

結核菌の Rifampicin 耐性の境界値

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 46 年 10 月 23 日

CRITICAL CONCENTRATION FOR DEFINITION OF RIFAMPICIN
RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI*

Michio TSUKAMURA

(Received for publication October 23, 1971)

Critical concentration for defining rifampicin resistance of tubercle bacilli in sputa of patients was studied in the Ogawa egg medium.

The critical concentration should be determined by considering two points; (i) distribution of the degree of resistance in patients previously untreated with the agent, excluding presence of cross-resistance with a drug previously used and of natural resistance¹⁶⁾ and (ii) pattern of resistance development. Critical concentration should be higher than the upper limit of distribution of resistance degrees in patients previously untreated, and should be higher than a low level of resistance, that is, be selective for low-resistant mutants, which are shown by tubercle bacilli after administration of drug.

Methods

The degree of resistance was determined by the "actual count" method^{7)~9)} and by routine method. In the former, it was expressed as the highest concentration of a drug, on which an inoculum consisting of 20 to 100 viable units per medium could form colonies after incubation at 37°C for 4 weeks (if no growth occurs on control medium containing no drug, after 6 weeks). In the latter, one loopful of the test strain was inoculated to test media, and the degree of resistance was expressed as the highest concentration on which growth similar to that on the control medium could be observed after incubation for 4 weeks. The tests were carried out every month.

The patients who were the subjects of observation had had far-advanced pulmonary tuberculosis with chronic, sclerotic-walled cavities and had been excreting tubercle bacilli showing multiple drug resistances, including at least isoniazid and ethambutol. The patients received administration of triple chemotherapy, rifampicin (0.45 g per day, daily or twice weekly) + isoniazid (0.3 g per day, daily) + ethambutol (0.75 g per day, daily). The drugs were administered once a day in the morning for 6 months.

Results

1. Distribution of the degree of rifampicin resistance of tubercle bacilli, measured by the "actual count" method, in patients previously untreated with rifampicin

It is shown in Table 1. The degree of resistance varied from 1.57 $\mu\text{g/ml}$ or less to 12.5 $\mu\text{g/ml}$. Resistance to less than 1.57 $\mu\text{g/ml}$ was observed in dysgonic strains only, that is, in strains showing no growth on the control medium after 4 week-incubation. Variation in the degree of resistance was, thus, 1 : 8 (1.57 $\mu\text{g/ml}$: 12.5 $\mu\text{g/ml}$). This value was less than that

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-Prefecture 474 Japan.

in ethionamide resistance (1:20) but much more than those observed in kanamycin resistance (1:2) or ethambutol resistance (1:2).

When the degree was measured by routine method, it was at most 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (Table 2). Extension of incubation period from 4 weeks to 6 weeks did not produce growth on the medium containing 25 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin (Tables 3 and 4). Acid-fast organisms showing full resistance to 25 $\mu\text{g/ml}$ were identified as atypical mycobacteria (Table 5). Thus, the critical concentration for rifampicin resistance was considered to be 25 $\mu\text{g/ml}$.

2. Pattern of resistance development of tubercle bacilli to rifampicin

When the patients were administered with rifampicin+isoniazid+ethambutol (tubercle bacilli of the patients were resistant to the latter two drugs before administration), the degree of resistance to rifampicin increased rapidly until a level of 200 $\mu\text{g/ml}$ or more at 2 to 3 months. The rise occurred suddenly and no intermediate step was observed (Table 6). Emergence of resistance to 25 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin, measured by the "actual count" method as well as by the routine method, resulted at the same time development of resistance to 200 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin or more. This finding agreed well with our previous observation that the pattern of resistance development to rifampicin SV in tubercle bacilli is a single-step pattern¹³⁾ and with observation of Canetti *et al.*¹⁴⁾ on rifampicin resistance.

Conclusion

In view of the above results, it has been recommended that full resistance to 25 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin in routine method or resistance to the same level in "actual count" method are suitable as the critical concentration. No clinical effect of rifampicin is expected if tubercle bacilli showed resistance to this level.

