

結核菌の Ethionamide 耐性獲得とその阻止

土 持 隆 彦

熊本大学医学部第一内科学教室 (指導 河盛勇造教授)

受付 昭和 38 年 2 月 1 日

緒 言

alpha-Ethyl-thioisonicotinamide (Ethionamide, 1314 TH, 以下 TH と略) は, David Liebermann によつて 1956 年合成され, Rist ら¹⁾によつて基礎的成績, Brouet ら²⁾によつて臨床的成績が報告されて以来, 今日まで多くの基礎的, 臨床的成績の報告がなされている。本剤は TB1 を除いて, 他の抗結核剤との交叉耐性がみられずすぐれた菌陰転率を示すことから, ことに他種抗結核剤耐性結核患者治療の有力な武器とみなされている。しかし他の抗結核剤におけると同じく, TH もまた耐性菌出現の可能性が考えられる。私は結核菌の TH に対する耐性獲得状況およびそれが他種抗結核剤との併用によつて阻止されるかどうかを検討するために試験管内実験を行ない, いささか知見を得たので報告する。

実験 1. 結核菌の TH 耐性獲得に及ぼす

他種抗結核剤併用の影響

実験材料および方法

供試菌株: 教室保存の人型結核菌 H₃₇R_v 株, H₂ 株および SM 耐性吹田株を用いた。

使用培地: Dubos-Tween-Albumin 培地

上記の菌株の 1% 小川培地に発育 4 週目の集落をとり, ガラス球入り丸コルペンで, 手振り法によつて 1 mg/cc の菌液をつくり, その 0.1 cc を Dubos 液体培地に接種, 37°C 7 日間培養後, その 0.1 cc 宛を TH 単独含有 Dubos 培地と, TH と他種抗結核剤の最小発育阻止濃度以下を組み合わせた Dubos 液体培地に接種し, 以後 7 日ごとの増量継代によつて TH 耐性上昇を比較した。本実験に用いた TH の濃度は, 培地 1 cc 当り 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 r であり, TH はプロピレングリコールで溶解後, 滅菌蒸留水で所要の濃度に希釈して用いた。また併用した他の抗結核剤の種類と濃度は INH 0.005 r/cc, SM 0.1 r/cc, PAS 0.1 r/cc, Sulfaisoxazole (SI) 10 r/cc, KM 0.1 r/cc であつた。継代は各群とも 37°C 7 日間培養後, 薬剤非含有培地と肉眼的にほぼ同程度の発育が認められた最高濃度の薬剤含有培地

から, 0.1 cc 宛を次代に接種して行なつた。

実験成績

a) H₃₇R_v 株についての実験

実験成績は図 1 および図 2 に示した。すなわち TH 単独の場合の各代における最小発育阻止濃度は, 1~4 代は 5 r/cc, 5~7 代は 20 r/cc, 8 代は 100 r/cc であり, 9 代, 10 代は 100 r/cc にも発育を認めた。INH 0.005

Fig. 1. Development of Ethionamide Resistance in H₃₇R_v Strain (Effects of isoniazid, PAS and sulfaisoxazole)

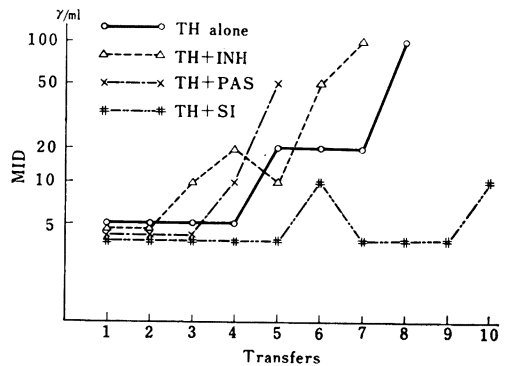
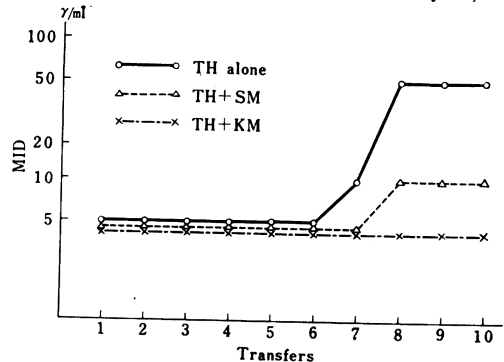


