

Kanamycin 耐性菌に対する Viomycin および Capreomycin の抗菌力

KM と VM, CPM の交叉耐性に関する研究

大里 敏雄・清水 久子

結核予防会結核研究所

受付 昭和 41 年 4 月 1 日

THE ANTI-TUBERCULOUS ACTIVITY (IN VITRO) OF VIOMYCIN AND CAPREOMYCIN FOR KANAMYCIN RESISTANT STRAINS ISOLATED FROM THE TUBERCULOUS PATIENTS*

Study of Cross Resistance of Kanamycin
for Viomycin and Capreomycin

Toshio OHSATO and Hisako SHIMIZU

(Received for publication April 1, 1966)

The in vitro activity of Viomycin and Capreomycin for twenty-two Kanamycin-resistant strains isolated from the tuberculous patients was studied in Kirchner semi-solid agar media containing horse serum in 10 per cent. The drug concentrations were 5 mcg, 10 mcg and 100 mcg of each drug.

The bacillary strains for examination were obtained from the first or second generation of the control culture on 1 per cent Ogawa media used for Kanamycin-resistance test. The bacillary suspension of 1 mg per ml (wet weight) was made from above mentioned culture by grinding the harvested colonies in a grinding flask. Inoculation was performed by two graded bacillary dose, 0.1 mg and 0.001 mg, into two media of each drug concentration. (Forty media, including control ones, were used for the test of one strain). The reading of bacillary growth was performed at three weeks after inoculation.

The results are as follows.

The bacillary growth in each medium is shown in Table 1.

The antimicrobial activities of Viomycin and Capreomycin for Kanamycin resistant strains are shown in Table 2. The table shows summarized results about the Susceptibility to Viomycin and Capreomycin of twenty-two strains with Kanamycin resistance.

The criteria for resistance of each drug are decided from our result about the minimal inhibitory concentration for wild strains. The criteria are as followings :

Viomycin Resistant ; 10 mcg complete or more.

Decreased susceptibility ; 10 mcg incomplete.

Susceptible ; other than above criteria.

Capreomycin Resistant ; 10 mcg complete or more.

Decreased susceptibility ; 10 mcg incomplete and 5 mcg complete.

Susceptible ; other than above criteria.

According to these criteria, the complete resistant strains for 100 mcg of Kanamycin showed normal susceptibility for Viomycin in 50 per cent. The strains which demonstrated under 100 mcg incomplete resistance for Kanamycin showed normal susceptibility for Viomycin in 10 of

* From Research Institute for Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatamagun, Tokyo, Japan.

12 strains. Four strains which showed low Kanamycin resistance below 10 mcg incomplete had normal susceptibility for Viomycin. On the other hand, the strains which showed over 10 mcg incomplete resistance for Kanamycin were susceptible to Capreomycin only in 2 of 18 strains.

Table 3 shows the relation of the Kanamycin resistance between 1 per cent Ogawa media and Kirchner semi-solid agar media. The closed correlation was observed in resistance degree of Kanamycin between Ogawa and Kirchner semi-solid agar media.

From these results, Viomycin may be used for many patients with Kanamycin resistant bacilli, but Capreomycin may not be used for these patients. Whether Viomycin may be effective for Kanamycin resistant patient will be known from the result of Kanamycin resistance test.

緒 言

二次抗結核薬による治療はまず KM を中心とし、これに TH, CS を併用する方法が最も一般化しつつあるように思われるが、これらの薬剤による治療に失敗した例にさらに菌の陰性化をはかろうとするならば、VM および近い将来に使用可能となると思われる Ethanbutol (EB) を主体とした治療に期待することになるであろう。しかし、このさいの治療に当たっては KM と VM の交叉耐性の存在の如何が大きな問題になることが考えられる。また最も新しい抗結核薬の一つである Capreomycin (CPM) も KM と交叉耐性を有することが報告されている¹⁾。したがって、結核の治療方針を考える立場からすれば、これら薬剤の交叉耐性をどの程度に評価する必要があるかという問題を明らかにしておかなければならないものとする。そこで、患者より分離した KM 耐性菌に対する VM および CPM の試験管内抗菌力を測定し、KM 耐性の程度とこれら 2 剤の抗菌力の関係から KM 耐性患者に対する VM, CPM の使用の可能性があるかどうかを検討した。

