

人型結核菌の Capreomycin 耐性, Kanamycin 耐性, Viomycin 耐性および Streptomycin 耐性間の関係

東村道雄・外山春雄・水野松司

国立療養所中部病院(院長勝沼六郎博士)

東村純雄

名古屋大学医学部細菌学教室(主任小笠原一夫教授)

受付 昭和 42 年 5 月 10 日

CROSS RESISTANCE RELATIONSHIP AMONG CAPREOMYCIN, KANAMYCIN, VIOMYCIN AND STREPTOMYCIN RESISTANCES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Michio TSUKAMURA, Haruo TOYAMA, Shoji MIZUNO
and Sumio TSUKAMURA

(Received for publication May 10, 1967)

Since Tsukamura and his associates^{1)~4)} and Steenken et al.⁵⁾ stated on the partial cross resistance relationship between streptomycin, kanamycin and viomycin, a few one way-cross resistances were found in tubercle bacilli (high ethionamide resistance produces amithiozone resistance^{6)~9)} and high PAS resistance produces amithiozine resistance¹⁰⁾).

Recent introduction of a new antituberculous agent, capreomycin, caused again a great interest of many investigators to the cross resistance problem. However, the results obtained by a number of workers on the cross resistance relationship between capreomycin, kanamycin and viomycin were discrepancies.

The present authors consider, as the origin of discrepancies, the following: (1) Strain; (i) the workers who wish to study on the cross resistance should use purified strains, derived from a single colony, and should not use strains that can be a mixture of cells of different resistance levels; (ii) strain-specificity; (iii) significance of the drug resistance level; (2) Method of determination of drug resistance levels should be reproducible.

In the present study, the strains used had been isolated from a single colony. They were isolated in most cases by one-step selection, as it was possible that multi-step selection produces changes not directly correlated to drug resistance²⁰⁾²¹⁾. The resistance level was determined by the "actual count method"^{22)~24)}. It was expressed as the highest concentration of drug, on which small inocula consisting of 10 to 100 (in most cases, 30 to 80 were used) viable units could form colonies after incubation of 4 weeks. The medium used was Ogawa egg medium, and incubation was made at 37°C. Dihydrostreptomycin sulfate (Meiji), kanamycin sulfate (Meiji), viomycin sulfate (Parke-Davis) and capreomycin sulfate (Eli Lilly) were used.

The results obtained are shown in Tables 2 to 5 and summarized as Fig. 1.

In conclusion:

(1) Kanamycin resistance or viomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* produced

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu-cho, Chita-gun, Aichi-ken, Japan.

capreomycin resistance.

(2) Capreomycin resistance produced viomycin resistance, but it produced not always kanamycin resistance (two strains from the H₃₇Rv strain, which were capreomycin-resistant, were not kanamycin-resistant, but two of three capreomycin-resistant strains from the Aoyama-B strain were kanamycin-resistant).

(3) There was no cross resistance relationship between capreomycin and streptomycin.

(4) Slight cross resistance relationship, as two-fold increase, was observed in the ways from viomycin to kanamycin and vice versa and from kanamycin to streptomycin, but these relationships were strain-specific and were not observed in all strains.

抗結核剤の交叉耐性が問題になつたのは、kanamycin (KM) の出現以後で、東村など¹¹⁻¹⁴⁾は viomycin (VM) 耐性株の KM 感受性が若干低下するのを認め、Steenken et al.⁵⁾も同様の所見を報告した。Tsukamura et al.⁸⁾はさらに KM 耐性株では streptomycin (SM) 耐性菌出現率が増加していることも報告した。かような「部分的な一方向的交叉耐性」は、その後 ethionamide と amithiozone⁶⁾⁻⁹⁾ および PAS と amithiozone¹⁰⁾の間でも発見された。しかし臨床的にその存在が確認されたのは、ethionamide と amithiozone の間に限られていた⁷⁾⁹⁾。

ところが最近発見された capreomycin (CPM) で VM および KM との間の交叉耐性が問題となり、臨床的にもこれを裏づける成績が発表された。すなわち Robinson & Wichelhausen¹¹⁾は KM 耐性株が CPM 耐性であると述べた。しかし Herr et al.¹²⁾は交叉耐性を認めないと述べた。

Koseki & Okamoto¹³⁾は H₃₇Rv 株を用いての基礎実験で VM 耐性株は CPM 耐性であることを報告し、Coletsos & Oriot¹⁴⁾¹⁵⁾は逆に CPM 耐性株が VM および KM 耐性であると述べている。一方 Sutton et al.¹⁶⁾は交叉耐性を認めていない。