Fig. 2. Development of Ethionamide Resistance in H₃₇R_v Strain (Effects of streptomycin and kanamycin)



7/cc 併用では、1代、2代は 5 r/cc、3代 10 r/cc、4代 20 r/cc、5代 10 r/cc、6代 50 r/cc、7代、8代は 100 r/cc であり、9代、10代は 100 r/cc にも発育を認め、併用による耐性出現の遅延を認めえなかつた。PAS 0.1 r/cc 併用では、1~3代は 5 r/cc、4代 10 r/cc、5代 50 r/cc であり、6代以後は 100 r/cc にも発育がみられ、併用による耐性出現の遅延を認め得なかつた。次に SI 10 r/cc 併用では、1~5代は 5 r/cc で阻止され、6代は 10 r/cc、7代、8代、9代は再び 5 r/cc で阻止され、10代では 10 r/cc で阻止がみられ、併用による TH 耐性出現の阻止効果が認められた。

以上の実験と別に行なつた、TH 単独と SM、KM 併用の場合の比較では、図2のごとく、TH 単独では1代~6代は 5 r/cc で阻止され、7代は 10 r/cc、8代、9代、10代は 50 r/cc で阻止された。SM 0.1 r/cc 併用では、1代~7代は 5 r/cc、8~10代は 10 r/cc で阻止され、併用による TH 耐性出現の阻止効果が認められた。

Fig. 3. Development of Ethionamide Resistance in H₂ Strain (Effect of isoniazid, PAS and sulfaisoxazole)

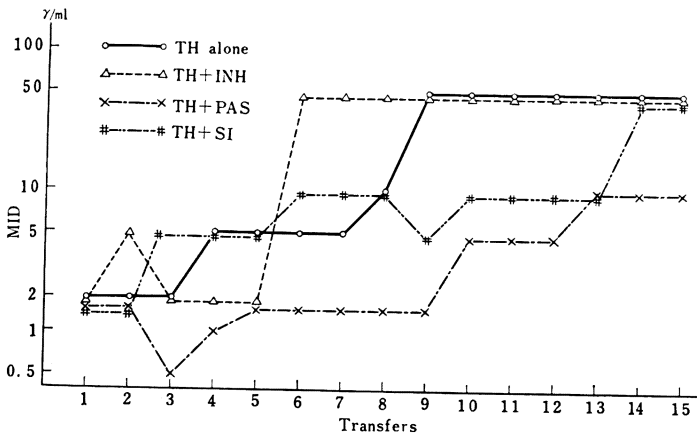
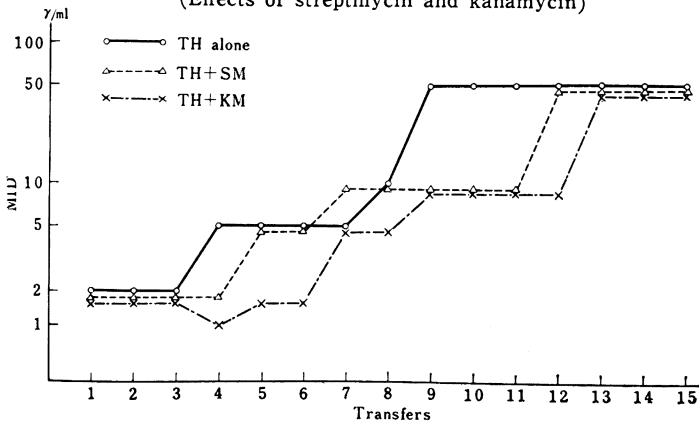


Fig. 4. Development of Ethionamide Resistance in H₂ Strain (Effects of streptomycin and kanamycin)



KM 0.1 r/cc 併用では、1代~10代は 5 r/cc で阻止されて、耐性度の上昇が認められず、もつとも併用効果が著明であつた。

b) H₂ 株についての実験

本菌株では、TH 単独の場合と他種抗結核剤併用の場合の TH 耐性上昇の比較を 15 代まで行なつた。結果は図3、4のごとく、TH 単独群の最小発育阻止濃度は 1~3代は 2 r/cc、4~7代は 5 r/cc、8代 10 r/cc、9代以後は 50 r/cc であつた。INH 0.005 r/cc 併用では、1代は 2 r/cc、2代は 5 r/cc、3~5代は 2 r/cc で阻止されたが、6代以後は 50 r/cc で阻止され、14代目に一たん 10 r/cc で阻止されたが、15代では 50 r/cc で阻止され、併用による耐性獲得の遅延はみられなかつた。PAS 0.1 r/cc 併用では、1代、2代は 2 r/cc で阻止され、3代目には 0.5 r/cc、4代では 1 r/cc とその最小発育阻止濃度が低下したが、5~9代は 2 r/cc、また 10~12代は 5 r/cc、13代以後は 10 r/cc で阻止され、

