

Rifampicin に対する結核菌の臨床的耐性基準設定に関する研究

結核療法研究協議会

(委員長 五味二郎)

(細菌学的研究科会 柳沢謙・室橋豊穂 他)

受付 昭和 45 年 8 月 8 日

STUDIES FOR THE DETERMINATION OF CLINICALLY AVAILABLE
CRITERIA OF RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI TO
RIFAMPICIN*

Tuberculosis Research Committee, RYOKEN (Chairman: Jiro GOMI)

Subcommittee on Bacteriology (Ken YANAGISAWA, Toyoho MUROHASHI et al.)

(Received for publication August 8, 1970)

Resistance of tubercle bacilli to RFP was examined in national scale by the members of the subcommittee on bacteriology of RYOKEN on the strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis treated or untreated with this drug.

According to the results, 1% Ogawa's egg slant containing RFP in two different concentrations of 10 mcg/ml and 50 mcg/ml seemed to be approximately adequate for the routine sensitivity test. And, as for the criteria of resistance, either the complete resistance to 10 mcg/ml or the incomplete resistance both to 10 mcg/ml and 50 mcg/ml seemed to be clinically available.

緒 言

新しい抗結核薬を臨床の広範な応用に移すにあつては、これにさがけて実施される基礎的研究において、再現性が高く一般検査室への普及も容易な日常的耐性検査法の確立を図り、さらに、その検査法による実験成績に基づいた臨床的耐性基準を設定しておくことが望ましい。しかし、過去における二次抗結核薬採用の場合には、この過程が正しく踏まれたとはいいがたい例が多い。これは交錯する諸要因を整理するためには必須である大規模な協同研究を、時宜を失なわず組織的に進めることがきわめて困難である事情によるものであろう。結核患者が減少し化学療法が複雑化してゆくことにより、その困難さは一そう増大するものと考えられる。

療研は、昭和 44 年度研究課題として「肺結核再治療例に対する Rifampicin の治療効果」についての臨床研

究¹⁾を全国的規模で実施したが、上述の諸点に関する考慮に基づき、対象患者から分離された結核菌株の蒐集に努め、細菌学的研究科会による本研究をも平行して実施することとした。

当初の研究計画からすれば、被検菌株数をはじめ種々の点に不満はあるが、本剤に関する限り、現在の時点では、他に比肩すべき報告例もないようであるのでここに報告し、関係者各位のご参考に供する次第である。

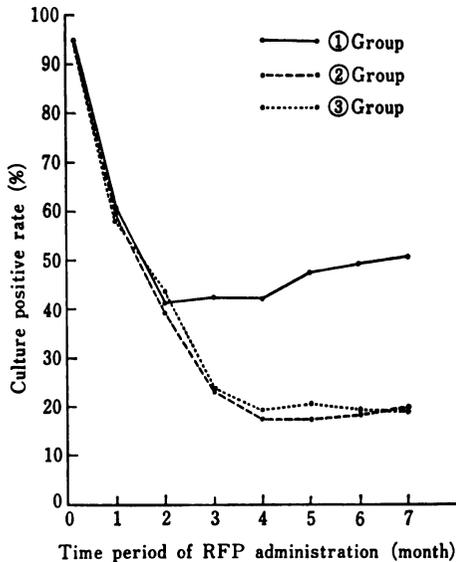
研究 方 法

(1) 被検結核菌株

療研が実施した上記の臨床的協同研究は、一次ならびに二次の抗結核薬を投与したにもかかわらず 3 カ月以上排菌が続いている結核患者 358 名を対象として、下記のごとき RFP の各投与方式群を作り、投与効果や副作用などを 3 群間で比較したものである¹⁾。

* From the Tuberculosis Research Committee, RYOKEN c/o Inform² Sect., JATA, Kekkaku Yobokai Building 3-12, 1-chome, Misaki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101 Japan.