Remark: The composition of the Ogawa egg medium is as follows: Basal solution (1% KH_2PO_4 and 1% sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% malachite green solution, 6 ml (resulting pH 6.8). The medium is poured in 8 ml quantities into tubes and made as slopes by sterilization at 95°C for 60 minutes.

抗結核剤 Rifampicin (RFP) が発表されてからすでに数年となり、広く臨床の用に供せられるようになった。それに伴って、RFP 使用時の「臨床耐性」(RFP 投与によつて菌陰転が不可能で、かつ著明な臨床効果が得られない状態)の境界値を決定することが実用的な問題となつてきた。RFP を使用しない患者の結核菌の RFP 感受性については、Pallanza *et al.*¹⁾、Verbist & Gyselen²⁾ の報告があり、いずれも Löwenstein-Jensen 培地で RFP 5 $\mu\text{g/ml}$ で阻止されるとしている。それ以後、患者結核菌の RFP 感受性について多数の報告があるが、実際に RFP を使用したさいの耐性発現に関する報告はきわめて少ない。外国では、Nitti *et al.*³⁾ の報告その他がある。わが国では、日結研⁴⁾、療研⁵⁾、岡など⁶⁾ の報告があるが、どの程度の耐性出現をもつて「臨床耐性」とみなすかについては結論がでない。このような状況にかんがみ、本報では、1% 小川培地を使用したさいの「臨床耐性」の境界値について観察した結果を報告することとした。

研究方法

1. RFP 耐性検査

1% 小川培地 (8 ml 分注) を用い、薬剤の使用濃度は次の 2 系列を用いた。

(1) RFP 投与前の患者については次の系列を用いた。RFP 1.57, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$; Ethambutol (EB) 2.5, 5.0 $\mu\text{g/ml}$; INH 0.1, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) RFP 投与開始後の患者に使用した系列は次の通りである。RFP 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$; EB 2.5, 5.0 $\mu\text{g/ml}$; INH 0.1, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

以上の両方に、薬剤を含まない対照培地を加えた。

RFP はまず propylene glycol に溶解して 20 mg/ml の溶液を作り、これを propylene glycol で希釈して所用濃度の 100 倍液とし、1% 小川培地 100 ml に RFP 液 1.0 ml を添加した。EB 液および INH 液は蒸留水で作成し、1% 小川培地 100 ml に 1.0 ml ずつ添加した。

添加後、中試験管に 8 ml ずつ分注し、95°C 60 分滅菌によつて斜面とした。

検査法は特記しない限り、原則として「間接法」によつた。被検菌としては、1% 小川培地に 37°C 4 週または 8 週培養した菌を用いた。

耐性検査には、「Routine 法」と「Actual Count 法」⁷⁾ の 2 方法を併用した。

Routine 法では、被検株を 1 白金耳ずつ耐性検査培地に塗抹接種し、ゴム栓を施して、37°C 4 週培養後に発育を判定した。判定は、RFP 培地に対照とほぼ同様の発育を認めた場合、その培地の RFP 濃度を耐性度とした。対照培地に膜状発育、耐性培地に薄膜状発育の場合は、薄膜発育の濃度をとつた。

「Actual Count 法」は、被検株をガラス玉ゴルベンに入れて 10 分間振盪して均一化し、これに生食水を加えて約 10 mg/ml の菌液を作り、これを生食水で 10⁻⁵ まで希釈した。したがつて接種菌液は 10⁰ ないし 10⁻⁵ の 6 種である。耐性培地の各系列におのおの別の菌液を 0.02 ml ずつ渦巻白金耳で塗抹し、ゴム栓をして、37°C 4 週後に発育を観察した。耐性度は、対照培地に 20~100 集落を示す系列で、発育の起こつた最高濃度をとつた。4 週後に集落が微小で集落数が数えられない場合（患者株ではまれではない）、6 週後に同じように判定した。

