

Ethionamide の他種抗結核剤耐性結核菌に及ぼす影響および Ethionamide 耐性菌に及ぼす他種抗結核剤の影響

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

結核の化学療法にさいして、早期に菌陰転が起らないかぎり、耐性菌の出現はおそかれ早かれ不可避といわねばならない。しかしながら、一たん出現した耐性が、臨床的にもあるいは試験管内実験でも、しばしば減弱ないし消失することが認められている。私は他種抗結核剤耐性結核菌の Ethionamide に対する感受性、また Ethionamide 耐性結核菌の他種抗結核剤に対する感受性を菌株内の各耐性個体分布の変動の面から追及して、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験 1. 他種抗結核剤耐性菌株の耐性個体分布の変動に及ぼす Ethionamide の影響

実験材料および方法

- 使用培地 Dubos-Tween-Albumin 培地および 1% 小川培地を用いた。
- 使用菌株 化学療法実施中の肺結核患者の喀痰より分離された菌株のうち、次の 6 株を用いた。古杉株 (INH 100 r/cc 10% 部分耐性, SM 1 r/cc, PAS 1 r/cc には感受性)。山口株 (INH 50 r/cc 55% 部分耐性, SM 1 r/cc, PAS 1 r/cc にそれぞれ 20% 部分耐性)。藤田株 (SM 10 r/cc 15% 部分耐性, INH 0.2 r/cc, PAS 1 r/cc に感受性)。高岡株 (SM 100 r/cc 15% 部分耐性, INH 0.1 r/cc に 70% 部分耐性, PAS 1 r/cc に感受性)。野副株 (PAS 100 r/cc 40% 部分耐性, INH 0.2 r/cc に 50% 部分耐性, SM 1 r/cc に感受性)。高島株 (SM 100 r/cc に 1% 以下の部分耐性, INH 10 r/cc 5% 部分耐性, PAS 1 r/cc には感受性)。

上記の 6 菌株は、いずれも薬剤非含有 1 または 3% 小川培地上の集落を、1% 小川培地で 37°C、3 週間増菌後、発育した菌苔をとり、ガラス球入り丸コルペンにて手振り法により 1 mg/cc の菌液を作り、その 0.1 cc を Dubos 液体培地に接種し、37°C 1 週間培養の菌液を 10⁰

～10⁻⁵ 稀釈液とし、その 0.1 cc 宛を所定の濃度の薬剤を含有する 1% 小川培地に接種、4 週後に集落数を算定し、各濃度 2 本の培地の集落数の平均をもつて被検菌液 1 cc 中の菌数を求めた。またこれらの Dubos 培地培養の 0.1 cc 宛を、薬剤非含有および TH 0.5 r/cc 含有 Dubos 培地に接種し、以後 7 日ごとに同一薬剤濃度含有培地に継代 (前代培地の 0.1 cc を次代の培地に接種) し、4 代、8 代後に 1% 小川培地により、各菌株の耐性個体比率を検査した。高島株を除いて、いずれの菌株についても 10⁻⁴、10⁻⁵ 稀釈液について耐性個体比率を検査し、高島株のみは、10⁰～10⁻⁵ 稀釈液について、5 代、10 代後に同じ操作を行なった。

実験成績

INH 耐性の古杉株または山口株を、TH 0.5 r/cc 含有 Dubos 培地で継代した場合の成績は表 1 のごとくで、古杉株では 100 r/cc 耐性個体の比率が継代前 10% であつたものが、TH 0.5 r/cc 含有培地で 4 代継代後には約 1% に低下し、8 代後には 10⁻⁴ 稀釈液において 100 r/cc 耐性個体を検出できなかつた。一方、薬剤非含有培地で継代した場合には、100 r/cc 耐性個体の比率は 4 代後、8 代後ともおよそ 9% で、著しい変動は認められなかつた。山口株では、薬剤非含有培地に継代した場合にも耐性個体比率は著明に低下し、8 代後には、TH 0.5 r/cc 含有培地継代でも、薬剤非含有培地継代でも、10⁻⁴ 稀釈液中に 0.1 r/cc 以上の INH 耐性個体を検出しえなかつたが、4 代継代後に比較すると、TH 0.5 r/cc 含有培地継代のほうが、より強く影響を受けているように見受けられる。次に SM 耐性の藤田株、高岡株についての成績は表 2 に示すごとく、藤田株では 10 r/cc 耐性個体の比率が、高岡株では 100 r/cc 耐性個体の比率が、対照に比し明らかに低下した。PAS 耐性の野副株では、表 3 のごとく、4 代継代後には、対照との間に著しい差は認められなかつたが、8 代後には、高度耐性個体比率

