

## 結核菌の Thiacetazone 耐性に関する研究

第1編 未治療小児結核患者より分離した  
結核菌の Thiacetazone 感受性

大 里 敏 雄

結核予防会結核研究所附属療養所

塚 越 兼 吉・清 水 久 子

結核予防会結核研究所

受付 昭和 45 年 10 月 23 日

## STUDIES ON THIACETAZONE RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI\*

Part I: Thiacetazone Sensitivity of Tubercle Bacilli Isolated from  
Previously Untreated Tuberculous Children

Toshio OHSATO, Kenkichi TSUKAGOSHI and Hisako SHIMIZU

(Received for publication October 23, 1970)

Many workers reported the thiacetazone sensitivity of tubercle bacilli isolated from patients in different countries, such as England, South India, East Africa and Hong Kong. These reports showed that British and East African strains were more sensitive than South Indian and Hong Kong strains to thiacetazone.

This paper presents the sensitivity to thiacetazone of tubercle bacilli isolated from the previously untreated tuberculous children in Japan. The strains were stored in refrigerator after the lyophilization. The ampule containing 5 mg of tubercle bacilli was opened and 5 ml of sterile distilled water was poured in to get 1 mg/ml bacillary suspension. 0.2 ml of 1 mg/ml suspension was inoculated into two Tween Albumin Dubos media and incubated for 10 to 14 days for getting 0.18 to 0.2 density by spectrophotometer. The diluted cultures were inoculated 0.1 ml each on the two slopes of 1% Ogawa's medium containing 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mcg/ml thiacetazone. The inoculum size was  $10^{-3}$  and  $10^{-5}$  mg. The reading was made at 2, 4 and 6 weeks in the  $10^{-3}$  mg inoculation and at 4 and 6 weeks in the  $10^{-5}$  mg inoculation.

The sensitivity to thiacetazone was tested in 40 strains. The results are shown in Tables 1 and 2. Among 40 strains, 11 strains (27.5%) showed 0.5 mcg/ml or less MIC and 20 strains (50%) showed 1 mcg/ml MIC at 4 weeks' reading in the  $10^{-3}$  mg inoculation. 9 strains (22.5%) showed 2 mcg/ml or more MIC. Geometric mean MIC of 40 strains was 0.966 and the value was situated between the value of British, East African and that of South Indian, Hong Kong strains.

The proportion of resistant mutants on thiacetazone containing media was widely different by the strains (Table 2).

Above mentioned test of the sensitivity to thiacetazone was performed by the use of Tibione made in Japan. The comparison of drug activity for tubercle bacilli between Conteben made

\* From the Research Institute Sanatorium, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

in Germany and Tibione made in Japan was done to make sure the activity of Tibione. As seen in Table 3, the activity of both drugs was not different.

In conclusion, the tubercle bacilli isolated from the previously untreated tuberculous children in Japan showed moderate thiacetazone resistance.

## 緒 言

Thiacetazone (Tb1) はかつてわが国でも広く使用されたが現在ではほとんど使用されなくなった。これはより有効でかつ副作用の少ない抗結核薬が漸次開発されたことによるものと思われる。しかし一方、Developing country では初め INH を中心とした治療が行なわれ、その後これに PAS を併用することによつて治療効果が増強されることが報告されたのであるが<sup>1)~3)</sup>、経済的見地から PAS の代りにより安価な併用薬として Tb1 が一部の国で用いられ良好な成績が得られている<sup>4)</sup>。INH・Tb1 療法の導入によつて患者から分離された結核菌株の Tb1 感受性にはかなりの差異のあることが注目された。Joseph ら<sup>5)</sup>は英国人の患者から分離した菌株は南インドの患者から分離した菌株よりも Tb1 感受性が高いことを報告し、Mitchison ら<sup>7)</sup>は英国株と東アフリカ株は Tb1 感受性が高いが、南インドの株、香港の株は Tb1 感受性が低いことを報告している。また Gangadharam ら<sup>8)</sup>はインドの国内においても北方の株は Tb1 感受性が高いが南方の株は感受性が低いことを報告している。