2. 患者および薬剤投与法

観察対象は国立療養所中部病院入院中の排菌患者で、学研分類基本病変が B₃, C₃, BC₃ (far-advanced) であり、過去 6 カ月間毎月排菌（塗抹および培養）しているものを選んだ。これらはもちろん空洞 (K_{Y1}~K_{Y3}) を有し、少なくとも INH 0.1 μg/ml 以上「完全耐性」、EB 2.5 μg/ml 以上「完全耐性」のものであつた。この耐性成績は、RFP 投与前に行なつた「Actual Count 法」で確認した。ほとんど全部の患者が全抗結核剤耐性で、少数の例外は、KM または CPM 投与を長期間行なつても耐性が出現しない例であつた。

化学療法は、RFP・INH・EB の 3 者併用療法を行なつた。INH および EB には、すでに耐性が発現しているから、RFP 単独療法といえる。投与法は、RFP 0.45 g, INH 0.3 g, EB 0.75 g を 1 回量とし、1 日 1 回、食後 30 分に毎日投与した。治療は 6 カ月間継続した。RFP の投与を食後としたのは、患者が重症であるため、食前投与が困難と思われたことと、あらかじめ食前 30 分投与と食後 30 分投与とで RFP 血中濃度を測定した結果、血中濃度の peak に著明な差がないと認めたためである。

研究結果

1. RFP 未使用患者結核菌の RFP 耐性

「Actual Count 法」で接種生菌数を (20~100 生菌単

位/培地) に規制して測定した耐性度の分布は表 1 に示す通りである。すなわち RFP 耐性度の変動範囲は 4 週判定で 1.57~12.5 μg/ml (1:8) である。耐性度の上限は 12.5 μg/ml である。

次に Routine 法で RFP 未使用者 68 例の RFP 耐性度を測定した結果も表 2 に示す通り、耐性度は 12.5 μg/ml を越えない。「Actual Count 法」と Routine 法とでは耐性度の読みは大抵の場合一致するが、時に Routine 法のほうが高い値を示すことがある。この現象は、「偽耐性」¹⁰⁾ によるもので、発育が遅れた感性菌によるものである。証拠に一段高い濃度に発育した薄膜の耐性度を「Actual Count 法」で測定すると感性菌と同じ耐

Table 1. Degree of Rifampicin Resistance in Strains of Tubercle Bacilli Isolated from Patients Previously Untreated with Rifampicin

Degree of rifampicin resistance	Number of strains
<1.57 μg/ml	4*
1.57	13
3.13	12
6.25	7
12.5	1**
25.0	0
Total	37

Degree of rifampicin resistance was measured by the "actual count" method⁷⁻⁹⁾. The degree was read as the highest concentration on which a small inoculum (20 to 100 viable units) could grow after incubation at 37°C for 4 weeks. The medium used is the Ogawa egg medium, and the concentrations of rifampicin used are as follows: 0, 1.57, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 μg/ml.

* Dysgonic strains showing no growth at 4 weeks. Growth was read in these strains at 6 weeks.

** Small colonies.

Table 2. Comparison between Routine Method and "Actual Count" Method for Measurement of Rifampicin Resistance of Tubercle Bacilli from Patients Previously Untreated with Rifampicin

		"Actual count" method (μg/ml)		
		≤6.25	12.5	25.0
Routine method (μg/ml)	≤6.25	64	0	0
	12.5	3*	1	0
	25.0	0	0	0

The concentrations of rifampicin used are as follows: Rifampicin, 0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 μg/ml; Ethambutol, 2.5, 5.0 μg/ml; Isoniazid, 0.1, and 1.0 μg/ml. The medium used is the Ogawa egg medium.

In routine method, one loopful of the test strain was inoculated to test media and growth was observed after incubation at 37°C for 4 weeks. Occurrence of growth similar to that on control medium was regarded as resistance to a concentration, on which the test organism could grow.