実験方法

使用菌株：間接法による KM 耐性検査によつて KM 10 mcg (100 mcg 含有) 1% 小川培地に菌の発育を認めた患者菌株 22 株である。本実験には、耐性検査時の対照培地上に発育した菌集落、あるいはこれより 1% 小川培地に継代した菌集落を用いた。

使用培地：KM, VM, CPM が、それぞれ 5 mcg/ml, 10 mcg/ml, 100 mcg/ml に含まれる、キルヒナー半流動寒天培地 (10% 馬血清含有) を用いて、各薬剤の抗菌力を測定した。

菌接種：摩砕コルベンによつて 1 mg/ml (湿菌量) の菌液を作製し、これより 0.1 mg および 0.001 mg の 2 段階の菌を各薬剤濃度に 2 本ずつ、すなわち、1 株につき対照も含めて 40 本の培地に接種した。菌の発育状況

は、接種 3 週後に観察した。

成 績

各薬剤含有培地における KM 耐性患者株、22 株の菌発育状態は表 1 に示したごとくである。この成績から 22 株の KM 耐性の分布をみると、100 mcg 完全耐性 10 株、100 mcg 不完全耐性 6 株、10 mcg 完全耐性 2 株、10 mcg 不完全耐性以下の耐性 4 株である。

これら KM に耐性、あるいは感性の低下を示した患者菌株に対する VM, CPM の抗菌力を評価するに当たっては、VM, CPM の耐性、感性低下、あるいは感性の基準を規定しておかなければならないが、このための参考として、Wild Strain に対する VM, CPM の最小発育阻止濃度をみると次のようであつた²⁾。(今回と同じくキルヒナー半流動寒天培地を用いた成績である)

KM	2.5~5 mcg/ml
VM	7.5~10 mcg/ml
CPM	5~7.5 mcg/ml

すなわち、この Wild Strain に対する M.I.C. からみて、KM 5 mcg に、VM 10 mcg に、CPM 5 mcg にかなり多量の菌発育を認めた場合は明らかに感性の低下があると考えられる。そこで、耐性、感性低下、感性の判定基準を次のように規定した。

KM	耐性：10 mcg 完全耐性以上
	感性低下：10 mcg 不完全耐性 5 mcg 完全および不完全耐性
	感性：上記基準に達しないもの
VM	耐性：10 mcg 完全耐性以上
	感性低下：10 mcg 不完全耐性
	感性：上記基準に達しないもの
CPM	耐性：10 mcg 完全耐性以上
	感性低下：10 mcg 不完全耐性 5 mcg 完全耐性
	感性：上記基準に達しないもの

このような基準によつて 22 株の KM 耐性の程度と

Table 1. Drug Activity of Viomycin and Capreomycin for Kanamycin Resistant Strain (3 weeks)

Strain	C*	10 ⁻¹ mg inoculation									C	10 ⁻³ mg inoculation											
		KM (mcg)			VM (mcg)			CPM (mcg)				KM			VM			CPM					
		5	10	100	5	10	100	5	10	100		5	10	100	5	10	100	5	10	100			
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	≡	≡	-	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+ ₈	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	≡	≡	-	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	≡	≡	-	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	≡	≡	-	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	≡	≡	-	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
■	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	≡	≡	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<c	-
■	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	≡	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	≡	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	≡	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	≡	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
■	≡	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Notes: C*=Control

Drug concentration is shown mcg/ml.

Bacillary growths are shown as following scales:

- + : The number of colonies is approximately countable. The number is generally up to 50.
- ≡ : The numerous colonies to be counted are seen in the medium. The individual colonies are distinctively observed.
- ≡ : The marked turbidity is observed without formation of bacterial pellicle.
- ≡ : The bacterial pellicle is observed on the surface of the medium.

Table 2. Susceptibility or Resistance of Kanamycin-Resistant Strains of Various Grade to Viomycin and Capreomycin (10⁻¹ mg Inoculation)

Degree of KM resistance	No. of strain	Viomycin				Capreomycin			
		Non-susceptible		Suscep-tible	Non-susceptible		Suscep-tible		
		Resist-ant	De-creased		Resist-ant	De-creased			
100 mcg complete	10	1	4	5	8	2	1		
100 mcg incomplete	6		1	5	2	3	1		
10 mcg complete	2		1	1		1	1		
Lower than 10 mcg incomplete	4			4			4		

* Decreased: Decreased susceptibility.