Fig. 1. Trend of the Culture Positive Rate after RFP Administration



① これまで実施してきた化学療法に RFP の毎日投与を加える方式の群

② RFP と EB を毎日投与する方式の群

③ RFP は週 2 日, EB は毎日投与する方式の群

以上の 3 群の結核菌分離培養陽性率は, RFP 投与開始後図 1 のごとく急速に低下する。

① 群は他に比し不良であるが, 全体としては 70% 前後の患者の分離培養が陰性化をみた時期, すなわち RFP 投与開始後 3 ないし 6 カ月に分離された結核菌株を蒐集し, これを本研究における RFP 既使用の被検菌株としたのである。

これと対照するために, RFP 未使用患者から分離した結核菌株をも被検菌株としたが, この中には結核化学療法を全く受けたことがない患者からの分離菌株と, RFP を除く他の化学療法を受けたことがある患者からの分離菌株とが含まれている。いずれも本研究の検査を分担した各機関が, 分離しあるいは保存していた菌株である。

(2) 本研究の検査分担機関

前項の菌株に関する検査は, 本報告末尾の付表に示す各機関において, 次項に述べる共通の方法で実施された。

(3) 耐性検査の方法

i) 使用培地は 1% 小川培地で, 作製後 1 週間以内に菌の接種を行なった。

ii) RFP の培地添加濃度は, 0, 2.5, 5, 10, 25, 50 および 100 mcg/ml である。すなわち RFP 純末を 50% プロピレングリコール水を用いて加熱溶解希釈し, 0, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000 および 10,000 mcg/

ml の溶液を作り, 各溶液を培地凝固前にその液量の 1/100 量ずつ加え, 良く攪拌して分注凝固した。

iii) 接種菌液は, 原則として Dubos 培地継代第 2 代菌液を原菌液としたが, 一部に小川培地継代培養菌の手振り法による菌液を用いた菌株も含まれる。

iv) 接種菌量は, 各菌株とも 10^{-8} mg および 10^{-6} mg の 2 種類とした。すなわち 1 mg 菌液を 100 倍および 10,000 倍に希釈し, そのおのおの 0.1 ml ずつを, 各濃度 2 本あての検査用培地に注入接種し培養した。

v) 観察の時期

観察は, 原則として, 培養 3 週および 4 週の時期において実施した。

vi) その他の事項

検査の方法に関してここに記述されない事項はすべて結核菌検査指針²⁾の記載に従って実施したが, 10^{-8} mg の菌を接種した培地の成績は, 接種生菌単位ならびに RFP 含有培地発育コロニー数の接種生菌単位に対する割合を概算しうるように, 必ずコロニー数で記録した。

研究成績

(1) 10^{-8} mg 接種 4 週観察の成績による, 被検菌各群の RFP 耐性度

表 1 は各被検菌群の, 10^{-8} mg 接種 4 週観察成績による RFP 添加濃度別の耐性度分布をとりまとめたものである。この表により, まず RFP 未使用患者分離菌株の耐性度分布を概括する。

すなわち 2.5 mcg/ml では約 90% の菌株がなんらかの発育を示しているが, 完全耐性の菌株は 2.7% にすぎない。5 mcg/ml ではなんらかの発育を示す菌株は約 60% で, 完全耐性の菌株はない。10 mcg/ml になると約 70% の菌株が発育せず, 25 mcg/ml では 1 菌株のみがわずかな発育を示したほかはすべて陰性である。未使用菌株群の中では, 他の化学療法を受けたことがあるか否かによる 2 群の耐性度分布を比較したが, 両者の間に指摘すべき差はないといつてよいようである。

これに対して, RFP 既使用患者分離菌株の各添加濃度における耐性度からみた分布は明らかに右に偏しており, きわめて顕著な耐性度の上昇があることを認めざるをえない。たとえば各添加濃度ごとに完全耐性を示している菌株の率をみると, 2.5 および 5 mcg/ml で約 70%, 10 mcg/ml で 68%, 25 mcg/ml で 57%, 50 mcg/ml で 52%, 100 mcg/ml で 43% と, 濃度の高い順に低下してはいるが, いずれも未使用菌株とは比較にならない高率である。これを被検菌株分離までの RFP 使用期間から, 3~4 カ月の菌株と 5~6 カ月の菌株に分けてみると, 各濃度で陰性を示す菌株の率が前者にやや低い傾向はあるが, 完全耐性を示す菌株の率には差が認められ