臨床的観察、すなわち患者分離株については、先の Robinson & Wichelbaum¹¹⁾ および Herr et al.¹²⁾の後に、堂野前など¹⁷⁾は KM 耐性株がしばしば CPM 耐性であることを認め、和田¹⁸⁾も同じ現象を認めている。なお和田は H₃₇Rv 株で KM 耐性株は CPM 耐性 (KM 耐性 → CPM 耐性)、VM 耐性株も CPM 耐性 (VM 耐性 → CPM 耐性) であることを認めている。一方 Morse et al.¹⁹⁾は交叉耐性を認めていない。

以上のごとく CPM の出現に伴つて KM 耐性および VM 耐性との関係が問題になつたが、これらの関係については、実験者の成績が一致していない。われわれが本研究を意図した理由はここにある。

以上のごとく交叉耐性の問題について研究者の成績が必ずしも一致しない原因として、次の点が考えうる。

(1) 使用した菌株が純系であつたかどうか。交叉耐性の問題を取り扱う以上、耐性を問題とするのであるから、使用した耐性株は十分吟味されたものでなければならない。高耐性菌と低耐性菌との混合物 (遺伝学的に不均一な株) であつては再現性に乏しい。菌株は少なくとも single colony に由来するものでなければならない。

(2) 菌株特異性の問題。交叉耐性については菌株特異性があるから、なるだけ多数株を用いて検討する必要がある¹⁰⁾。

(3) 耐性度の問題。交叉耐性の現象は耐性度と関係が深い⁸⁾¹⁰⁾。したがつて少なくとも低耐性と高耐性との2種の耐性株を用いることが望ましい。これが不能の場合には少なくとも使用菌株の耐性度を再現性ある方法で測定して記載しておくべきである。使用する耐性株は原則として one-step selection を用いるべきである。one-step で高耐性菌が得られぬときは、なるだけ step の数の少ない株を用いるべきである。薬剤による選択を重ねると耐性と直接関係のない性状が入つてくる²⁰⁾²¹⁾ことがある。

(4) 耐性度測定法の問題。耐性度を再現性ある方法で測定することが交叉耐性研究の基礎である。もし耐性度という概念を導入するならば、耐性度の表現は再現性の高い方法、たとえば "actual count method" で行なわれるべきである。

以上の観点から従来の研究をみると、いずれの論文もこれを満足するものはない。したがつて従来相当数の報告があるにもかかわらず、ここに再び CPM を中心とする交叉耐性の問題を取り上げる必要があると感じた次第である。しかしわれわれの今回の研究も上記の条件を十分満足していないことをお断りしておく。とくに菌株数の問題はいうはやすくして実行困難で、本報でも H₃₇Rv 株と青山 B 株の2株を取り扱うにとどまつた。

実験材料および方法

菌株。使用菌株は *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Table 1. History of Strains

Strain	Isolation (Method of selection)*
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	
Streptomycin-resistant	One-step, 50 µg/ml(1957)
Kanamycin-resistant	One-step, 100 µg/ml(1959)
Viomycin-resistant	One-step, 50 µg/ml(1958)
Capreomycin-resistant	
(a) CPM 50 a-R	One-step, 50 µg/ml(1966)
(b) CPM 50-100 bR	Two-step, 50 µg/ml and 100 µg/ml(1966)
<i>M. tuberculosis</i> Aoyama-B	
Streptomycin-resistant	One-step, 1,000 µg/ml(1957)
Kanamycin-resistant	One-step, 1,000 µg/ml(1958)
Viomycin-resistant	
(a) VM 100 a-R	One-step, 100 µg/ml(1966)
(b) VM 100 b-R	One-step, 100 µg/ml(1966)
(c) VM 100 c-R	One-step, 100 µg/ml(1966)
Capreomycin-resistant	
(a) CPM 100 a-R	One-step, 100 µg/ml(1966)
(b) CPM 100 b-R	One-step, 100 µg/ml(1966)
(c) CPM 200-R	One-step, 200 µg/ml(1966)

Abbreviation. Streptomycin-resistant strain=SM-R. Kanamycin-resistant strain=KM-R. Viomycin-resistant strain=VM-R. Capreomycin-resistant strain=CPM-R.
* Description "One-step, 50 µg/ml" means that the strain was isolated by a one-step selection with the concentration of 50 µg/ml. All strains were isolated as single colony and maintained on the Ogawa egg medium without drug until their use for the present study.