一方わが国における菌株の Tb1 感受性はどうか。このことは Tb1 の治療効果の問題は別としても、細菌学的にも興味のある問題である。

わが国においても Tb1 が臨床的に使用されていたころには Tb1 耐性についての研究は少なくないが、各国あるいは各地域における Tb1 感受性に差異があるかどうかという観点に立つた研究は行なわれていない。今回われわれはこの観点からの研究を実施し、わが国の未治療株の Tb1 感受性の状態を分析したので報告したい。

## 研究 方法

薬剤感受性の研究は未治療例から分離した菌株を使用する必要があるが、小児患者から分離した菌株は最も純粋に薬剤感受性を知りうることは著者らの一人大里ら<sup>9)</sup>が初回耐性の研究の場合に述べたごとくであり、したがつて今回の研究も未治療小児患者から分離した菌株を使用した。

使用菌株：未治療小児結核患者から分離し、凍結乾燥して氷室内に保存した菌株を用いた。これらの菌株は、分離培養あるいは間接法による耐性検査の対照培地に発

育した菌を 1% 小川培地にエーゼで継代し、2 週間前後培養したものから 1% グルタミン酸ナトリウム溶液を用いて 10 mg/ml の菌液を作製し、その 0.5 ml をアンブルに分注し、凍結乾燥を行なつた後 4°C に保存したものである。この凍結乾燥保存菌株群から比較的新しいもの 40 株を用いて Tb1 の感受性を調べた。これら 40 株の SM, PAS, INH に対する耐性は次のごとくである。すなわち 3 剤とも全く耐性のないもの 29 株、医療基準に示された耐性を示すもの 3 株 (SM 100 mcg 完全耐性—No. 5, No. 40, SM 10 mcg 完全、100 mcg 不完全耐性で INH 1 mcg 完全耐性、PAS 1 mcg 不完全耐性—No. 33) で、そのほかに SM 10 mcg にかんがりの菌量の発育をみたもの (No. 9)、INH 0.1 mcg にわずかな菌数の発育を認めたもの 4 株 (No. 16, No. 17, No. 21, No. 31)、PAS 1 mcg に 30 コロニーの発育をみたもの 2 株 (No. 20, No. 22)、SM 10 mcg にかんがり多数の、PAS 1 mcg、INH 0.1 mcg に 20~40 コロニーの菌発育を認めたもの (No. 23) があつた。

Tb1 感受性測定培地：Tb1 を 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mcg/ml に含有する 1% 小川培地を用いた。Tb1 は水にとけないので、プロピレングリコールを用いて 8 mg/ml の原溶液を作製し、その後滅菌蒸留水を用いて、培地添加に必要な Tb1 溶液を作製した。今回の Tb1 含有培地は、以前に製造され室温に保存された邦製チビオン(第一製薬株式会社製)を使用して作製した

Table 1. Thiacetazone Sensitivity of Tubercle Bacilli Isolated from Previously Untreated Tuberculous Children ( $10^{-8}$ mg inoculation)

Minimal inhibitory concentration (mcg/ml)	Time of reading		
	2 weeks	4 weeks	6 weeks
0.25	12	2	
0.5	19	9	5
1	6	20	9
2	3	7	14
4		2	7
8			1
More than 8			4
Arithmetic mean MIC	0.613	1.175	3.49
Geometric mean MIC	0.49	0.966	2.07
Total strain	40	40	40

Table 2. Proportion of Bacillary Growth on Each Thiacetazone Medium  
( $10^{-6}$ mg inoculation)