Table 1. Different Distribution Patterns in the Resistance Degree of Strains Isolated from Patients Treated or Untreated with RFP (I)
(Inoculum size: 10^{-8} mg/slant, Incubation period: for 4 weeks)

Strains isolated from patients treated or untreated with RFP	Degree of resistance	RFP concentration (mcg/ml)						Number of cases													
		2.5		5		10		25		50		100		Number of cases							
		s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r								
Non-treated	No previous chemotherapy at all	3	38	2	13	30	0	29	14	0	43	0	0	—	—	—	43				
	Chemotherapy other than RFP	8	58	1	29	38	0	50	17	0	66	1	0	—	—	—	67				
Total		11	96	3	42	68	0	79	31	0	109	1	0	—	—	—	110 (100)				
Treated	RFP treatment for 3~4 months	1	10	19	2	9	19	5	6	19	8	4	18	10	4	16	10	7	13	30	
	RFP treatment for 5~6 months	0	8	27	1	7	27	2	8	25	4	12	19	8	9	18	9	11	15	35	
Total		1	18	46	3	16	46	7	14	44	12	16	37	18	13	34	19	18	28	65	
		(1.5)		(28)		(71)		(11)		(22)		(68)		(20)		(52)		(28)		(43)	

Note. (): Percentage s : Sensitive (no growth) r : Incompletely resistant R : Completely resistant

Table 2. Different Distribution Patterns in the Resistance Degree of Strains Isolated from Patients Treated or Untreated with RFP (II)
(Inoculum size: 10^{-8} mg/slant, Incubation period: for 4 weeks)

Strains isolated from patients treated or untreated with RFP	Degree of resistance	RFP concentration (mcg/ml)						Number of cases													
		2.5		5		10		25		50		100		Number of cases							
		s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r								
Non-treated	No previous chemotherapy at all	11	32	0	26	17	0	41	2	0	43	0	0	—	—	—	—	—	—	—	43
	Chemotherapy other than RFP	30	24	0	44	10	0	53	1	0	54	0	0	—	—	—	—	—	—	—	54
Total		41	56	0	70	27	0	94	3	0	97	0	0	—	—	—	—	—	—	—	97
		(42)		(58)		(28)		(97)		(3.1)		(100)								(100)	
Treated	RFP treatment for 3~4 months	4	7	15	5	7	14	8	5	13	10	4	12	11	4	11	11	5	10	26	
	RFP treatment for 5~6 months	0	11	17	3	9	16	5	7	16	6	10	12	7	11	10	8	12	8	28	
Total		4	18	32	8	16	30	13	12	29	16	14	24	18	15	21	19	17	18	54	
		(7.4)		(33)		(59)		(24)		(54)		(44)		(33)		(35)		(31)		(33)	

Table 3. Correlation between the M.I.C. Values Obtained by the Incubation Periods for 3 Weeks and 4 Weeks

4 W	3 W							Total
	2.5*	5	10	25	50	100	100~	
2.5*	12							12
5	15	11						26
10	5	24	12					41
25	1	5	18	3				27
50				2	2			4
100					1			1
100~			1			2	36	39
Total	33	40	31	5	3	2	36	150

Note. Inoculum size : 10^{-8} mg/slant * : mcg/ml

ず、両群の分布の差は小さい。

(2) 10^{-8} mg 接種 4 週観察の成績、とくに 10^{-8} mg 接種の成績との比較

表 2 は 10^{-8} mg 接種 4 週観察の成績を、表 1 と全く同様にまとめたものである。

表 2 を表 1 と比較すると、 10^{-8} mg 接種の場合には、未使用菌株も既使用菌株も、その耐性度分布が、それぞれの 10^{-8} mg 接種の場合より左に偏っている。すなわち RFP に対する耐性検査においても接種菌量による差は明らかに認められる。(次項参照)