Table 1. Effect of Ethionamide on the Isoniazid Resistant Population

Strains		Furusugi					Yamaguchi					
Transfer	Media	INH concentration γ /ml					INH concentration γ /ml					
	1% Ogawa's egg media Dubos liquid media	0	1	10	50	100	0	0.1	1	10	50	100
Before		19	17.5	16	14.5	2	18	18	14	C	10	(0)
4 th	Without drug	22.5	29	14	19	2	90	110	2.5	2.5	3	(0)
	With 0.5 γ /ml of TH	16	11.5	8	11.5	(1.5)	55	10	3	0.5	(0)	(0)
8 th	Without drug	94	83	81	50	8	44.5	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	With 0.5 γ /ml of TH	15.5	3.5	3	1	(0)	35.5	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Figures indicate the average number of colonies after inoculation of 0.1 ml of 1:10⁵ dilution.
 Figures in () indicate the average number of colonies after inoculation of 1:10⁴ dilution.
 C indicates contamination.

Table 2. Effect of Ethionamide on the Streptomycin Resistant Population

strains		Fujita					Takaoka				
Trasfer	Media	SM concentration γ /ml					SM concentration γ /ml				
	1% Ogawa's egg media Dubos liquid media	0	1	10	50	100	0	1	10	50	100
Before		78	81	12.5	(0)	(0)	56.5	49	28	16	8.5
4 th	Without drug	33	28.5	13	(0)	(0)	100	100	74.5	23	16
	With 0.5 γ /ml of TH	14	5	(2)	(0)	(0)	5	3	1.5	0.5	(0)
8 th	Without drug	68	100.5	23.5	(0)	(0)	47.5	60	31	17.5	4
	With 0.5 γ /ml of TH	30.5	38.5	(2.5)	(0)	(0)	30	7	4	1.5	(3)

Figures indicate the average number of colonies after inoculation of 0.1 ml of 1:10⁵ dilution.
 Figures in () indicate the average number of colonies after inoculation of 1:10⁴ dilution.

Table 3. Effect of Ethionamide on the PAS Resistant Population

Strain		Nozoe				
Transfer	Media	PAs concentration γ /ml				
	1% Ogawa's egg media Dubos' liquid media	0	1	10	50	100
Before		132	120	119	138	58
4 th	Without drug	21	12.5	13	C	11
	With 0.5 γ /ml of TH	17	8.5	9	7.5	6
8 th	Without drug	14.5	17	19	9.5	5
	With 0.5 γ /ml of TH	44.5	33	42	6	7

Figures indicate the average number of colonies after inoculation of 0.1 ml of 1:10⁵ dilution.
 C indicates contamination.

の明らかな低下が認められた。また SM, INH 2者に耐性を示す高島株では、この菌株では SM に関しては5代、10代後に、INH に関しては10代後のみ、耐性個体比率を検査したが、表4のごとく、対照においても明らかな耐性個体比率の低下がみられ、とくに TH 0.5 γ /cc 含有培地継代の影響を認めえなかつた。

実験 2. Ethionamide 耐性結核菌株の耐性個体分布の変動に及ぼす他種抗結核剤の影響

実験材料および方法

a) 使用培地：前実験と同じく Dubos-Tween-Albumin 培地および1%小川培地を用いた。

b) 使用菌株：試験管内で増量継代法により TH 100 γ /cc 耐性となつた H₃₇R_v 株を用いた。

この菌株の薬剤非含有1%小川培地上の集落を、患者分離株について行なつたと同様に、1%小川培地、Dubos 液体培地で各1代増菌後、Dubos 培地培養の 10⁻⁴、10⁻⁵ 稀釈液 0.1 cc 宛を所定の濃度に TH を含む1%小川培地に接種し、継代前の耐性個体比率を検査した。また同じ Dubos 培地培養の 0.1 cc 宛を、薬剤非含有および INH 0.01 γ /cc, SM 0.5 γ /cc, PAS 0.1 γ /cc, KM 0.5 γ /cc, PZA 250 γ /cc, CS 2.5 γ /cc をおのおの含有する Dubos 培地に接種して、以後7日ごとに継代、4代、8代後に1%小川培地によりおのおの耐性個体比率を