Strain No.	Viable bacilli inoculated	Time of reading and thioacetazone concentration (mcg/ml)									
		4 weeks				6 weeks					
		0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2	4	
29	63	61.0	—	—	—	69.5	43.9	30.5	—	—	
5	70.5	—	—	—	—	54.8	20.9	—	—	—	
7	70.5	—	—	—	—	100	88.7	28.4	—	—	
19	75	78.3	74.1	—	—	100	92.3	—	—	—	
28	75	—	—	—	—	99.6	—	—	—	—	
18	80	79.3	1.4	—	—	98.6	1.4	—	—	—	
22	80	35.8	—	—	—	100	—	—	—	—	
23	85	66.7	—	—	—	100	45.9	—	—	—	
27	85	86.1	33.7	—	—	100	83.2	49.6	—	—	
17	90	10	—	—	—	50	—	—	—	—	
26	100	100	—	—	—	100	100	0.8	—	—	
9	115	88.5	76.0	—	—	100	100	92.5	85	—	
13	120	—	—	—	—	29	—	—	—	—	
16	120	26.1	—	—	—	73.4	—	—	—	—	
33	120	—	—	—	—	100	—	—	—	—	
12	125	77	20	—	—	100	91.4	29.9	—	—	
14	125	66.7	13.3	—	—	58.2	46.5	38.2	—	—	
38	125	100	100	—	—	100	100	100	—	—	
21	135	100	100	—	—	100	100	100	—	—	
3	160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	160	—	—	—	—	0.9	—	—	—	—	
24	160	85.4	—	—	—	90.3	75.1	3.5	—	—	
15	165	66.6	—	—	—	73.5	59.3	—	—	—	
25	170	100	—	—	—	100	80.7	9.3	—	—	
30	175	98.1	—	—	—	100	88.2	—	—	—	
1	180	100	—	—	—	100	63.2	36.8	—	—	
36	180	100	10	—	—	100	100	10.6	—	—	
37	180	75.8	70.7	40.4	—	79.2	79.2	73.6	45.3	6.6	
2	185	72.8	67.2	—	—	100	100	71.4	—	—	
10	185	88.5	76.0	—	—	100	100	92.5	83	—	
32	200	77.4	69.7	51.6	—	81.4	70.5	70.5	32.1	—	
39	200	43.2	—	—	—	80.5	1.6	—	—	—	
40	215	34.2	—	—	—	100	13.6	—	—	—	
11	250	60	—	—	—	72.8	55.2	—	—	—	
4	255	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
20	265	100	100	—	—	100	100	66.2	—	—	
35	340	—	—	—	—	76.3	—	—	—	—	
6	355	67.8	—	—	—	86.8	81.8	9.3	0.8	—	
34	398	100	100	—	—	100	100	20	—	—	
31	450	73.5	15.1	—	—	75.8	40.3	1.8	—	—	

Arranged in the order of viable bacilli inoculated.

ので、力価の低下がないかどうかをチェックするため第4回目の実験 (No. 31~40 の菌株, No. 5 は再使用) のさいには新たに入手したドイツ製 Conteben を用いて同様の濃度の薬剤を含有する培地を作製し両剤の抗菌力を比較した。

菌液の作製：凍結乾燥して保存された菌株 5 mg を含有するアンプルを開封し、5 ml の滅菌蒸留水を加え振盪して 1 mg/ml の均等菌液とし、その 0.2 ml (0.2 mg) を 2 本ずつの Dubos Tween Albumin 培地に接種し、10~14 日培養のち濁度が 0.18~0.2 (日立 EPO-B, 530 m $\mu$  フィルター, Blanc あり) を示した菌培養を 4 mg/ml と推定し、これを滅菌蒸留水で希釈し 1 mg/ml の菌液を作製する。

