

結核菌のThiacetazone耐性に関する研究
第3編 ThiacetazoneとEthionamideの交叉耐性に関する研究

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 III. Cross Resistance between Thiacetazone and Ethionamide

Toshio OHSATO, Kenkichi TSUKAGOSHI and Hisako SHIMIZU

(Received for publication October 23, 1970)

The cross resistance between thiacetazone and ethionamide was reported by many workers. This paper presents the ethionamide sensitivity of Japanese strains isolated from previously untreated tuberculous children according to different thiacetazone MIC. The results of in vitro experiment using thiacetazone resistant H₃₇R_V and ethionamide resistant H₃₇R_V were also reported.

The Dubos Tween Albumin culture of six strains which showed the different thiacetazone MIC—0.25 mcg/ml MIC : No. 3 ; 0.5 mcg/ml MIC : No. 8 ; 1 mcg/ml MIC : No. 7 ; 2 mcg/ml MIC : No. 10 ; 4 mcg/ml MIC : No. 9 ; 8 mcg/ml MIC : No. 6—were inoculated 10⁻³ mg and 10⁻⁵ mg on ethionamide containing media (1% Ogawa's media). The drug concentrations of ethionamide tested were 12.5, 25 and 50 mcg/ml.

The sensitivity for thiacetazone and ethionamide of thiacetazone resistant H₃₇R_V or ethionamide resistant H₃₇R_V was examined by using 1% Ogawa's media. The bacillary suspension was prepared by grinding the culture on 1% Ogawa's media and by adding the sterile distilled water to get 1 mg/ml. The drug concentrations tested were as follows: thiacetazone—0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mcg/ml; ethionamide—0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 mcg/ml. The inoculum size of test strains was 10⁻¹, 10⁻³ and 10⁻⁵ mg. The reading of bacillary growth on the media was made at 3 and 4 weeks after the inoculation.

The ethionamide sensitivity of the strains isolated from the previously untreated tuberculous children was shown in the Figure in relation to thiacetazone resistance. As seen in this figure, all of the strains which showed different thiacetazone resistance were inhibited their growth on 50 mcg/ml ethionamide containing media at 4 weeks' reading. Therefore, the relationship between thiacetazone and ethionamide sensitivity was not observed among the strains isolated from previously untreated patients.

The thiacetazone and ethionamide sensitivity of thiacetazone resistant H₃₇R_V and ethionamide resistant H₃₇R_V was shown in Table 1. by the proportion of resistant bacilli on each concentra-

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

tion of both drugs. The number of viable bacilli grown on the media inoculated with 10^{-6} mg were shown in Table 2. The thiacetazone resistant strain showed the same sensitivity for ethionamide compared with original H₃₇R_V through 3 times examinations. On the other hand, the ethionamide resistant strain showed the slight decrease in the sensitivity for thiacetazone.

As mentioned above, the thiacetazone resistant strain did not show the cross resistance to ethionamide in vitro examination. But some workers reported the cross resistance between both drugs in vivo. Therefore, the conclusion about the cross resistance between both drugs should be made after the examination of tubercle bacilli isolated from the patients who were treated with thiacetazone or ethionamide.

緒 言

抗結核薬の間には交叉耐性の認められるものがある。KM と CPM および VM の間の交叉耐性は広く認められているが、交叉耐性的程度はもとの薬剤の耐性度とも関連して差異が認められる¹⁾。新しい抗結核薬として現在研究の進行している Tuberactinomycin は VM と^{2)~5)}, Lividomycin は KM とほぼ完全な、CPM とは不完全な交叉耐性を示しており⁶⁾⁷⁾、これらの薬剤間の交叉耐性はますます複雑さを増してきている。また SM 耐性菌に対して VM は交叉耐性はないが、VM 耐性菌に対して SM は交叉耐性を示すことが報告されている⁸⁾。また著者らの一人塙越は INH 耐性菌に対して Ethionamide (TH) 感性の低下は認められないが、TH 耐性菌に対して INH の感性低下の認められることを報告している^{9)~11)}。