検査した。また同じ Dubos 培地培養の 0.1 cc 宛を、薬剤非含有および INH 0.01 γ /cc, SM 0.5 γ /cc, PAS 0.1 γ /cc, KM 0.5 γ /cc, PZA 250 γ /cc, CS 2.5 γ /cc をおのおの含有する Dubos 培地に接種して、以後7日ごとに継代、4代、8代後に1%小川培地によりおのおの耐性個体比率を

Table 4. Effect of Ethionamide on the Double Resistant Population to Streptomycin and Isoniazid

Strain		Takashima									
Transfer	Media	SM concentration γ/ml					INH concentration γ/ml				
	1% Ogawa's egg media	0	1	10	50	100	0	0.1	1	10	100
	Dubos' liquid media	0	1	10	50	100	0	0.1	1	10	100
Before		50×10^5	20×10^5	10×10^5	18×10^3	13×10^3	31.5×10^5	19.5×10^5	17.5×10^5	1.5×10^5	0
5 th	Without drug	22×10^5	1×10^5	2×10	0	0					
	With 0.5 γ/ml of TH	16×10^5	1×10^5	1×10	1×10	0					
10 th	Without drug	10×10^5	5×10^5	1×10	0	0	11×10^5	29×10	0	0	0
	With 0.5 γ/ml of TH	9×10^5	7×10^5	0	0	0	10.5×10^5	0	0	0	0

Figures indicate the average number of viable unit in 1 ml of Dubos' media tested. 0 indicates no growth after inoculation of 0.1 ml of Dubos' media tested.

Table 5. Effects of Various Antituberculosis Drugs on the Ethionamide Resistant Population

Strain		H37Rv resistant to ethionamide					
Transfer	Media	TH concentration γ/ml					
	1% Ogawa's egg media	0	1	5	10	50	100
	Dubos' liquid media	0	1	5	10	50	100
Before		14.5	16.5	7.5	8	9.5	8
4 th	Without drug	17	19	16	12	12	13
	INH 0.01 γ/ml	18	15	13	17	11	16
	SM 0.5 γ/ml	60	44.5	37	33	41	41
	PAS 0.1 γ/ml	69	68	68	64.5	72	60
	KM 0.5 γ/ml	12	13	C	6	8	5
	PZA 250 γ/ml	29	31	29	33	31	33
	CS 2.5 γ/ml	22	23	21	23	C	19.5
8 th	Without drug	13	14	C	9.5	6	8
	INH 0.01 γ/ml	16	16	12	10	15	6
	SM 0.5 γ/ml	44	37	20	27.5	45.5	30.5
	PAS 0.1 γ/ml	12	9	10	C	15	12
	KM 0.5 γ/ml	18	18	15.5	17	15	16.5
	PZA 250 γ/ml	40	34.5	41	31	29	20
	CS 2.5 γ/ml	13	C	11	8	9	6

Figures indicate the average number of colonies after inoculation of 0.1 ml of $1:10^5$ dilution. C indicates contamination.

Table 6. Effects of Various Antituberculosis Drugs on the Ethionamide Resistant Population

Strain		The mixed strain composed of TH resistant variant and original susceptible strain of H37Rv in a ratio of 3 to 7					
Transfer	Media	TH concentration γ/ml					
	1% Ogawa's egg media	0	1	5	10	50	100
	Dubos' liquid media	0	1	5	10	50	100
Before		46.5	34	38.5	6	10.5	4.5
4 th	Without drug	12	11	1.5	2	(0)	(0)
	INH 0.01 γ/ml	17	25	7	2.5	(0)	(0)
	SM 0.5 γ/ml	16.5	C	3	(21)	(0)	(0)
	PAS 0.1 γ/ml	13.5	9.5	3.5	0.5	(0)	(0)
	KM 0.5 γ/ml	35	22	10.5	3	(0)	(0)
	PZA 250 γ/ml	33	30	15	18.5	(0)	(0)
	CS 2.5 γ/ml	14.5	2.5	3.5	(36.5)	(0)	(0)

Figures indicate the average number of colonies after inoculation of 0.1 ml of $1:10^5$ dilution. Figures in () indicate the average number of colonies after inoculation of $1:10^4$ dilution. C indicates contamination.