H₃₇R_V 株とは異なつて、併用による耐性出現の阻止効果がみられた。次に SI 10 r/cc 併用では、1代、2代は 2 r/cc、3~5代は 5 r/cc、6~8代は 10 r/cc で阻止され、TH 耐性獲得に影響をおよぼさなかつたが、9代目には 5 r/cc、10~13代は 10 r/cc、14代、15代は 50 r/cc で阻止され、TH 単独群に比して併用による高濃度耐性出現の多少の遅延がみられた。SM 0.1 r/cc 併用では、その最小発育阻止濃度は 1~4代は 2 r/cc、5代、6代は 5 r/cc、7~11代までは 10 r/cc であり、12代以後は 50 r/cc となり、高濃度耐性の出現を遅延させる効果がみられた。KM 0.1 r/cc 併用では、1~3代は 2 r/cc、4代は 1 r/cc、5代、6代は 2 r/cc、7代、8代は 5 r/cc、9~12代は 10 r/cc、13代以後は 50 r/cc で阻止され、高濃度耐性出現を遅延する効果がみられた。

c) 吹田株についての実験

この菌株は SM に対して、1,000 r 完全耐性を示した。INH、PAS にはそれぞれ 0.1 r、1 r で阻止された。前2株と同様に、TH 単独の場合と、他種抗結核剤併用の場合について TH 耐性上昇を比較し、図5、6にその成績を示した。すなわち TH 単独ではその最小発育阻止濃度は、1代は 10 r/cc で、前2株より高かつた。2~5代は 50 r/cc、6代は 10 r/cc で阻止されたが、7代では 100 r/cc で阻止されるようになり、8代以後は 100 r/cc にも発育が認められ

Fig. 5. Development of Ethionamide Resistance in Suita strain (Effects of isoniazid, PAS and sulfaisoxazole)

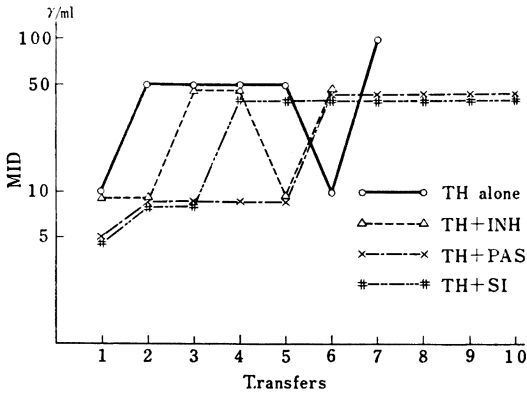
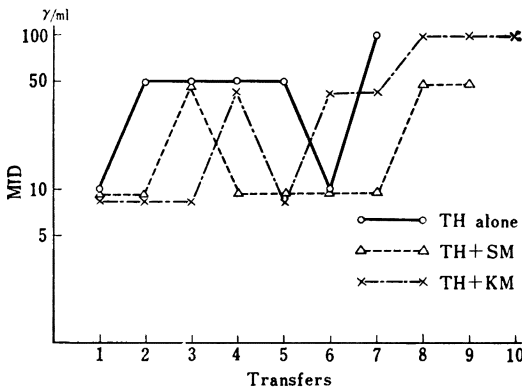


Fig. 6. Development of Ethionamide Resistance in Suita Strain (Effects of streptomycin and kanamycin)



た。INH 0.005 r/cc 併用では、1代、2代は 10 r/cc で阻止され、3代、4代は 50 r/cc、5代は 10 r/cc に低下したが、6代では再び 50 r/cc で阻止され、7代以後は 100 r/cc にも発育を認めるようになり、併用による TH 耐性獲得の阻止～遅延を認めえなかつた。PAS 0.1 r/cc 併用では、1代は 5 r/cc で阻止され、2～5代は 10 r/cc、6代以後 10代まで 50 r/cc で阻止され、耐性上昇の遅延がみられた。SI 10 r/cc 併用では、1代は 5 r/cc で阻止され、2代、3代は 10 r/cc、4代以後 10代まで 50 r/cc で阻止され、PAS 同様耐性上昇の遅延がみられた。SM 0.1 r/cc 併用では1代、2代は 10 r/cc で阻止され、3代は 50 r/cc、4～7代は再び 10 r/cc、8代、9代は 50 r/cc で阻止され、10代目には 100 r/cc にも発育が認められた。本菌株は SM 耐性であるにもかかわらず、SM の併用によつて高濃度の TH を含有する培地に発育する個体の出現が多少とも遅れる傾向がみられた。KM 0.1 r/cc 併用では、1～3代は 10 r/cc、4代は 50 r/cc、5代は再び 10 r/cc 阻止がみられ、6代、