これらの報告の多くは試験管内で作製した耐性菌を用いての実験であるが、患者株を用いる実験は困難な場合が多く、そのため交叉耐性の問題を根本的に解明することができないことがある。著者ら¹⁾の KM 耐性菌に対する VM と CPM の抗菌力の研究の場合は、VM, CPM 未使用の KM 耐性株を得ることは比較的容易であつた。しかし、KM, CPM 未使用で VM 耐性となつた株、あるいは KM, VM 未使用で CPM 耐性となつた株を集めることは難しく、これら 3 剤間の交叉耐性の研究をさらに進展させることは困難であつた。また SM と VM の間の交叉耐性、INH と TH の間の交叉耐性の研究をすすめる場合も同様な困難に直面する。

今回われわれが取り上げた Thiacetazone (Tb 1) と TH の交叉耐性の研究も、わが国においては Tb 1 耐性を獲得した患者株を得ることが困難であり、試験管内実験によらざるをえなかつた。わが国では現在 Tb 1 はほとんど使用されていないので臨床的に大きな問題になる可能性は少ないが、今回わが国の未治療菌株の Tb 1 感受性の分布¹²⁾、モルモットに対する毒力と Tb 1 感受性の関係¹³⁾を検討したのを機会に、代表的な Tb 1 感受性

を示した菌株の TH 感受性と、試験管内で Tb 1 あるいは TH に耐性を獲得させた菌株を用いて両剤間の交叉耐性を検討したので報告する。

研究方法

未治療株の Tb 1 感受性と TH 感受性の関係の検討：第 1 編の研究¹²⁾に用いた 40 株の未治療小児株のうち、 10^{-8} mg 接種、4 週判定による Tb 1 の MIC がそれぞれ 0.25 mcg/ml (No. 3), 0.5 mcg/ml (No. 8, 1 mcg/ml (No. 7), 2 mcg/ml (No. 10), 4 mcg/ml (No. 9), 8 mcg/ml (No. 6) を示した 6 株を選び、その Dubos 培養菌の 10^{-8} mg および 10^{-6} mg を TH 12.5, 25, 50 mcg/ml に含有する 1% 小川培地 2 本ずつに接種し、3 週、4 週、6 週後に TH 含有培地上の菌発育状況を観察し TH の MIC を判定した。

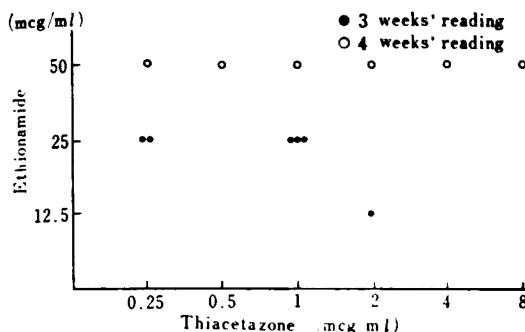
試験管内で作製した Tb 1 耐性菌あるいは TH 耐性菌の交叉耐性的検討：漸次高濃度の薬剤を含有する 1% 小川培地に継代することによって得られた Tb 1 50~100 mcg/ml、あるいは TH 500~1,000 mcg/ml 耐性 H₃₇R_V を用いた。1% 小川培地に継代後 14 日前後の Tb 1 耐性 H₃₇R_V および TH 耐性 H₃₇R_V の菌集落をかきとり、摩碎フラスコを用いて 1 mg/ml の菌液を作製した。第 1 回実験はその 10^{-1} mg および 10^{-3} mg を (10^{-6} mg は薬剤非含有培地のみに接種)、第 2 回実験では H₃₇R_V の原株も含め 3 種の菌株の 10^{-1} mg, 10^{-3} mg を (10^{-6} mg は薬剤非含有培地のみに接種)、第 3 回実験では H₃₇R_V, Tb 1 耐性 H₃₇R_V, TH 耐性 H₃₇R_V の 10^{-1} mg, 10^{-3} mg, 10^{-6} mg を Tb 1 および TH 含有 1% 小川培地 2 本ずつに接種した。