株および青山B株ならびにこれらから分離した耐性株である。分離の方法は、表1に示した。菌株はいずれもsingle colonyから分離され、薬剤なし培地に継代保存された。耐性度の検定は実験と同時にこなつたので、表2~5に記載されている。

培地。1%小川培地を用いた。17~18×170 mmの試験管に8mlずつ分注し、90°C60分滅菌した。薬剤は次のものを用い、いずれも滅菌前に添加し、添加濃度をそのまま表示した。capreomycin sulfate (Eli Lilly) (=Capastat), kanamycin sulfate (明治), viomycin sulfate (Parke-Davis), dihydrostreptomycin sulfate (明治)。

耐性度測定法, "Actual count 法"^{22)~24)}によつた。1%小川培地斜面に4週培養の菌を、ガラス玉コルペンで10分間振盪して均一化し、これに生食水を加えて5分間静置し、上清をとつて、4~7 mg/mlの菌液を作つた。この菌液を10倍希釈して10⁻⁵までにいたり、原液、10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵の5種の菌液を接種に用いた。接種は0.02 mlをdeliverする渦巻白金耳により、接種後ただちにダブルゴム栓をほどこして、37°Cに4週間培養した(渦巻白金耳接種ではただちにゴム栓をしてよい)。4週後、集落を観察し、対照培地に10~100

Table 2. Susceptibility to Kanamycin of Various Drug-resistant Strains

Strain	Resistance level determined by "actual count method"							
	Kanamycin (µg/ml)							
	0	10	20	30	50	100	200	500
H ₃₇ Rv parent	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv SM-R	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv KM-R	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv VM-R	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50 a-R	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50-100 b-R	+	+	-	-	-	-	-	-
Aoyama-B (A) parent	+	-	-	-	-	-	-	-
A SM-R	+	-	-	-	-	-	-	-
A KM-R	+	+	+	+	+	+	+	+
A VM 100 a-R	+	±	-	-	-	-	-	-
A VM 100 b-R	+	-	-	-	-	-	-	-
A VM 100 c-R	+	-	-	-	-	-	-	-
A CPM 100 a-R	+	+	+	+	+	-	-	-
A CPM 100 b-R	+	-	-	-	-	-	-	-
A CPM 200-R	+	+	+	+	+	-	-	-

In "actual count method", the drug resistance level is determined as the highest concentration of drug, on which small inocula consisting of 10 to 100 viable units can grow. The reading of the growth of colonies was made after 4 weeks' incubation at 37°C.

集落を示す系列で、集落形成の起こつた最高濃度で耐性度を表わした。上述の方法で、全例に10~100集落の接種量を得るのに成功し、70%では30~80集落を得るのに成功した。

実験成績および考察

実験成績を表2~5に示し、これを図1に総括した。

1. KM感受性(表2)

VM耐性菌, SM耐性菌のKM感受性は感性菌(parent strainの菌)と同じである。

CPM耐性菌のKM感受性は菌株によつて異なる。H₃₇RvのCPM耐性株は2株ともKM感性であるが、青山BのCPM耐性株は、3株中2株がKM耐性、1株がKM感性である。

この所見はCPM耐性→KM耐性の関係には、おそらく菌株特異性があるとともに、同一菌株に由来するものでも、個々の耐性株によつてKM耐性があつたり、なかつたりする。おそらくCPM耐性がKM耐性を伴う場合は、一種の複突然変異^{21)25)~27)}の現象によるものと思われる。

2. VM感受性(表3)

CPM耐性株は、H₃₇Rv由来の2株、青山B由来の2株、計4株ともVM耐性である。一方、次に示すようにVM耐性株もCPM耐性であるから、CPMとVM

Table 3. Susceptibility to Viomycin of Various Drug-resistant Strains

Strain	Resistance level determined by "actual count method"							
	Viomycin ($\mu\text{g/ml}$)							
	0	10	20	30	50	100	200	500
H ₃₇ Rv parent	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv SM-R	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv KM-R	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv VM-R	+	+	+	+	+	+	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50 a-R	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50-100 b-R	+	+	+	+	+	-	-	-
Aoyama-B (A) parent	+	+	-	-	-	-	-	-
A SM-R	+	+	-	-	-	-	-	-
A KM-R	+	+	+	-	-	-	-	-
A VM 100 a-R	+	+	+	+	+	+	+	-
A VM 100 b-R	+	+	+	+	+	+	-	-
A VM 100 c-R	+	+	+	+	+	+	-	-
A CPM 100 a-R	+	+	+	+	+	-	-	-
A CPM 200-R	+	+	+	+	+	-	-	-