菌の接種：上記のようにして作製した 1 mg/ml の菌液を 100 倍に希釈し 0.01 mg/ml の菌液とし、その 0.1 ml を 2 本ずつの Tb1 感受性測定培地に接種し ( $10^{-8}$  mg 接種)、さらに 100 倍に希釈した菌液 ( $10^{-4}$  mg 菌液) の 0.1 ml を 2 本ずつの Tb1 感受性測定培地に接種した ( $10^{-5}$  mg 接種)。また  $10^{-4}$  mg の菌液をさらに 10 倍に希釈した  $10^{-5}$  mg 菌液の 0.1 ml を 2 本の Tb1 非含有培地に接種し接種菌数の測定が可能になるようにした。Tb1 感受性測定培地は各濃度 2 本ずつを使用したので 1 株について  $10^{-3}$  mg 接種で 14 本、 $10^{-5}$  mg 接種で 14 本、 $10^{-6}$  mg で 2 本、計 30 本の培地が使用された。培地の栓は紙巻きの綿栓を使用し、菌接種 1~2 日後に培地表面の乾燥した後にパラフィンで封蠟し培養を続けた。

Tb1 感性の判定：菌を接種した培地は 2, 4, 6 週後に観察した。そして  $10^{-3}$  mg 接種では各観察時の最小発育阻止濃度 (MIC) で、 $10^{-5}$  mg 接種では 4 および 6 週の Tb1 含有培地上の発育菌量を Proportion で示した。

なお 40 株の Tb1 感受性の測定のためには 4 つの培地 Batch を用い 4 回の実験を実施した。

### 研究成績

1)  $10^{-3}$  mg 接種, 2, 4, 6 週判定の Tb1 感受性判定の成績を示すと表 1 のごとくである。4 週判定で 0.5 mcg およびそれ以下の MIC を示したものは 40 株中 11 株 27.5%, 1 mcg の MIC を示したものは 20 株 50%, 2 mcg の MIC を示したものは 7 株 17.5%, 4 mcg の MIC を示したものは 2 株 5% であった。1 mcg およびそれ以上の MIC を示したものは計 29 株 72.5%, 2 mcg およびそれ以上の MIC を示したものは 9 株 22.5% であった。また 4 週判定による 40 株の平均 (幾何平均) の MIC は 0.966 であった。

2)  $10^{-5}$  mg 接種, 4 および 6 週判定による Tb1 含有培地上の発育菌の Proportion は表 2 に示したごとく

である。この表は  $10^{-6}$  mg 接種の生菌数より算定した接種菌量から  $10^{-5}$  mg 接種の場合の生菌数に換算し、接種菌量の少ないものから多いもの順に示した。表でみるように接種菌数は 63~450 コの間に分布するが、100~185 コの菌量の株が最も多く 20 株を示している。Tb1 の各濃度含有培地における発育菌の Proportion のパターンは表のように菌株によつて著しい差が認められる。菌株間の差は 6 週判定で一そう著しくなっている。

3) 邦製チビオンとドイツ製 Conteben の抗菌力の比較：長期に保存した Tb1 の抗結核菌力が新たに入手した Conteben に比して低下していないかどうかを検討した成績は次の表 3 a, b に示した。表 3 a は  $10^{-6}$  mg 接種 4 週判定の、表 3 b は 6 週判定の場合の各 Tb1 濃度含有培地上に発育した菌の Proportion を示したが、表にみるように両剤の抗菌力にはほとんど差が認められない。むしろ邦製 Tb1 の抗菌力のほうがごくわずかではあるが強く表現されているように見える。 $10^{-3}$  mg 接種による MIC も両剤間に差は認められなかった。

### 考案

未治療結核患者から分離した結核菌の Tb1 感受性は一様でなく、また Tb1 感受性の分布は国により地域により差のあることが Joseph ら<sup>9)</sup>, Mitchison ら<sup>7)</sup> によつて報告され、その後もさらに Mitchison<sup>10)</sup>, Grosset ら<sup>11)</sup>, Lefford ら<sup>12)</sup> によつて研究され、英国株、東アフリカ株、アルジェリア株は Tb1 に対して比較的高い感受性を示すが、南インド株、香港株の Tb1 感受性は低いと報告されている。Mitchison ら<sup>7)</sup> の 1964 年の報告では  $10^{-2}$  mg 接種 4 週判定による Tb1 の MIC の幾何平均値は、英国株は 0.66, 東アフリカ株は 0.64 であるのに対し、インド株は 1.4, 香港株は 2.2 であった。また Lefford ら<sup>12)</sup> は東アフリカ株の Tb1 の MIC の幾何平均値は 0.48 であったことを報告している。