検査した。

実験成績

成績は表5のごとく、いずれの抗結核剤含有培地継代でも、TH 耐性個体比率に明らかな影響を認めえなかつた。

実験 3. TH 耐性菌と感受性菌を混合した菌群についての実験

前実験に用いた TH 耐性 H₃₇R_V 株は、増量継代法により得られたものであるため、菌株中に感受性個体の含まれる率はほとんどないと考えられる。そのために他種抗結核剤の影響が現われがたかつたのではないかと考えたので、本実験を計画した。

実験方法

前実験に用いた TH 耐性 H₃₇R_V 株と、H₃₇R_V 原株との Dubos 培地に発育 14 日目の菌液を、3 対 7 の割合に混合して菌液を作り、これについて前実験と同様の操作を行なつた。

実験成績

結果は表6のごとく、継代前の TH 100 γ/cc 耐性個体の比率は約 10% であつたが、4 代後には、薬剤非含有培地においても、他種抗結核剤含有培地においても、 10^{-4} 稀釈液中に 50 γ/cc 、100 γ/cc に発育する個体を検出できず、両者の間に差を認めることはできなかつた。

総括ならびに考案

薬剤耐性結核菌が、他種抗結核剤の使用によつて、耐性の減弱ないし消失を来たすことは知られている^{1)~4)}。しかし一方では他種抗結核剤の使用が、耐性の減弱を来たさなかつたという報告もある^{5)~7)}。この成績の不一致の原因について、越智⁴⁾は実験に供された菌株の最初の耐性菌比率が関係し、完全耐性も

しくはそれに近い菌株を使用した実験では耐性の減弱が認められず、比較的低い耐性菌比率を示す部分耐性株を用いた実験では著明に耐性の減弱が認められると述べている。そしてこの現象は、耐性菌が感受性菌よりも著明に他種抗結核剤の発育抑制作用を受けるため、耐性菌と感受性菌との間に増殖速度の差が生じることに原因があるとし、河盛⁹⁾が示唆したごとく耐性菌の Hypersusceptibility と解釈できると考えている。同様の事実は牛場⁹⁾¹⁰⁾、Pansy¹¹⁾、Perry¹²⁾、Szybalski¹³⁾、漆崎¹⁴⁾らも認めている。

TH に関しては Rist ら¹⁵⁾は INH 耐性菌の TH に対する感受性亢進を認め、戸田¹⁶⁾は KM 耐性菌の TH に対する感受性がやや亢進しているのを認め、Lucchesi ら¹⁷⁾は INH 耐性菌のほうが感受性菌よりも TH によって形態的な変化を受けやすいことを認めている。臨床的にも大藤¹⁸⁾は、INH 耐性菌群の菌陰転率が、感受性菌群のそれよりも良いことを認め、SM、PAS、INH 耐性のすべての耐性度が、TH 投与によって低下することを認め、Eule ら¹⁹⁾も TH 投与により SM 耐性が感性に復帰した 2 例を認めている。しかし西川²⁰⁾、堂野前²¹⁾、北本²²⁾は耐性菌と感受性菌とで TH に対する感受性は変わらないといい、山崎²³⁾、篠原²⁴⁾は、菌陰転率と INH・SM・PAS 各耐性度との間に関係はみられなかつたと報告している。私は患者喀痰より分離した INH・SM または PAS 耐性菌の、TH に対する感受性を耐性菌比率の変動の面から検討して、これらの菌株中の耐性菌比率、ことに高度耐性菌比率が、TH の影響により、明らかに低下するのを確かめることができた。このことはこれらの菌株中の高度耐性菌が、感受性菌に比して TH の発育抑制作用をわずかながら強く受けるためであり、発育阻止濃度を目標として検査した場合にはほとんど差が現われない程度のものであろうと解釈することができる。