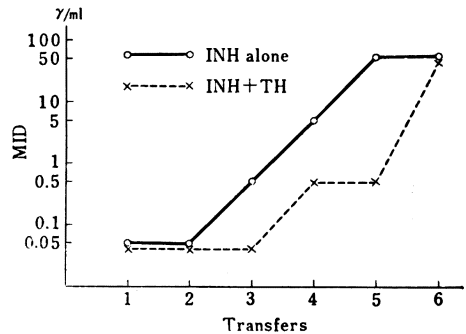
7代は 50 r/cc、8代以後 10代までは 100 r/cc で阻止され、高濃度耐性出現の遅延がみられた。

実験 2. 結核菌の INH 耐性獲得におよぼす TH 併用の影響

次に INH 耐性獲得におよぼす TH 併用の影響を検討するために試験管内実験を行なつた。

実験材料および方法：菌株は H₃₇R_V 株、培地は Dubos 液体培地を用い、方法は前実験と同様である。培地内の INH 濃度は 1 cc 当り 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 r とし、TH は 1 r/cc になるよう添加した。実験成績は図 7 に示した。すなわち INH 単独群では、その最小発育阻止濃度は、1代、2代は 0.05 r/cc、3代 0.5 r/cc、4代 5 r/cc、5代、6代は 50 r/cc であつた。INH・TH 併用群のそれは 1～3代は 0.05 r/cc、4代、5代は 0.5 r/cc であつたが、6代目には単

Fig. 7. Development of Isoniazid Resistance in H₃₇R_V Strain (Effect of ethionamide)



独群と同様 50 r/cc となり、TH の併用が INH 耐性の獲得を阻止するという成績は得られなかつた。

実験 3. TH 耐性菌のカタラーゼ、ペルオキシダーゼ活性

実験方法：Tirunaryanan⁹⁾ の方法に従い、0.2% カテコール液と 1% 過酸化水素溶液の等量混合液を H₃₇R_V 株および H₂ 株の TH 10 r/cc、50 r/cc、100 r/cc 含有 1% 小川培地からスライドガラス上にとつたおのおの 10 コの集落上に滴下し、5 ないし 30 分の間に集落が漸次褐色に変化した場合をペルオキシダーゼ陽性、発泡を認めた場合をカタラーゼ陽性とした。