これらの成績はいずれも Loewenstein-Jensen 培地を用いた研究であり、著者らの 1% 小川培地とは使用培地が異なっているが、接種菌量は  $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$  mg で、判定はいずれも 4 週に行なわれている。Mitchison ら<sup>7)</sup> の報告のうち Standard MIC というのは  $10^{-2}$  mg 接種の場合であるが、接種生菌数からみると著者らの  $10^{-3}$  mg 接種より多少多い程度の接種菌量であるので、今回のわれわれの成績と比較することが可能であろう。われわれの 4 週判定による MIC の幾何平均値は 0.966 であり、これは英国株に比して高い MIC を示しているが、インド株、香港株より低い値を示している。MIC の平均値でみる限りでは、わが国の菌株の Tb1 感受性のパターンは英国・東アフリカ株とインド・香港株の中間にあるといえよう。また 2 mcg およびそれ以上の MIC を示した株の割合をみると、英国株は 23 株中 6 株 20%, アフ

Table 3a. Proportion of Bacillary Growth on Thiacetazone (made in Japan) and Conteben (made in Germany) Containing Media (4 weeks' reading)

Strain No.	Viable bacilli inoculated	Thiacetazone (mcg/ml)				Conteben (mcg/ml)			
		0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
5	170	100	—	—	—	95.2	5.2	—	—
31	450	75.3	15.1	—	—	75.2	51.2	—	—
32	200	77.4	69.4	51.6	—	96.7	83.9	77.4	—
33	120	—	—	—	—	—	—	—	—
34	398	100	100	—	—	100	60	—	—
35	340	—	—	—	—	11.5	—	—	—
36	180	100	10	—	—	100	10	—	—
37	180	75.8	70.7	40.4	—	63.6	82.8	25.3	—
38	125	100	100	—	—	100	100	—	—
39	200	43.2	—	—	—	81.8	—	—	—
40	215	34.2	—	—	—	34.2	—	—	—

Table 3b. Proportion of Bacillary Growth on Thiacetazone (made in Japan) and Conteben (made in Germany) Containing Media (6 weeks' reading)

Strain No.	Viable bacilli inoculated	Thiacetazone (mcg/ml)						Conteben (mcg/ml)					
		0.25	0.5	1	2	4	8	0.25	0.5	1	2	4	8
5	170	100	100	—	—	—	—	100	87.8	—	—	—	—
31	450	75.8	40.3	1.8	—	—	—	64.5	66.7	15.2	—	—	—
32	200	81.4	70.5	70.5	32.1	—	—	96.1	96.1	97.4	76.4	—	—
33	120	100	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—
34	398	100	100	20	—	—	—	100	80	12	—	—	—
35	340	76.3	—	—	—	—	—	95.4	0.8	—	—	—	—
36	180	100	100	10.6	—	—	—	100	100	21.3	—	—	—
37	180	79.2	79.2	73.6	45.3	6.6	—	64.2	82	53.8	76.4	76.4	50
38	125	100	100	100	—	—	—	100	100	100	7.1	—	—
39	200	80.5	1.6	—	—	—	—	83.8	21.6	—	—	—	—
40	215	100	13.6	—	—	—	—	100	100	—	—	—	—

リカ株は25株中2株8%に対し、インド株は36株中14株47%、香港株は48株中26株54%である<sup>7)</sup>。また1968年のMitchisonの報告<sup>10)</sup>はそれぞれ11%、36%と83%、58%が2mcgおよびそれ以上のMICを示したという。これに対しわれわれの成績では2mcgおよびそれ以上のMICを示した株は22.5%であり、これは英国株とインド株のはぼ中間のTb1感受性と考えてよいと思われ、前述のMICの平均値と比較した場合と同様の結果であった。わが国では福原ら<sup>13)</sup>が71株の未治療株のTb1感受性を調べているが、うち36株は1mcgおよびそれ以上のMICを示している(われわれの成績は72.5%が1mcgおよびそれ以上のMICを示した)。