VM, CPM の耐性, 感性低下, 感性との関係を見ると, 次の表2のごとくである。表でみるように VM 耐性1株, 感性低下6株, 感性株は15株であるが, さらにこれを KM の耐性の状態によつて分けると KM 100 mcg 完全耐性株では10株中5株は VM に感性を示し, KM 100 mcg 不完全耐性株は6株中5株は VM 感性であり, 10 mcg 不完全耐性以下の株では4株とも VM 感性であつた。すなわち KM の耐性の程度によつて VM に対する感性が異なり, KM 100 mcg 不完全耐性以下の株では12株中10株は VM に感性であつた。

これに対し CPM では感性株は22株中6株にすぎず, このうちの4株は KM 10 mcg 不完全耐性以下の株であつた。

以上はキルヒナー半流動寒天培地を用いた成績であるが, 通常の耐性検査は1%小川培地を用いて行なわれる

Table 3. Comparison of Kanamycin Resistance examined in 1% Ogawa Media with That in Kirchner Semi-solid Agar Media

Kirchner semi-solid agar media	1% Ogawa media			
	100 mcg complete	100 mcg incomplete	10 mcg complete	10 mcg incomplete
100 mcg complete	8	2		
100 mcg incomplete	2	4		
10 mcg complete			2	
10 mcg incomplete		1		1
5 mcg complete				
5 mcg incomplete				2
Susceptible				1*

Notes: Double line indicates clinical resistance in Japan.

- * This strain is excluded from Table 1 and 2. Drug concentrations in 1% Ogawa media are assumed concentration after insupissation. (10 mcg media contain 100 mcg and 100 mcg media contain 1,000 mcg)

ことが多いので、1% 小川培地における KM の耐性とキルヒナー半流動寒天培地における KM の耐性成績を比較してみた。その成績は表3に示したが、両培地における耐性の程度はほぼ平行し、1% 小川培地において耐性とされた19株のうち18株はキルヒナー半流動寒天培地においてもほぼ同様の KM 耐性を示した。

以上の成績を総合すると、VM, CPM の効果をのぞみうるかどうかは、1% 小川培地による KM 耐性検査の成績からある程度推定できるものと考えられる。すなわち KM 100 mcg 不完全耐性以下の株では VM に感性を示すことが多く、10 mcg 不完全耐性以下の株では CPM も感性と考えてよいであろう。

考 案

KM, VM, CPM の3剤の間の交叉耐性については小関ら¹⁾の研究があり、これら3剤の間には相互に交叉耐性(明瞭な感性低下を含め)が認められている。しかし、実験に用いられた菌株は、各薬剤の500~1,000 mcg に耐性を生ぜしめた H₉₇Rv, M. phlei であり、この高度耐性菌の成績から KM 耐性株はすべて VM, CPM が無効であると断定することはできない。

実際に患者の喀出する KM 耐性菌の耐性の程度は種々であり、実験に用いられたような一定の高い耐性度を示すとは限らないからである。

KM, TH, CS など、二次抗結核薬中上位にランクされる薬剤による治療に失敗した場合に菌の陰性化を望むとすれば、近い将来に使用可能と思われる EB に、VM,

CPM, PZA などの残された薬剤を併用した治療を行なうことになるものと考えられる。したがって、KM 耐性例に対する VM, CPM の効果がどの程度期待できるかという点を検討しておく必要がある。今回の KM 耐性患者株を用いた実験では、KM 100 mcg 完全耐性株の10株中5株、これ以下の耐性株では12株中10株は VM に対して、感性の低下が全く認められなかつた。

さらに医療基準による VM 耐性—10 mcg 完全耐性以上の株は22株中1株であつた。以上の成績からみて、KM 耐性株の少なくとも半数以上に VM の効果を期待できるものと思われる。