実験成績：TH 10 r/cc、50 r/cc、100 r/cc 含有 1% 小川培地上の集落は、いずれもカタラーゼ、ペルオキシダーゼ陽性であつた。

総括ならびに考案

結核の化学療法にさいして、薬剤耐性菌の出現は治療を困難にする大きな障害である。近時、他種抗結核剤耐性結核患者の治療の有力な武器として、Ethionamide

が出現したが、本剤に対しても、比較的容易に耐性菌が出現することが報告されている¹⁴⁾。そこでその防止の手段として、他種抗結核剤との併用が考えられる。Ristら¹⁾は、マウス体内でSMまたはINHの併用が耐性菌の出現を抑制するといひ、多賀ら⁵⁾はPAS, INHがTH耐性菌の出現速度を遅延するといひ、堂野前¹³⁾はPAS, Sulfaisomezole, Sulfaisoxazoleが著明な阻止作用があったと報告している。東村¹⁴⁾は各種薬剤のきわめて低濃度を添加したときのTHの最小発育阻止濃度の受ける影響を観察し、PAS, KM, VMが比較的有効と考えられると報告している。臨床的にはResearch Committee of British Tuberculosis Association⁹⁾の報告では、PZA併用群に比べ、CS併用群のほうがTH耐性菌の出現が遅延するといひ、Suhützel¹⁰⁾はCSの併用はTH耐性菌の出現を阻止しえないといひ、堂野前¹⁵⁾はKM, CS, SI, PAS併用群では、2カ月、4カ月時にはTH単独群に比しやや低い耐性出現率を示したが、6カ月時には大差をみなかつたと報告し、Allanら⁸⁾も、いかなる薬剤と併用しても、菌陰転が起こらぬかぎり、早期に耐性菌が出現することは免れがたいと報告している。私は結核菌のTH耐性獲得状況および耐性獲得がいかなる薬剤との併用によつて防止できるかを検討するために、試験管内実験を行なつた結果、H₃₇R_V株ではINH, PASには遅延効果なく、SM, KM, SIは多少影響を認めたが、H₂株ではINHは遅延効果がなく、PAS, SM, KM, SIには多少の効果も認めた。また吹田株では、INHには阻止効果を認めず、PAS, KM, SIには多少の効果も認めた。またSM耐性株であるにもかかわらず、SMの併用によつてTH 100 r/cc含有培地に発育するのが、TH単独群に比し2代おくれるのを認めた。このように菌株によつて相当な差が認められたことは注目し値すると考える。また同じくH₃₇R_V株を用いた実験でも、そのTH耐性出現状況にいささかのずれがみられたが、示されたパターンには大差がなかつた。私が実験に用いた3株ともINHの併用は阻止効果を認めず、このことはRistら¹⁾、多賀ら⁵⁾の成績と異なつてゐるが、これは菌株差の他、実験条件の差にも関係があると考えられる。またH₃₇R_V株においてのみPAS 0.1 r/ccの併用が、阻止効果を見せなかつたが、のちに検査した本実験に用いたH₃₇R_V株のPAS感受性は正常であり、PASは3菌株を通じて同一製品を使用しているため、この差異はやはり菌株によつて薬剤に対する態度に若干の相違があるものと解釈されねばならない。

Brouetら²⁾は、臨床的にTHとINHの併用がINH耐性の出現を抑制すると報告しているが、私の行なつた試験管内実験では、TH 1 r/ccの併用によつてINH耐性の出現を抑制することはできなかつた。このことは生体内ではいろいろ複雑な因子、たとえば血中濃度、薬剤

の病巣内への透過量、薬剤と菌との接触の程度、あるいは耐性検査に用いられた菌が常に同じ病巣より得られたものであるか、などが関与しているので厳密な比較は困難といえる。

併用による薬剤耐性出現防止の機序についてはまだ明確な結論は得られていない。河盛¹⁶⁾は、2種薬剤の併用を行なつた場合、いずれか一方に対して耐性個体の出現をみても、他の薬剤の最小発育阻止濃度以下が、ある程度選択的に耐性個体のみを淘汰することによつて菌株の耐性化、ことに高度耐性化を防止していると説明できるとし、牛場¹⁷⁾も同様の見解を発表している。東村¹⁸⁾は、微量のPASが感性株、SM耐性株、INH耐性株いずれにも著明な発育遅延作用を現わし、このことがPASの耐性阻止作用と関連があるであろうと述べている。私は今回の実験から、TH単独の場合よりも他種抗結核剤と併用した場合にTH耐性の上昇が遅延することが多いことを確かめたが、これはあくまで上昇の遅延であつて、耐性出現を阻止することはできなかつた。菌と薬剤とが接触しているかぎり、如何なる併用法によつても耐性菌の出現を完全に阻止することは困難であり、臨床的に早期に菌陰転を招来せしめることがきわめて重要であることを示唆している。また一部には併用効果のみられない場合もあり、併用薬剤の選択には慎重な考慮を必要とすると考えられる。

Ristら¹⁾は、TH耐性菌が正常のカタラーゼ、ペルオキシダーゼ活性を保持していたと報告しているが、私の行なつた実験でもこれらの酵素活性は正常であり、INH耐性菌の場合と異なることを知りえた。

結 語

1) 結核菌のTH耐性獲得を、TH単独の場合と、他種抗結核剤の最小発育阻止濃度以下と併用した場合について比較し、次の結果を得た。

H₃₇R_V株、H₂株、吹田株とも、INH併用は耐性出現を遅延せしめる効果なく、SM, KM, SIはいずれの菌株についても併用効果を見とめ、PASはH₃₇R_V株では効果なく、H₂株、吹田株では併用効果も認めた。

2) H₃₇R_V株のINH耐性獲得に対し、THの併用は阻止効果を認めなかつた。

3) TH耐性H₃₇R_V株は、正常のカタラーゼ、ペルオキシダーゼ活性を保持していた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わり、御校閲いただいた恩師河盛勇造教授に心から感謝の意を表します。