しかし未使用菌株と既使用菌株の耐性度分布が全体的に顕著な相違を示すという事実には、両接種菌量間には差はないといえる。

ただ 10^{-8} mg 接種の場合には、未使用菌株のうち 2.5 および 5 mcg/ml になんらかの発育を示す率が、他の結核化学療法も全く受けたことがない患者からの菌株群のほうに高くなっており、その差は X^2 -Test による有意の水準にある。また既使用菌株のうちでは、各添加濃度に菌発育陰性であった率が、3~4 カ月菌株群のほうに高い傾向が認められる。しかし、これらの点についての検討は、この研究が採用した研究方法それ自体がもたらす誤差を考慮し、ここでは取り上げない。

(3) 接種菌量と耐性度の関係について

表 3 は、各菌株の 10^{-8} mg 接種と 10^{-8} mg 接種とにおける、それぞれの菌発育阻止最低濃度 (M.I.C.) の相互関係を示すものである。

両接種菌量での M.I.C. が 100 mcg/ml 以上となっている菌株を除外して比較すると、 10^{-8} mg 接種のほうの値が 1 段高い菌株が 49.6%、2 段以上高い菌株が 19.2% で、等しかった菌株は 31.3% (115 例中 36 例) にすぎない。

しかし接種菌量による差は、未使用菌株群と既使用菌株群の間にみられた耐性度分布の画然たる差に比すれば、小さいものであるといつてよいであろう。

(4) 培養期間と耐性度の関係について

Table 4. Correlation between the M.I.C. Values Obtained by the Inoculum Sizes of 10^{-8} mg and 10^{-6} mg/slant

10^{-8} mg	10^{-6} mg							Total
	2.5*	5	10	25	50	100	100~	
2.5*	12							12
5	15	11						26
10	11	21	9					41
25	2	6	16	3				27
50			1	2	1			4
100					1			1
100~				2		2	35	39
Total	40	38	26	7	2	2	35	150

Note. Incubation period : for 4 weeks * : mcg/ml

表 4 は 10^{-8} mg 接種の場合の 3 週観察と 4 週観察における、それぞれの M.I.C. の相互関係を示すものである。

両観察時の M.I.C. が 100 mcg/ml 以上となつている菌株を除いて比較すると、4 週のほうの値が 1 段高い菌株が 54.4%、2 段以上高い菌株が 10.5% で、等しかった菌株は 35.1% (114 例中 40 例) にすぎない。

しかし培養期間によるこの差も、未使用菌株群と既使用菌株群の間の耐性度分布の差に比すれば、小さいものであるといつてよいと考えられる。

考 察

(1) RFP の結核菌発育阻止濃度が、培地の種類によりきわめて大きく変化することは、すでに多くの報告によつて指摘されている⁹⁾⁻⁵⁾⁷⁾⁸⁾¹⁰⁾。これらの成績を概括すれば、Tween 80 を含む液体培地と寒天培地との間、寒天培地と卵培地との間では、それぞれ 10 倍以上の差をもつて後者の耐性値が高くなると考えてよいようであつて、在来の抗結核薬中最大とされていた Kanamycin のそれよりも大きい。卵培地の中でも Löwenstein-Jensen 培地の M.I.C. は 5 mcg/ml 前後であつて、今回のわれわれの成績よりは低い値を示すものようである⁹⁾⁹⁾。しかし各菌株の感受性ないし耐性の相対的な関係は、培地の種類によつて矛盾した成績を示すわけではなさそうである。

さらにまた、実際的には、わが国の結核菌分離培養はほとんどが小川培地によつて行なわれており、したがつて、その後の継代 (耐性検査を含む) においても小川培地はもつとも安定した発育支持力をもつものと考えられ、かつ、もつとも入手しやすい培地でもある。

日常的耐性検査の基礎的検討のために実施された本研究が 1% 小川培地を採用したのは、主として上記の 2 点によるもので、実験上特記すべき支障はなかつたといつてよいと考えられる。

(2) 本研究がとつた諸条件のもとでは、RFP 未使

用患者分離菌株の M.I.C. はほとんどが 25mcg/ml 以下であつて、25mcg/ml に発育をみたのは、 10^{-8} mg 接種4週観察において1例あつたにすぎない。これに対して、既使用患者分離菌株を 10^{-8} mg 接種した場合には70%以上が100mcg/ml でもなんらかの発育を示し、その過半は完全耐性であつて、しかも RFP 使用期間3~4カ月と5~6カ月の両菌群間の差は小さい。これは臨床的な結核菌の耐性獲得も早く高いことを示すものであり、*in vitro* の耐性上昇実験がきわめて容易に行なわれていることとの間に矛盾がない⁴⁾。