結核菌の TH 耐性の安定性については、堂野前²⁵⁾は、試験管内で得られた耐性も、臨床的に獲得された耐性も安定であるといい、岡²⁶⁾、東村²⁷⁾も同様の成績を報告しているが、山田²⁸⁾は、感性復帰を認めたといい、相反する成績がみられる。私は試験管内で増量継代法により得た TH 100 r/cc 耐性 H₃₇R_V 株を用い、他種抗結核剤の最小発育阻止濃度以下を含有する Dubos 液体培地に継代した場合の耐性菌比率の変動を観察したが、いずれの薬剤によっても耐性菌比率の低下は認められなかつた。次に TH 耐性株と、H₃₇R_V 原株とを混合した菌群について同じ実験を試みたところ、薬剤非含有培地継代においても耐性の減弱が認められ、とくに他種抗結核剤の影響を明らかにすることができなかつた。このことは試験管内で分離された INH 耐性株は継代によって耐性の低下がみられないが、耐性株と感受性株の混合

菌群では継代によつて耐性菌比率の低下が起こるといふ佐藤²⁹⁾³⁰⁾の成績と相似し、TH 耐性菌といえども、菌株中に感受性菌の占める割合が大きければ、継代によつて耐性の低下を起こしうることを示唆している。患者分離株については、適当な菌株が得られず検討できなかつたが、以上の実験成績から部分耐性株であれば、TH 耐性の減弱ないし消失が起こりうることを推測できると思う。著者は前報告³¹⁾において、TH 耐性獲得におよぼす他種抗結核剤の影響に、菌株差のあることを述べたが、おそらくこれは各菌株中の薬剤感受性を異にする菌の比率に、著しく差のあることに由来すると考えられ、今後この種の耐性阻止効果に関する実験には、本論文に用いたような耐性菌比率の追及が適した観察方法と思われる。

結 語

- 1) INH・SM または PAS 耐性株を最小発育阻止濃度以下の TH を含有する培地に継代し、4代、8代継代後の耐性菌比率の変動を観察し、耐性菌が感受性菌より、より強く TH の影響を受けることを認めた。
- 2) TH 耐性 H₃₇R_V 株を、他種抗結核剤の最小発育阻止濃度以下を含む培地に継代し、4代、8代後に耐性菌比率の変動を観察したが、明らかな影響を認めえなかつた。
- 3) TH 耐性株と、感受性株との混合菌群では、4代継代後に薬剤非含有培地継代でも、耐性の低下が認められ、とくに他種抗結核剤の影響を認めえなかつた。

稿を終るにのぞみ、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。

本論本要旨は、第 5 回日本化学療法学会西日本支部総会において発表した。

文 献

- 1) 小川辰次：結核，28：568，昭28。
- 2) 筑山明：医学研究，25：178，昭30。
- 3) 栗村武敏：日本化学療法学会雑誌，4：352，昭31。
- 4) 越智規夫：大阪大学医学雑誌，11：1053，昭34。
- 5) Kimino, T.: J. Antibiotics, Ser. B., 7: 122, 1954.
- 6) 中院孝円他：結核，28：696，昭28。
- 7) 大藤真・景山統二郎：綜合臨牀，7：89，昭33。
- 8) 河盛勇造：結核研究の進歩，14：23，昭31。
- 9) 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。
- 10) 牛場大蔵・橋本一男・徐毓芝・秋山武久・大野シヅ子・深沢俊夫：医学と生物学，44：46，昭32。