Tb 1 含有培地の薬剤濃度は 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500 mcg/ml、TH 含有培地の薬剤濃度は 0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 mcg/ml である。

研究成績

- 1) 未治療株の Tb 1 感受性と TH 感受性の関係
代表的な Tb 1 感受性を示した 6 株の小児株の TH 感

Fig. Sensitivity of Wild Strains (Isolated from previously untreated tuberculous children) for Thiacetazone and Ethionamide (6 strains) (10^{-5} mg inoculation)



感受性を3週および4週に判定した成績は図に示したごとくである。3週判定で1株はTH 12.5 mcg/ml, 5株は25 mcg/ml で発育を阻止され、4週判定では6株とも50 mcg/ml で発育を阻止された。以上のように未治療株の Tb1 感受性と TH 感受性の間には全く関連のないことが判明した。

2) 試験管内で作製した Tb1 あるいは TH 耐性- $H_{37}R_V$ 株の交叉耐性

3回の実験を通じてみると薬剤含有培地における菌発育の状況はかなりの変動が認められる。3回の実験成績を一括し薬剤非含有培地上に発育した菌数に対する各薬剤濃度に発育した耐性菌数の Proportion として示したのが表1である。この成績からみると、実験に使用した Tb1 耐性 $H_{37}R_V$ 株の Tb1 耐性は 25 mcg/ml に完全

Table 1. Proportion of Bacillary Growth on each Thiacetazone and Ethionamide containing Medium (mcg/ml)

Strain	$H_{37}R_V$			Tb1-R- $H_{37}R_V$			TH-R- $H_{37}R_V$		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Thiacetazone	1	/	100	0.1	100	100	100	100	100
	5	/	1	"	"	"	2	100	
	10	/	0.02	"	"	"	2	80	
	25	/	0.01	100	"	100	1		
	50	/		5	"	70			
	100	/		2.5	100	20			
Ethionamide	500	/		/	/	(-)			
	12.5	/	/	1	/	/	17	100	100
	25	/	0.3	0.1	2	0.3	<0.1	"	"
	50	/					"	"	"
	100	/					100	100	80
	250	/					1	80	/
	500	/					1	40	60
	1,000	/					(-)	(-)	20

/ Not tested

耐性、50 mcg, 100 mcg/ml に不完全耐性を示したが、TH に対する感受性は3回の実験とも原株の $H_{37}R_V$ の TH 感受性と大きな差異は認められず、試験管内で Tb1 耐性とした $H_{37}R_V$ 株の TH 感受性の低下は認められなかつた。

一方、TH 耐性 $H_{37}R_V$ 株の TH の耐性度は3回の実験を通じてかなりの変動が認められるが、TH 耐性株の Tb1 感受性もかなり変動している。また原株の $H_{37}R_V$ の Tb1 感受性も第2, 第3回の実験間でかなりの差異が認められる。しかし第2, 第3回の実験に用いた TH 耐性株の Tb1 感受性は原株の Tb1 感受性に比べて若干低下している傾向が認められる。3回の実験における各菌株の接種菌数は次の表2に示したが、第2, 第3回の実験とも TH 耐性株の接種生菌数はかなり少ないが、それにもかかわらず原株の $H_{37}R_V$ の Tb1 耐性菌の Proportion よりも高い Proportion を示している。しかしこの成績からただちに in vitro の TH 耐性菌は Tb1 に対して交叉耐性があると結論することは困難であろうと思われる。

Table 2. Number of Bacillary Growth on the Drug-free Media Inoculated with 10^{-5} mg Dose

Kind of bacilli tested	Experiment		
	I	II	III
$H_{37}R_V$	/	391	226.5
Tb1-R- $H_{37}R_V$	365	282	69
TH-R- $H_{37}R_V$	263.5	30	49.5

考 案

未治療株の Tb1 感受性と TH 感受性の間には関係がないという成績は東アフリカ株について Lefford¹⁴⁾ が報告しており、わが国でも東村ら¹⁵⁾が同様の成績を報告している。今回われわれは Tb1 の MIC がそれぞれ 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mcg/ml であった 6 株の未治療小児株の TH 感受性を 1% 小川培地を用いて検査したが、4週判定で6株とも 50 mcg/ml で発育を阻止された。すなわち未治療株においては Tb1 感受性と TH 感受性は全く関連がないと考えられる。