性度を示す。要するに、RFP 耐性度の測定にさいしては、接種生菌数の大小による読みの変動は比較的少ないといえる。

次に培養時間の耐性度の読みに与える影響をみると、「Actual Count 法」でも Routine 法でも、4 週判定よりも 6 週判定で耐性度読みが高くなる (表 3, 4)。この現象は、いわゆる発育阻止濃度付近では、RFP は決して殺菌的ではなく、たんに発育が遅延しているにすぎないことを示している。この発育遅延作用が「偽耐性」の原因でもある。すなわち、菌がばらばらにまかれていると個々の菌からの発育は微小集落にとどまり可視域に入っていないが、大菌量で接種されると微小集落が集積し

Table 3. Comparison of the Degree of Rifampicin Resistance between 4 Week- and 6 Week-readings (Measurement by the "actual count" method)

		Degree of rifampicin resistance($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		Reading at 6 weeks					
		<1.57	1.57	3.13	6.25	12.5	25.0
Reading at 4 weeks	<1.57	0	3	1	0	0	0
	1.57	0	2	6	5	0	0
	3.13	0	0	2	7	3	0
	6.25	0	0	0	5	2	0
	12.5	0	0	0	0	1	0
	25.0	0	0	0	0	0	0

Test strains were those isolated from patients previously untreated with rifampicin (37 strains from 37 patients).

The number in table is the number of strains showing the degree of resistance corresponding to the column and the row.

Table 4. Comparison of the Degree of Rifampicin Resistance between 4 Week- and 6 Week-readings (Measurement by routine method)

		Degree of rifampicin resistance($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
		Reading at 6 weeks				
		1.57	3.13	6.25	12.5	25.0
Reading at 4 weeks	1.57	3	3	0	0	0
	3.13	0	2	8	4	0
	6.25	0	0	8	4	0
	12.5	0	0	0	4	0
	25.0	0	0	0	0	0

The number in table is the number of strains showing the degree of resistance corresponding to the column and the row.

The degree of resistance in this experiment was measured by inoculating a 0.02 ml sample of the original bacterial suspension used for preparation of 10-fold dilutions, which were for the "actual count" method. Accordingly, the size of inocula was not adjusted to a constant range. The method is, therefore, a modified routine method.

て薄膜にみえるようになると思われる。

なお長期間の化学療法を受けた患者の結核菌ではまれならず発育が遅い菌がある。このさいには、「Actual Count 法」のさいに 4 週で対照培地に発育が認められない。このような場合は、判定時期を 6 週にしなければならない。

以上の結果から、RFP 未使用患者の結核菌の RFP 耐性度は、「Actual Count 法」で測定しても、Routine 法で測定しても、耐性度の上限は 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を越えないと分かった。

そこで、1971 年 2 月ないし 4 月に在院した国立療養所中部病院入院患者の中の排菌患者全部について直接法で RFP 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性の有無を観察した。その結果は表 5 に示す通りで、RFP 耐性度 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のものは、225 例中 2 例 (0.9%) のみにみられた。ところが、この 2 例は非定型抗酸菌 (*M. intracellulare*) であつたから、結局、RFP 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性は、RFP 未使用の患者の結核菌には、223 例中 1 例もなかつたことになる。

かつて、東村¹¹⁾および東村・東村¹²⁾は rifamycin SV が非定型抗酸菌と人型結核菌の区別に使用できると報告したが、その結果は (当然のことながら) RFP にもあてはまることが示唆された。RFP 未使用で (Routine 法であれ、定量的な「Actual Count 法」であれ)、RFP 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に耐性を示す菌株は非定型抗酸菌である可能性が高い。

Table 5. Rifampicin Resistance in 225 Patients who Had Not Yet been Treated with Rifampicin

	Number of strains showing positive growth on the Ogawa egg medium containing 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rifampicin
Number of strains tested	225
Number of strains showing partial resistance	7 (3.1%)
Number of strains showing full resistance	2 (0.9%)*

A specimen of sputum was added with equal volume of 5% KOH solution and liquified by shaking vigorously for 20 minutes. A 0.02 ml sample of the sputum solution was inoculated to the Ogawa egg medium containing no drug and containing 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rifampicin. Growth was read after incubation at 37°C for 6 weeks.

* These two strains proved to be *Mycobacterium intracellulare*.