以上のように未治療例から分離した結核菌株のTb1感受性のパターンは、国によつて異なるが、同じ国、同じ

地域においても菌株によつてTb1感受性は非常に差異のあることが明らかである。10<sup>-5</sup>mg接種によるTb1耐性菌の含有率からみても菌株間の差は明らかである。

今回のわれわれの実験は永く保存していた邦製チピオンを用いたので、抗菌力の低下がないかどうかについて懸念があつたが、新たに入手したContebenと比較した結果、保存による抗菌力の低下はなかつたことが判明した。

結 論

未治療小児結核患者より分離し凍結乾燥して保存した結核菌40株を用い、そのDubos培養菌の10<sup>-3</sup>mg、10<sup>-5</sup>mgを接種し、Tb1感受性の状態を調べた。その結果次の結論を得た。

1)  $10^{-8}$  mg 接種 4 週判定による MIC の幾何平均値は 0.966 で、諸家の報告と比較すると、英国・東アフリカ株とインド・香港株の中間の MIC を示した。

2) 0.5 mcg およびそれ以下の MIC を示したものは 27.5%, 1 mcg の MIC を示したものは 50%, 2 mcg のものは 17.5%, 4 mcg の MIC を示したものは 5% であった。

3)  $10^{-6}$  mg 接種の場合の Tb1 耐性菌の含有率は菌株によつて著しい差異が認められた。

4) Tb1 とドイツ製 Conteben の抗菌力はほとんど同程度であつた。

本研究の要旨は第 24 回実験結核研究会総会および第 45 回日本結核病学会総会において大里が報告した。

#### 文 献

- 1) A Co-operative Investigation in East Africa Hospitals and Laboratories with the Collaboration of the British Medical Research Council: *Tubercle*, 40 : 1, 1959.
- 2) do: *Tubercle*, 41 : 83, 1960.
- 3) Tuberculosis Chemotherapy Centre, Madras: *Bull. Wld Hlth Org.*, 23 : 535, 1960.
- 4) A Co-operative Investigation in East Africa Hospitals and Laboratories with the Collaboration of the British Medical Research Council: *Tubercle*, 41 : 399, 1960.
- 5) Co-operative Studies in East African Hospitals and Laboratories with the Collaboration of the East African and British Medical Research Councils: *Tubercle*, 44 : 301, 1963.
- 6) Joseph, S., Mitchison, D. A., Ramachandran, K., Selkon, J. B. and Subbaiah, T. V.: *Tubercle*, 45 : 354, 1964.
- 7) Mitchison, D. A. and Janet Lloyd: *Tubercle*, 45 : 360, 1964.
- 8) Gangadharam, P. R. J. (with Devaki, V. and Mohan, K.): *Tubercle*, 49 (Supplement) : 48, 1968.
- 9) 大里敏雄・本原和郎・岩崎龍郎・島尾忠男・福島清・山登淳伍・樋田豊治・清水寛・黒丸五郎・新津泰孝・最上修二・塩沢精一・山下英秋・日比野進・小林裕・杉山浩太郎・篠島四郎: *結核*, 43 : 431, 昭 43.
- 10) Mitchison, D. A.: *Tubercle*, 49 (Supplement) : 38, 1968.
- 11) Grosset, J. (with Rodrigues, F., Benhassine, M., Chaulet, P. and Larbaoui, D.): *Tubercle*, 49 (Supplement) : 46, 1968.
- 12) Lefford, M. J., Dickinson Jean, M. and Mitchison, D. A.: *Tubercle*, 50 : 1, 1969.
- 13) Fukuhara, Y., Kobayashi, H., Hokama, S.: *Jap. J. Tbc. & Chest Dis.*, 16 : 57, 1970.