しかし、KM 耐性菌を排出している患者に VM を使用する場合、临床上2つの問題がありそうに思われる。その第1は VM の耐性検査法の問題である。KM 耐性例に実際に VM を投与する場合、個々の例について VM 耐性検査を実施して VM の効果を期待できるかどうかを検討する必要があるが、このさいの VM 耐性検査の精度が問題になる。キルヒナー半流動寒天培地を用いた場合には VM の力価の低下はなく、ほぼ正確な成績が得られるであろうが、広く一般的に用いることは困難な点が多い。したがって、1% 小川培地を用いて検査を実施することになることが多いと思われるが、現行の結核菌検査指針³⁾によると、1% 小川培地を用いる VM 耐性検査は10 mcg (12.5 mcg 含有) と100 mcg (125 mcg 含有) の2段階の濃度について実施することになっている。しかし、VM の活性は1% 小川培地内で約1/10に低下するので²⁾、12.5 mcg 含有培地は1.25 mcg 程度の力価に減弱することになる。この濃度では、ほとんどすべての Wild Strain が発育しうるわけであり、临床上の耐性検査として意味をもつものは100 mcg (125 mcg 含有) 培地における成績のみである。VM 感性株は100 mcg 培地に発育を示すことはないが、この培地に発育を認めない場合でも、感性の低下あるいは耐性が無いと判断することはできないわけである。

第2の問題は、KM 耐性で VM 感性の患者に VM を投与した場合、KM 感性あるいは、KM 未使用の場合に比べて VM の治療効果が劣るとか、VM 耐性菌が早期に出現するということがないかどうかという疑問である。現在のところこの点は明らかでなく、実際に多数の例について今後慎重に検討を行なわねばならないものと考えられる。

つぎに、KM と CPM の交叉耐性についてであるが、今回の成績からみると、KM 耐性株の多くは CPM にも感性低下あるいは耐性がみられたことから考えると、KM 治療後の CPM 投与の効果はほとんど期待することができないものと思われる。したがって、KM と CPM はいずれかの一つを使用する二者択一を必要とするであろう。KM と CPM のいずれを用いるかは、治療効果、

副作用、薬剤のコストなど種々の観点から改めて検討を要する問題であろう。堂野前ら⁴⁾は、CPMはSMと同程度の効果を示し、副作用はSMに比べて低率かつ軽微であると報告しており、将来KMに代わって使用される可能性もあるものと考えられる。

今後KM耐性例にVMを投与する機会が多くなるであろうが、このさい事前にVMの耐性の有無を検討する必要がある、耐性あるいは感性低下のある例にはVMの治療を断念することにならう。したがって、VMの耐性検査は、今後臨床的にもかなり重大な検査の一つとなるものと考えられる。しかし、1%小川培地を用いる場合の現行VM耐性検査法はその薬剤濃度段階に問題があり、速やかに改正する必要があるものと思われる。

結 論

KM 10 mcg (100 mcg 含有) 1%小川培地に菌の発育を認めた患者株22株に対するKM, VMおよびCPMの抗菌力を、血清加キルヒナー半流動寒天培地を用いて測定し、KM耐性菌に対するVM, CPMの交叉耐性の状態を検討した。その結果次のごとき結論を得た。

1) VM: KM 100 mcg 完全耐性株の半数はVMに対して全く感性の低下が認められず、KM 100 mcg 不完

全耐性低下の株では12株中10株はVMに全く感性であり、KM 10 mcg 不完全耐性以下の株は4株ともVMに感性であつた。

2) CPM: KM 10 mcg 完全耐性以上の株は、18株中16株にCPMの感性低下、あるいは耐性が認められた。しかし、KM 10 mcg 不完全耐性以下の4株はCPMに全く感性を示した。

3) 1%小川培地におけるKM耐性の程度とキルヒナー半流動寒天培地における耐性はほとんど平行し、小川培地におけるKM耐性の状態からVM, CPMの使用の可能性を推定できるものと考えられる。

稿を終わるに当たり御校閲いただいた岩崎竜郎所長に深謝いたします。

文 献

- 1) 小関勇一 他: Jap. J. Med. Science & Biology, 16: 31, 1963.
- 2) 大里敏雄: 第40回結核病学会報告, 結核, 40: 570, 1965.
- 3) 結核菌検査指針: 18, 1964.
- 4) 堂野前維摩郷 他: 最新医学, 21: 164, 1966.