Table 4. Susceptibility to Capreomycin of Various Drug-resistant Strains

Strain	Resistance level determined by "actual count method"									
	Capreomycin ($\mu\text{g/ml}$)									
	0	5	10	20	30	50	100	200	500	
H ₃₇ Rv parent	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv SM-R	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv KM-R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₃₇ Rv VM-R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50 a-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50-100 b-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Aoyama-B (A) parent	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A SM-R	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A KM-R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
A VM 100 a-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A VM 100 b-R	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A VM 100 c-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A CPM 100 a-R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
A CPM 100 b-R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
A CPM 200-R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

との間には交叉耐性があるといえる。

KM と VM の関係では、H₃₇Rv の KM 耐性株は VM 感性であるが、青山Bの KM 耐性株は VM 耐性度が約 2 倍になっている。SM 耐性株は VM 感性である。

3. CPM 感受性 (表 4)

H₃₇Rv の KM 耐性株も、青山 B の KM 耐性株も CPM 耐性となつている。

Table 5. Susceptibility to Streptomycin of Various Drug-resistant Strains

Strain	Resistance level determined by "actual count method"									
	Streptomycin ($\mu\text{g/ml}$)									
	0	1	2	3	5	10	20	50	100	
H ₃₇ Rv parent	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv SM-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ Rv KM-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
H ₃₇ Rv VM-R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50 a-R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv CPM 50-100 b-R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Aoyama-B (A) parent	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A SM-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A KM-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A VM 100 a-R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A VM 100 b-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A VM 100 c-R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A CPM 100 a-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A CPM 200-R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

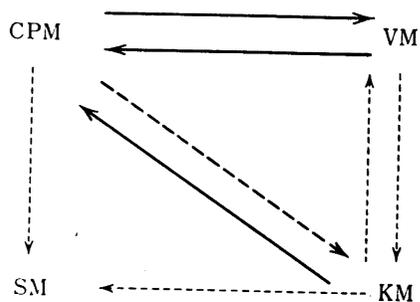
また H₃₇Rv の VM 耐性株 (1 株) も、青山 B の VM 耐性株 (3 株) も CPM 耐性である。

SM 耐性株は CPM 感受性に変化がない。

4. SM 感受性 (表 5)

いずれの耐性株も SM 感受性に著明な変化を示さないが、KM 耐性株は約 2 倍程度の SM 耐性度の上昇を示した。青山 B の CPM 耐性株も若干 SM 耐性度が上昇していたが、H₃₇Rv 株由来の CPM 耐性株は SM 感

Fig. 1. Cross Resistance-relationships among Kanamycin, Viomycin, Streptomycin and Capreomycin Resistances



Arrow with actual line (—) represents that drug resistance to one drug produces drug resistance to another drug. Arrow with interrupted line (---) represents that drug resistance to one drug may produce drug resistance to another drug, but such phenomenon is not always observed and seems to be strain-specific.

Arrow with dotted line (.....) represents that drug resistance to one drug may produce slight increase in drug resistance to another drug and the phenomenon is strain-specific.

受性に変化がなかった。

以上の変化を通覧して総括すると、図1のごとき関係が示される。図中、実際に問題となるのは、耐性度の変化が著しい実線および破線で示した VM と CPM, KM と CPM の関係である。

以上の結果を既報されている文献と比較するとあるものは一致し、あるものは不一致である。従来文献で、これらの薬剤の交叉耐性に関して不一致がみられた原因については次の点が考えられる。

(1) 耐性度測定法の欠点。従来文献における耐性度の表現は非定量的な方法で実験誤差が多い。とくに指摘したいのは種々の株の同一菌量を mg 量であわせて接種して、僅少の差をもつて耐性度の変化を結論したものがあつた。耐性度の表現が接種生菌数により、大きい影響を受けることを思えば、僅少の差は実験誤差の範囲を出ないと考えるべきである。

(2) 菌株特異性。われわれの成績でも、H₃₇Rv 株と青山 B 株の間に、かなりの差があるようで、とくに CPM 耐性株の KM 感受性については著明な菌株特異性があるごとくである。さらに同じ青山 B 株由来の CPM 耐性株でも菌株によつて KM に対する態度が大いに異なる。

われわれは本報で交叉耐性の研究に留意すべき項目を指摘したが、遺憾ながらわれわれ自身の場合にもこれらの条件を十分満足すべき研究は行ないえなかつた。とくに菌株数が不足であつたことは否めない。ここに結論する事項も、以上の欠点を考慮して判断されるべきである。