上述のごとき耐性上昇の様相は、既存の抗結核薬のうちでは、SM, INH, KM などのそれと近似しており、他の二次薬のそれとは明らかに異なる。したがつて耐性基準の設定が比較的容易な薬剤であると考えてよいであらう。

接種菌量が大いほど、また培養期間が長いほど耐性値が高くなる傾向がみられるのは、他の多くの薬剤の場合と同様であるが、それらの影響は日常の耐性検査成績を設定された耐性基準と照合するさいに大きな混乱を来たすほど著しいものとは考えられない。本研究の検査を分担した各機関相互の差も、同様な立場からみれば、無視して差し支えない程度のものであつた。

(3) 以上に述べたところによつて、1% 小川培地を用い、接種菌量を 10^{-8} mg とし、培養期間を3~4週とする条件下で行なう耐性検査では、RFP 培地添加濃度を10mcg/ml および50mcg/ml の2段階とするのが妥当であると考えられる。

また、そのさいの臨床的耐性基準は、結核の治療指針が従来から用いている表現を借りるならば、10mcg/ml 完全耐性 (または10mcg/ml および50mcg/ml に不

Table 5. Comparison of the Resistance Degree of the Strains Isolated from Patients Treated and Untreated with RFP

Strains isolated from patients treated or untreated with RFP	Bacterial growth on the media containing RFP in a concentration of 10 mcg/ml						Number of cases
	No growth	Incompletely resistant				Completely resistant	
		~1/1,000*	1/1,000~1/100*	1/100~1/10*	1/10~*		
Non treated	87	9	6	4	0	0	106
Treated	7	0	3	4	7	44	65

* Ratios to the bacterial growth on the control slant.

Table 6. Sputum Culture and Drug Sensitivity Test in 18 Representative Cases of Pulmonary Tuberculosis Treated with RFP

Case No.	Culture results before and after RFP administration										Resistance degree to RFP in a concentration of				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	10 mcg/ml	25 mcg/ml	50 mcg/ml	100 mcg/ml
1	⊕	⊕	+	⊖**	+	-	-	-	-	-	-	(-)**	(-)	(-)	(-)
2	⊕	⊕	-	⊖	-	-	-	-	-	-	-	r	(-)	(-)	(-)
3	⊕	⊕	⊕	⊖	+	+	-	-	-	-	-	r	r	(-)	(-)
4	⊕	⊕	⊕	⊖	+	+	-	⊕	-	⊕	-	(-)	(-)	(-)	(-)
5	⊕	-	⊕	⊕	+	-	-	+	+	+	+	r	r	(-)	(-)
6	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	(-)	(-)	(-)	(-)
7	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	r	(-)	(-)	(-)
8	⊕	⊕	+	+	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	r	r	r	(-)
9	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	r	r	r	r
10	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
11	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
12	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
13	⊕	⊕	+	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	R	R	R	R
14	⊕	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
15	⊕	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
16	+	-	+	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
17	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R
18	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	R	R	R	R

* RFP administration period in month.
 ** Sign ⊖ indicates the strain used for drug sensitivity test.
 *** (-): No growth r: incompletely resistant R: Completely resistant

完全耐性)以上となるであろう。

(4) 前項に拠つて行なわれる耐性検査では、未使用菌株群にも既使用菌株群にも30%前後の10mcg/ml不完全耐性菌を認めることになり、それが上記の基準によつて、混乱なく処理しうるかどうかが問題となる。表5は10mcg/ml含有培地での菌発育量を対照培地のそれに対する比による分布で両菌群を比較したもので、同じく10mcg/mlに不完全耐性であるといつても、両群のその菌発育量の分布には大きな差があることが明らかである。

