所見ははなはだ興味ある現象であるが, Tb₁ 使用例の少ないわれわれの手許では追試が困難である。そこで著者はまず Tb₁ 未使用患者について, 1314Th 未使用者と既使用者とで

Tb₁ 耐性を検したところ, 同じ 1314Th 耐性菌でも自然耐性菌と獲得耐性菌とでは Tb₁ 耐性に対する関係が異なることを見出した。すなわち, 1314Th → Tb₁ の一方向的交叉耐性は, 1314Th 獲得耐性菌 (1314Th 治療により 1314Th 耐性となつた菌) でのみ認められる現象であり, 1314Th 自然耐性菌は一方向的交叉耐性がないことが分かつた。

実験方法

国立療養所大府荘入院中の患者で, 慢性空洞性肺結核を有し, かつ, SM, INH, PAS, KM の 4 者中少なくとも 2 剤以上に耐性を示す患者 108 名を対象とした。これらの患者は Tb₁ の投与は受けていない。これらの患者を 2 群に分け, 1 群は 1314Th 未使用例 86 例で, 他は 1314Th 4 カ月 (1 日 0.5 g 毎日) 使用群 22 例とした。

これらの患者について, actual count 法^{3)~5)}で耐性を測定した。actual count 法による 1314Th 耐性度測定法については既報³⁾したが, Tb₁ についてもこれに準じた。1314Th は 10 mg/ml, Tb₁ は 5 mg/ml に propylenglycol に溶解し, ついで水で稀釈して滅菌前の 1% 小川培地に加えた。

実験成績および考察

成績は図 1 にまとめた。図中の白丸はおのおの, 1314Th 未使用患者における 1314Th 耐性度および Tb₁ 耐性度の測定成績を表わす。黒丸は 1314Th 治療患者における成績を表わしている。また表 1 に実際の測定成績を例としてあげた。

1) 1314Th 耐性度ならびに Tb₁ 耐性度の分布

図 1 の白丸は, 1314Th および Tb₁ 両剤とも使用したことがない患者の耐性度の分布を示している。図から明らかなごとく, 注目すべきことは, 1314Th 耐性についても, Tb₁ 耐性についても患者の個人差がはなはだ

Table 1. Examples of Resistance Test According to the Actual Count Method

Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Case 1			Case 2			Case 3		
		10^0	10^{-2}	10^{-3} *	10^0	10^{-2}	10^{-3} *	10^0	10^{-2}	10^{-3} *
1314 Th	0	+++	110	56	+++	+	79	++	77	19
	5	+++	167	55	+++	+	41	+	63	4
	10	+++	95	42	+	6	-	+	4	-
	20	++	44	12	51	-	-	-	-	-
	30	+	39	7	45	-	-	-	-	-
	50	+	13	2	7	-	-	-	-	-
	100	18	-	-	3	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thiosemicarbazone	0	+++	110	56	+++	+	79	++	77	19
	0.1	+++	92	29	+++	+	52	++	42	9
	0.5	+++	68	30	+++	+	46	++	58	15
	1	+++	77	27	+++	+	39	+	72	14
	5	+++	80	19	+++	+	22	-	-	-
	10	+++	82	19	++	+	24	-	-	-
	50	+	11	-	+	5	-	-	-	-

* Degree of sputum dilution.

Numbers in table indicate colony numbers on each drug concentration. From the data, resistance levels have been determined as 50 $\mu\text{g/ml}$ 1314Th resistance and 10 $\mu\text{g/ml}$ thiosemicarbazone resistance in case 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ 1314Th resistance and 10 $\mu\text{g/ml}$ thiosemicarbazone resistance in case 2, and 10 $\mu\text{g/ml}$ 1314Th resistance and 1 $\mu\text{g/ml}$ thiosemicarbazone resistance in case 3, taking the numbers nearest fifty as the basis of calculation.

Techniques of the actual count method is as follows:

Sputa of each patient were collected for one day, to which was added one volume of 5 per cent potassium hydroxide solution, and were homogenized by pumping with a pipette for twenty minutes. The resulting sputum fluid was diluted with saline to make up 10^0 (original) to 10^{-3} dilutions. Each 0.02 ml sample of the 10^0 , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions was inoculated with a spiral loop delivering 0.02 ml onto a series of egg medium containing graded concentrations of the drugs. The tubes inoculated were stoppered immediately and incubated at 37 °C. Colony count was made after six weeks. The level of drug resistance was expressed as the highest concentrations of the drugs on which small inocula consisting of less than one hundred viable cell units, if possible, near fifty viable cell units can form colonies. (# Egg medium consists of; basal solution (1 % KH_2PO_4 and 1 % sodium glutamate), 100 ml; eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2 % malachite green, 6 ml (pH 6.8). The medium was slanted by a sterilization at 90 °C for sixty minutes. The drugs were first dissolved in propylglycol at concentrations of 5 to 10 mg/ml and diluted with water. The drugs were added to media prior to the sterilization.)