一方 in vitro で耐性を獲得させた菌の場合は、Tb1 耐性株の TH 感受性は低下しないが TH 耐性株は Tb1 耐性を示したことを吉田¹⁶⁾が報告している。今回のわれわれの成績でも Tb1 耐性菌の TH に対する感受性は低下していなかつた。しかし TH 耐性株は Tb1 に交叉耐性があるといえるほどの結果を得ることはできなかつた。

以上のような未治療株、in vitro 作製の耐性株と異なり、Tb1 服用によつて Tb1 耐性となつた菌の 45%

は TH 耐性であり、TH 服用により TH 耐性となつた菌株の 86% は Tb 1 耐性であったことが吉田¹⁶⁾によつて報告されている。Bartmann¹⁷⁾は人体内では Tb 1 と TH の両側方向の交叉耐性が成立するといい、Eule¹⁸⁾は TH 治療を行なつた患者の菌は 100% に Tb 1 耐性であり、Tb 1 治療患者株の 85.5% は TH 耐性であったことを報告している。

Tb 1 と TH の交叉耐性は未治療株、in vitro で耐性とした株、in vivo で耐性となつた株（患者分離株）は耐性という現象は同じように表現されてもその他の性状に差異があると見えられる。

この差異がどのようなものであるかを解明することは単に Tb 1 と TH の間の交叉耐性のみでなく、他の抗結核薬間の交叉耐性の問題を検討するための手掛りとなるのではないかと考えられるが、これは今後の多くの研究に待たねばならないであろう。

結論

Tb 1 に対して 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mcg/ml の MIC を示した未治療小児株 6 株の TH 感受性を検査し、また in vitro で耐性とした H₃₇R_V を用いて 3 回の実験を行ない Tb 1 と TH の間の交叉耐性の問題を検討し以下の結論を得た。

- 1) 未治療株の TH 感受性は Tb 1 の MIC に関係なく 1% 小川培地では 50 mcg/ml で発育を阻止された。
- 2) Tb 1 耐性 H₃₇R_V の TH に対する感受性には、低下が認められなかつた。
- 3) TH 耐性 H₃₇R_V の Tb 1 に対する感受性は、原

株に比べて、若干の低下が認められるが、結論を出すことは難しかつた。

本研究の要旨は第 24 回実験結核研究会総会、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) 大里敏雄・清水久子：結核，41：297，昭 41.
- 2) 豊原希一：結核，43：245，昭 43.
- 3) 大里敏雄・豊原希一：結核，46：59，昭 46.
- 4) 五味二郎・青柳昭雄・鳥飼勝隆・山田幸寛・前野忠彦：第 45 回日本結核病学会総会演説.
- 5) 小関勇一・安地節・岡本花宏：結核，45：461，昭 45.
- 6) 永田彰・高島常二・大井薰・酒井朝英：結核，45：461，昭 45.
- 7) 山本和男・桜井宏・井上幾之進・山上清・山口亘：結核，45：462，昭 45.
- 8) 工藤禎・工藤祐是：結核，41：502，昭 41.
- 9) 塚越兼吉：日本衛生検査技師会雑誌，14：59，昭 40.
- 10) 同上：日本衛生検査技師会雑誌，14：391，昭 40.
- 11) 同上：衛生検査，17：70，昭 43.
- 12) 大里敏雄・塚越兼吉・清水久子：結核，46：65，昭 46.
- 13) 同上：結核，46：83，昭 46.
- 14) Lefford, M. J. : Tubercl., 50 : 7, 1969.
- 15) 東村道雄・河西栄文：日本胸部臨床，20：671，昭 36.
- 16) 吉田誠：長崎医学会雑誌，42：458，昭 42.
- 17) Bartmann, K. : Tbk-Arzt, 14 : 525, 1960.
- 18) Eule, E. : Zeit. f. Tbk., 123 : 36, 1965.