以上の成績から、ただちに化学療法の考察を行なうことは尙早である。しかし次の問題を提起しておきたい。いずれの抗結核剤とも著明な交叉耐性を示さない SM は第1に使用されるべき地位を確保するごとく思われる。問題は KM と CPM のいずれを第2位に使用すべきかであろう。本報の結果では、KM 耐性菌は CPM 耐性となつているが、CPM 耐性菌は必ずしも KM 耐性ではないことを示している。この結果からすると、KM を先に使用すると、CPM 耐性が同時に生じて、CPM がきかなくなるが、逆に CPM を先に使用した場合は必ずしも KM 耐性となるわけではないので、KM がきく可能性が残されることになる。果たしてこのような可能性が事実かどうか、臨床的観察によつて検討されねばならない。

結 論

人型結核菌 H₃₇Rv 株および青山 B 株から分離した SM, KM, VM, CPM 耐性株を用いて、“actual count 法”で耐性度を測定しつつ、交叉耐性の有無を検討した。

(1) VM 耐性と CPM 耐性の間には交叉耐性があ

る。

(2) KM 耐性株は CPM 耐性であるが、CPM 耐性株は必ずしも KM 耐性ではない。H₃₇Rv 由来の CPM 耐性株は2株とも KM 感性であつたが、青山 B 由来の CPM 耐性株では、3株中2株が KM 耐性、1株が感性であつた。CPM 耐性株の KM 感受性には菌株特異性がある。CPM 耐性変異は必ずしも KM 耐性を伴うわけではない。したがつて CPM 耐性が KM 耐性を伴う場合は、複突然変異の現象によるものと思われる。

(3) SM 耐性と CPM 耐性、KM 耐性、VM 耐性の間には著明な交叉耐性の現象はない。あつても2倍程度の耐性度上昇を示す軽微な変化にとどまる。

文 献

- 1) 東村道雄・野田用・山本昌邦・林光男・鳥居大：医学と生物学，50：4，昭34。
- 2) Torii, F., Yamamoto, M., Hayashi, M., Noda, Y., and Tsukamura, M.: J. Antibiotics, Ser. A, 12: 103, 1959.
- 3) Tsukamura, M., Noda, Y., and Yamamoto, M.: J. Antibiotics, Ser. A, 12: 323, 1959.
- 4) Tsukamura, M.: Jap. J. Genetics, 34: 275, 1959.
- 5) Steenken, W., Jr., Montalbino, V., and Thurston, J. R.: Amer. Rev. Tuberc., 79: 66, 1959.
- 6) Rist, N., Grumbach, F., and Libermann, D.: Pre Med., 67: 625, 1959.
- 7) Bartmann, K.: Tuberk. arzt, 14: 525, 1960.
- 8) 東村道雄：結核，36：733，昭36。
- 9) 東村道雄：結核，37：103，昭37。
- 10) 東村道雄：Chemotherapy, 8: 354, 1960.
- 11) Robinson, L. B., and Wichelhausen, R. H.: Trans. 21st Conf. V. A. Armed Forces, p. 351, 1962.
- 12) Herr, E. B., Jr., Sutton, W. B., Stark, W. M.: Trans. 21st Conf. V. A. Armed Forces, p. 367, 1962.
- 13) Koseki, Y., and Okamoto, S.: Jap. J. Med. Sci. & Biol., 16: 31, 1963.
- 14) Coletsos, P. J., and Oriot, E.: Rev. Tuberc. et Pneumol., 28: 413, 1964.
- 15) Coletsos, P. J., and Oriot, E.: Ann. Inst. Pasteur, 107: 215, 1965.
- 16) Sutton, W. B., Gordee, R. S., Wick, W. E., and Standfield, L.: Ann. New York Acad. Sci. 135: 947, 1966.
- 17) 堂野前維摩郷・井上幾之進：胸部疾患，8：1080，昭39。
- 18) 和田退蔵：結核，40：283，昭40。
- 19) Morse, W. C., Arrington, C. W., Hawkins, J. A., and Sproat, E. F.: Ann. New York Acad. Sci., 135: 983, 1966.
- 20) Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 2: 327, 1958.
- 21) 東村道雄：日細，14：271，昭34。
- 22) 東村道雄：医学と生物学，49：87，昭33。

- 23) Tsukamura, M. : Jap. J. Tuberc., 12 : 46, 1964.
- 24) Canetti, G. et al. : Bull. Internat. Union Tuberc., 37 : 185, 1966.
- 25) 束村道雄 : 日細, 14 : 425, 昭 34.
- 26) 束村道雄 : 日細, 14 : 552, 昭 34.
- 27) 束村道雄 : 日細, 15 : 704, 昭 35.