大きいことである。

耐性度の測定には、接種菌重量を揃えることはあまり意味がなく (mg 中の生菌数は実験ごとに変動が大きい)、接種生菌数を揃えることが重要であることは、著者がかねてから主張するところであり、actual count 法の提唱はこのためである。しかし临床上、常に actual count 法を用いることは実行困難であつて、実用上には routine 法でまにあわすより仕方がないし、また大抵の場合はこれで十分実用に役立つものである。しかし、Kanamycin や 1314 Th の測定成績は接種生菌数の影響を受けやすい例であつて、研究自的の比較的正确さが要求される場合には actual count 法を用いることが望ましい。

1314Th 耐性度分布と Tb_1 耐性度の分布をみると actual count 法で接種生菌数の影響を除外したにもかかわらず、分布の範囲がはなはだ広いことが注目される。

1314Th 耐性 (未使用患者) については、5 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ の分布があり (変動域 1:20)、 Tb_1 耐性については 0.1 $\mu\text{g/ml}$ から 10 $\mu\text{g/ml}$ の著しい広い分布がある (変動域 1:100)。このような未治療耐性のはなはだしい差は、ただちに治療効果の差となつて反映することがおおいに考えうる。この変動域を、KM 未治療患者の KM 自然耐性分布の場合 (変動域 1:4)⁵⁾ に比較するとはなはだしい差がある。

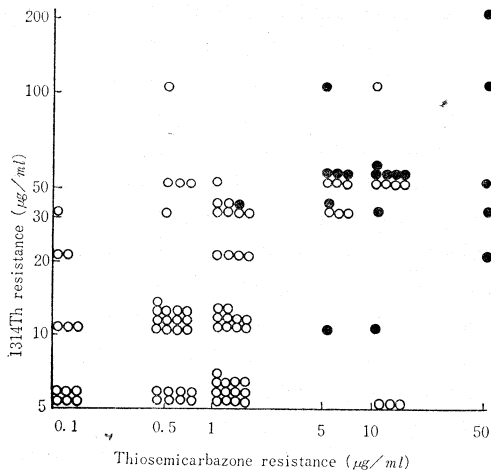
このような未治療患者における、いわゆる自然耐性の広い分布は 1314Th および Tb_1 耐性の大きな特長としてあげうる。

2) 1314 Th 耐性と Tb_1 耐性の関係

1314Th 耐性と Tb_1 耐性の関係は、1314 Th 未使用群と治療群とでおおいに異なつてゐることは図から明らかである。

1314 Th 未治療でしかも高い 1314 Th 耐性を示すもの、すなわち自然耐性群 (既報³⁾ のごとく 1314Th 30

Fig. 1. Relationship between Alpha-ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th) Resistance and Thiosemicarbazone Resistance of Tubercle Bacilli Occurring in Sputa of Patients



Open circles: Patients not treated previously with 1314Th and thiosemicarbazone; Closed circles: Patients treated with 1314Th.

$\mu\text{g/ml}$ 以上耐性例は 1314 Th の治療効果が少なく、臨床耐性と考えられる) では、 Tb_1 耐性が低いものもあれば、高いものもあつて一定の関係がない。

一方、1314 Th 治療群では 1314 Th 耐性度が上昇すると同時に、 Tb_1 耐性も上昇している。すなわち、*in vivo* で 1314 Th 耐性と Tb_1 耐性との一方向交叉耐性が認められるのは (Bartmann⁶) のいうごとく Tb_1 耐性→1314 Th 耐性の関係が *in vivo* で成立するかどうかはまだ追試していない、1314 Th 獲得耐性群のみであることが分かる。

先に述べたごとく、*in vitro* で 1314 Th 耐性→ Tb_1 耐性の交叉耐性が存在することは、Rist¹⁾ および著者⁹⁾ により観察されたが、同じ関係が *in vivo* でも成立することが、本報の結果から明らかとなつた。

また 1314 Th 自然耐性の存在は临床上重要な意義を有するものであり³⁾、かつその起原がどこにあるかは向後おおいに興味ある問題であるが、本報の結果から、1314 Th 自然耐性の起原と性質が 1314 Th 獲得耐性と異なることが考えられる。すなわち、自然耐性菌の Tb_1 耐性への関係は *at random* であるが、獲得耐性菌は Tb_1 耐性を平行的に随伴する点で明らかにその性質が違つて

いる。

総 括

結核患者の結核菌の 1314 Th 耐性とチビオン (Tb_1) 耐性とを actual count 法で測定し、次の結論を得た。

1314 Th、 Tb_1 とともに未使用患者の結核菌株の 1314 Th および Tb_1 感受性は各個人により非常に差がある。1314 Th 耐性度の分布は $5\sim 100 \mu\text{g/ml}$ 耐性の広い範囲に分布し、 Tb_1 耐性度の分布も $0.1\sim 10 \mu\text{g/ml}$ の広い分布を示した。すなわち、その変動範囲は前者で 1:20、後者で 1:100 で Kanamycin (1:4) などに比してはなほ大きい。