本論文の一部の要旨は、日本結核病学会第36回総会において発表した。

文 献

- 1) Rist, N., Grumbach, F., and Liebermann, D.: Am. Rev. Tuberc., 79: 1, 1959.
- 2) Brouet, G., Marche, J., Rist, N., Chevallier, J., and LeMeur, G.: Am. Rev. Tuberc., 79: 6, 1959.
- 3) Tirunarayanan, M.O., and Vischer, W.A.: Am. Rev. Tuberc., 75: 62, 1957.
- 4) Steenken, W., Jr., and Montabline, V.: Am. Rev. Resp. Dis., 81: 761, 1960.
- 5) 多賀一郎・大山馨・木村隆徳: 結核, 36: 614, 昭36.
- 6) 堂野前維摩郷・伊藤文雄・青木隆一: 結核研究の進歩, 30: 90, 昭36.
- 7) 東村道雄・安保孝: 結核, 36: 361, 昭36.
- 8) Allan, G.W., Lees, A.W., and Roberts, G.B.S.: Brit. J. Dis. Chest, 55: 91, 1961.
- 9) Research Committee of the British Tuberculosis Association: Tubercle, 42: 269, 1961.
- 10) Schütz, I.: Dtsch. med. Wschr., 86: 133, 1961.
- 11) Hofmann, P., Nickel, L., und Junghans, G.: Tbk-arzt, 15: 18, 1961.
- 12) Eule, H., Bethège, W., und Werner, E.: Z. Tuberk., 118: 170, 1962.
- 13) 堂野前維摩郷: 日結研年次報告, 昭35.
- 14) 東村道雄: 結核, 36: 733, 昭36.
- 15) 堂野前維摩郷: 結核, 37: 349, 昭37.
- 16) 河盛勇造: 結核研究の進歩, 14: 23, 昭31.
- 17) 牛場大蔵・草間久子・氏家淳雄・伊藤周治: 医学と生物学, 43: 220, 昭32.
- 18) 東村道雄: 医学と生物学, 44: 3, 昭32.

Studies on the Development of Ethionamide Resistance and Its Inhibition in Tubercle Bacilli

It has been well known that ethionamide has no cross resistance to other antituberculosis drugs except thiosemicarbazone. And the drug shows remarkable effect, especially in the treatment of drug resistant cases of pulmonary tuberculosis.

The resistance to ethionamide of tubercle bacilli has been supposed to develop as in the case of other drugs. The author studied this problem using the original susceptible strains, H₃₇R_V and H₂, and streptomycin resistant Suita strain. The development of ethionamide resistance of each strain was tested by a step-by-step method every seventh day in Dubos liquid media with subinhibitory concentration of ethionamide. The patterns of resistance development in these cases were compared with those in the media containing ethionamide and other antituberculosis drugs, such as isoniazid, streptomycin, PAS, sulfaisoxazole and kanamycin. With H₂ and Suita strains, the development of ethionamide resistance was significantly retarded by the addition of 0.1 γ of PAS per ml, while with H₃₇R_V strain it was not effected by the same procedure.

The combined use of ethionamide with 10 γ of sulfaisoxazole per ml, 0.1 γ of streptomycin per ml and with 0.1 γ of kanamycin per ml was slightly

effective to retard it with all of these strains, while 0.005 γ of isoniazid per ml had no effect with any of them.

The inhibitory effect of ethionamide on the development of isoniazid resistance was also studied by the same method as described above. The addition of 1 γ of ethionamide per ml showed no retardation of the isoniazid resistance after six transfers in Dubos media.

The catalase and peroxidase activities were tested by the method of Dr. Tirunarayanan. H₃₇R_V and H₂ strains resistant to ethionamide at the concentrations of 10, 50, and 100 γ per ml showed the same enzymatic activities as in the original strains, whereas the isoniazid resistant strains revealed a marked loss of enzymatic activities.

In summary, the combined use of PAS with ethionamide presented a retarding effect on the emergence of ethionamide resistance as shown in the experiment, but the effect was somewhat different among the strains used. Streptomycin, kanamycin and sulfaisoxazole also showed some retarding effect, while isoniazid revealed none.

Ethionamide had no retarding effect on the emergence of isoniazid resistance of tubercle bacilli.

The ethionamide resistant strain reserved activities of catalase and peroxidase.