この事実を基礎とした観察や判定が行なわれるならば、上記の混乱はほぼ回避できるはずであると考えられる。

(5) 次に上述した臨床的耐性基準を、個々の患者の耐性検査成績と臨床経過との照合にあてはめたらどうかという問題について、今回得られた範囲での経験を整理する。

表6は毎月の分離培養成績の記載が確実な患者の排菌経過の例示である。表中○で囲んだものが本研究の被検菌株となつており、その耐性度は表の右端に記入されている。

被検菌が10mcg/ml不完全耐性以下の例では、その後において菌の陰性化をみるものが多いのに対し、被検菌が10mcg/ml完全耐性(この表ではそのすべてが100mcg/mlにも完全耐性)の例では、その後陰性化をみるものがない。また陰転例でもその後において再陽転した場合の分離菌は、100mcg/mlにとどく高い耐性を獲得しているといつてよいようであつた。

(6) とくに前項の検討は、一そう多数の例についてより多角的になされるべきものであり、またRFP含有培地の各種条件下における力価の変動についての検討もなお不十分である。さらに一般の日常検査に取り入れられた場合を考えると、培地の作製、接種菌量などの基本条件にさえ、許容範囲の中に収まるという保証が必ずしもないという問題もある。

本報告に提示された、日常的耐性検査法ならびに臨床的耐性基準が、実際の見地からも真に妥当なものといえるかどうかは、より詳細な検討をまつて決定されるべきであるのはいうまでもない。療研がすでに開始している第2段の協同研究が順調に進展することを期待したい。

結 論

RFPに対する結核菌の日常的耐性検査の方法は、結核菌検査指針に記述されている在来の抗結核薬に対する場合と同様に、1%小川培地を用いることとし、RFPの培地添加濃度を10mcg/mlおよび50mcg/mlの2段階とすることが適当であると考えられる。

また、この方法による検査成績に適用すべき臨床的耐

性基準は、10mcg/ml完全耐性(または10mcg/mlおよび50mcg/mlに不完全耐性)以上とすることが適当であると考えられる。

しかし日常的耐性検査法ならびに臨床的耐性基準の確立のために整理された以上のごとき諸条件の妥当性を評価し、必要な改善を加えるためには、一そう詳細な検討に耐えうる大規模な協同研究が実施される必要があると考えられる。

本研究の被検菌株をご提供戴いた多数の療研協同研究参加入院施設の関係者の方々に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 療研:結核, 45:227, 昭45.
- 2) 結核菌検査指針:日本公衆衛生協会発行, 昭39.
- 3) Pallanza, R., Arioli, V., Furesz, S. and Bolzonio, G.: *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 17:529, 1967.
- 4) Rifampicin Symposium (CIBA), 昭44.
- 5) Stottmeier, K. D., Kubica, G. P. and Woodley, C. L.: *Transaction of the 28th VA-Armed Forces Pulm. Dis. Res. Conf.*, 1969.
- 6) Schröder, K. H., Hensel, J. and Scheuch, V.: *Prax. Pneumol.*, 23:683, 1969.
- 7) Karlson, A. G.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 101:765, 1970.
- 8) Hobby, G. L. and Lener, T. F.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 97:713, 1968.
- 9) Verbist, L. and Gyselen, A.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 98:923, 1968.
- 10) 伊藤忠雄・杉山育男・石黒早苗:結核, 45:39, 昭45.

付表. 本研究の検査分担機関一覧

機 関 名	担 当 者
北海道大学結核研究所	有馬 純
東北大学抗酸菌病研究所	岡 捨 己
"	今 野 淳
名古屋大学医学部	山本正彦
京都大学結核胸部疾患研究所	中井 準
大阪大学微生物病研究所	山之内孝尚
広島大学医学部	松尾吉恭
九州大学胸部疾患研究所	篠田 厚
熊本大学医学部	賀来隆二
北里研究所	小川辰次
国立予防衛生研究所	小関 勇一
結核予防会結核研究所	大里敏雄
慶応大学医学部	青柳昭雄
東京大学医科学研究所	福原徳光
国立療養所東京病院	小川政敏
国立神奈川療養所	伊藤忠雄
国立公衆衛生院	川村 達