1314 Th 未使用でも、臨床耐性の限界とみなされる $30 \mu\text{g/ml}$ 以上の自然耐性株をもつものがかなりあり、その数は約 4 分の 1 に及ぶ。

1314 Th 自然耐性株は必ずしも Tb_1 耐性を伴わない。1314 Th 自然耐性と Tb_1 耐性の関係は *at random* である。一方、1314 Th 投与によつて生じた 1314 Th 獲得耐性株は同時に Tb_1 耐性度も上昇している。すなわち、先に観察された 1314 Th 耐性→ Tb_1 耐性の一方向的部分交叉耐性が *in vivo* でも観察された。

1314 Th 自然耐性菌と獲得耐性菌とは Tb_1 耐性に対する関係が違つている。したがつて、この両者の起原や性質は別個のものと考えられる。

文 献

- 1) Rist, N., Grumbach, F. and Libermann, D.: Amer. Rev. Tuberc., 79: 1, 1959.
- 2) Brouet, G., Marche, J., Rist, N., Chevallier, J. and LeMeur, G.: Amer. Rev. Tuberc., 79: 6, 1959.
- 3) Tsukamura, M. and Abo, T.: Kekkaku, 36: 361, 1961.
- 4) Tsukamura, M.: J. Antibiotics, A, 12: 189, 1959.
- 5) Tsukamura, M., Abo, T. and Katsunuma, R.: kekkaku, 34: 625, 1959.
- 6) Bartmann, K.: Tuberkulosearzt, 14: 525, 1960.
- 7) Daddi, G., Corda, M., Grassi, C. and Sacerdoti, C.: Giorn. ital. Tuberc., 12: 205, 1958.
- 8) Nitti, V.: Arch. Tisiol., 14: 819, 1959.
- 9) Tsukamura, M.: Kekkaku, 36: 733, 1961.

Rist et al¹⁾, and Brouet et al²⁾, tested the susceptibility of tubercle bacilli to alpha-ethyl-thioisonicotinamide (1314Th) before treatment and reported on the presence of natural resistant strains to this drug. Rist et al¹⁾, stated that bacilli resistant to 1314Th isolated in in vitro experiments are usually resistant to thiosemicarbazone and, however, not vice versa. This finding was confirmed by the present author⁹⁾. Recently, Bartmann⁶⁾ reported that in vivo relationship between the resistances to these drugs was not so simple as shown in in vitro experiments and there existed a cross resistance between these drugs. The purpose of the present study is to confirm the in vivo relationship between the 1314Th resistance and the thiosemicarbazone resistance in tubercle bacilli.

Materials and Methods

Patients with chronic cavitary tuberculosis, who were being hospitalized and excreting tubercle bacilli resistant to two or more drugs (SM, INH, PAS, and kanamycin), were the subjects of the study. The patients were divided into two groups; one consisting of 86 cases not treated with 1314Th previously and another consisting of 22 cases treated with 1314Th for four months (daily 0.5 gm). All the patients received no treatment with thiosemicarbazone. Levels of drug resistance were determined by a direct, quantitative method named by the author^{3)~5)} as the "actual count method". The method for 1314Th resistance was described previously³⁾.

Results

The data obtained are summarized in figure 1 and some examples of the resistance test are shown in table 1.

It is remarkable that the resistance levels to 1314Th as well as to thiosemicarbazone widely vary depending upon the individual case and there are a considerable number of natural resist-

ance cases.

In the nontreated cases with 1314Th, there was only a random relationship between the natural 1314Th resistance and the natural thiosemicarbazone resistance (open circles in figure 1). On the other hand, in the 1314Th-treated cases, a close relationship was found between the acquired 1314Th resistance and thiosemicarbazone resistance (closed circles in figure 1). A marked increase in the level of thiosemicarbazone resistance was caused by the use of 1314Th, although no treatment with thiosemicarbazone was made. It can be said that the natural resistance to 1314Th in tubercle bacilli has no intimate relation to the thiosemicarbazone resistance and, on the other hand, the acquired resistance to 1314Th has a close relationship to the thiosemicarbazone resistance.

The results show that the origin of the natural resistance to 1314Th apparently differs from that of the acquired resistance to this drug.

Summary

Resistances of tubercle bacilli occurring in patients to alpha-ethyl-thioisonicotinamide (1314Th) and thiosemicarbazone were determined by a direct method of the drug resistance test.

Natural resistance to 1314Th was not always accompanied by thiosemicarbazone resistance and there was only a random relationship between natural 1314Th resistance and thiosemicarbazone resistance. On the other hand, acquired resistance to 1314Th was mostly accompanied by an increase of thiosemicarbazone resistance, although the latter drug was never administered. Thus, there exists an in vivo one-way cross-resistance relationship between 1314Th and thiosemicarbazone.

Natural resistance to 1314Th was thought to differ from the acquired resistance to 1314Th in the origin and nature of resistance.