- 11) Pansy, F., Stander, H. and Donovick, R.: Am. Rev. Tuberc., 65: 761, 1952.
- 12) Perry, C.R., and Morse, W.C.: Am. Rev. Tuberc., 72: 840, 1955.
- 13) Szybalski, W. and Bryson, V.: Am. Rev. Tuberc., 69: 267, 1954.
- 14) 漆崎一朗・小川政敏: 胸部疾患, 5: 218, 昭36.
- 15) Rist, N., Grumbach, F. and Liebermann, D.: Am. Rev. Tuberc., 79: 1, 1959.
- 16) 戸田忠雄・久恒和仁・萩原義郷・渡辺京子: 日胸, 19: 590, 昭35.
- 17) Lucchesi, M., Maggini, P. and Termine, A.: Am. Ist "C. Forlanini", 20: 93, 1960. (結核文獻の抄録速報, 12: 503, 昭36より引用)
- 18) 大藤真・田村甫・宇治鉄也・沼田尹典・中谷照: 結核, 36: 619, 昭36.
- 19) Eule, H., Bethege, W. und Werner, E.: Z. Tuberk., 118: 170, 1962.
- 20) 西川元通・豊原希一: 胸部疾患, 5: 224, 昭36.
- 21) 堂野前維摩郷他: 日本医事新報, 1897: 9, 昭35.
- 22) 北本治他: 日胸, 19: 758, 昭35.
- 23) 山崎昭他: 胸部疾患, 6: 1119, 昭37.
- 24) 篠原研三: 胸部疾患, 5: 838, 昭36.
- 25) 堂野前維摩郷: 結核, 37: 349, 昭37.
- 26) 岡捨己他: 結核, 37: 500, 昭37.
- 27) 東村道雄・安保孝・河西栄文: 結核, 37: 527, 昭37.
- 28) 山田豊治他: 結核, 37: 529, 昭37.
- 29) 佐藤直行: 医学と生物学, 31: 250, 昭29.
- 30) 佐藤直行: 結核, 30: 119, 昭30.
- 31) 土持隆彦: 結核, 投稿中.

Studies on Effects of Ethionamide on Tubercle Bacilli Resistant to Several Antituberculosis Drugs as well as of the Latter Drugs on the Ethionamide Resistant Tubercle Bacilli.

The effect of ethionamide on the tubercle bacilli resistant to major antituberculosis drugs and of the other drugs on the ethionamide resistant bacilli were examined by following changes of the rates of resistant populations in the strains.

Six strains were used which had been isolated from the patients administered with antituberculosis drugs previously. Those strains were proved as partially resistant to one or more of isoniazid, streptomycin and PAS. Also the ethionamide resistant variant of H₃₇R_V strain was used which had been obtained by serial cultivations in liquid media containing ethionamide.

Dubos' media without and with 0.5 γ of ethionamide per ml or other antituberculosis drugs in the subinhibitory concentrations were inoculated with these strains and incubated at 37°C for a week. Before and after four to ten transfers every seventh day, the rates of drug resistant populations of each strain were examined by the cultivation on Ogawa's egg media containing different concentrations of the appropriate drugs.

The effect of ethionamide on population of the strains resistant to other antituberculosis drugs was as follows:

1) The rates of the high grade drug resistant individuals in the isoniazid resistant strains evidently decreased after the 4th and the 8th transfers in liquid media containing 0.5 γ of ethionamide per ml.

2) The difference between decreases of the streptomycin resistant populations by the transfers in media containing no drug and of those containing ethionamide was significant.

3) The same result as above was obtained with PAS resistant strains.

4) With the double resistant strain to streptomycin and isoniazid, the decrease of resistant population was detected at the same rate after the transfers both in media with and without ethionamide.

The effects of antituberculosis drugs on ethionamide resistant strain were as follows:

1) The rate of bacterial population of the ethionamide resistant strain was unchanged even after eight transfers in media containing no drug and containing the appropriate drugs at concentrations of 0.01 γ of isoniazid per ml, of 0.5 γ of streptomycin per ml, of 0.1 γ of PAS per ml, of 0.5 γ of kanamycin per ml, of 250 γ of pyrazinamide per ml and of 2.5 γ of cycloserine per ml.

2) With the mixed strain which was composed of ethionamide resistant variant and original sensitive strain of H₃₇R_V in a ratio of three to seven, the complete loss of the populations resistant to 50 γ /ml and 100 γ /ml of ethionamide was observed

after four transfers even in the media without drugs.

In summary, the populations resistant to isoniazid, streptomycin or PAS in the strains of tubercle bacilli were more susceptible to ethionamide than

the sensitive ones.

The difference of susceptibility to the above various antituberculosis drugs was not significant between the ethionamide resistant and the ethionamide sensitive populations.