2. RFP 耐性菌の出現形式

Tsukamura & Tsukamura¹³⁾ はすでに 1961 年に rifamycin SV 耐性形式について研究し、人型結核菌 H₃₇Rv 株の rifamycin SV 耐性形式が、single-step pattern であると報告した。H₃₇Rv 株は感性 (6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性) か 1,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上耐性のいずれかの耐性度を示し中間的な耐性が存在しないことが見出された。RFP についても Canetti など¹⁴⁾ によつて同じ所見が見

Table 6. Emergence of Rifampicin Resistance in Tubercle Bacilli after Administration of Rifampicin with two "Resistance"-Drugs, Ethambutol and Isoniazid, to which Tubercle Bacilli Had been Resistant Prior to Administration

Case	Degree of rifampicin resistance ($\mu\text{g/ml}$)						
	Time in months after the start of administration						
	Before administration	1	2	3	4	5	6
1. [REDACTED]	6.25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
3. [REDACTED]	6.25	6.25	200	200	200	200	200
4. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	(-)	(-)	(-)	(-)
5. [REDACTED]	6.25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
7. [REDACTED]	6.25	(-)	200	200	200	200	200
8. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
9. [REDACTED]	6.25	(-)	200	200	200	200	200
10. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
11. [REDACTED]	6.25	(-)	(-)	200	200	200	200
12. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
13. [REDACTED]	6.25	6.25*	(-)	(-)	200	200	200
14. [REDACTED]	6.25	6.25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
16. [REDACTED]	6.25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17. [REDACTED]	6.25	6.25	200	200	200	200	200
18. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	200	200	200	200
19. [REDACTED]	12.5	6.25	6.25	200	200	200	200
20. [REDACTED]	6.25	(-)	200	200	200	200	200
21. [REDACTED]	6.25*	6.25*	6.25*	200	200	200	200
22. [REDACTED]	6.25	6.25	6.25	(-)	(-)	(-)	(-)
23. [REDACTED]	6.25	(-)	6.25	200	200	200	200

Eleven cases shown in the upper part of table received administration of rifampicin daily, and 12 cases shown in the lower part of table received rifampicin twice weekly. The resistance of tubercle bacilli to rifampicin was measured by the "actual count" method. The value in table, 6.25, is correctly ≤ 6.25 .

* This value appears as resistance to $12.5 \mu\text{g/ml}$ when measured by routine method. Other values are the same in both "actual count" and routine methods.

(-): No positive sputum culture was obtained.

出された。最近行なつたわれわれの成績でも、RFP 耐性形式は rifampicin SV の場合と同一であつた。RFP が rifampicin SV 誘導体である以上、このことは当然といえる。

結核患者に RFP を投与したさいにみられる RFP 耐性出現の経過は、患者体内の結核菌についても single-step pattern が存在することを示唆している。すなわち感性菌 (RFP 使用前) の耐性度は $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下であるが、RFP を使用することによつて、おおよそ 2~3 カ月後に一挙に $200 \mu\text{g/ml}$ 以上耐性菌が出現する (表 6)。表 6 には、「Actual Count 法」の測定成績を示したが、Routine 法でもほぼ同じ成績が得られる (表 6 に Routine 法で耐性度が高かつた場合を * 印で示した)。

なお一部の患者では、 $25 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ の間に「不完全耐性」の現象がみられた。しかし、この場合には次の月には必ず $200 \mu\text{g/ml}$ 耐性 (「Actual Count 法」の耐性

または Routine 法の完全耐性) がみられた。すなわち不完全耐性は RFP 耐性菌が選択される過渡的段階と認められる。

なお、まれに「Actual Count 法」で $100 \mu\text{g/ml}$ まで発育し、 $200 \mu\text{g/ml}$ に発育しない場合がある。この場合、 $100 \mu\text{g/ml}$ に発育した集落をとつて、RFP を含まぬ培地で増菌し、耐性度を測定しなすと、必ず $200 \mu\text{g/ml}$ 耐性である。したがつて、前に $200 \mu\text{g/ml}$ に発育しなかつたのは、RFP 耐性菌の RFP による発育遅延と、おそらく、それに実験条件の変動が重なつたものであらうと想像される。

考 察

一般に抗結核剤 (一般抗生物質についても同じ) の「臨床耐性」の境界値決定にあつては次の順序を経るのが妥当と思われる¹⁵⁾。

(1) 化学療法剤未使用患者の菌の耐性度分布の観察
まず感性株の耐性度の変動範囲を決定する。通常、「臨床耐性」の境界値は、この変動範囲の上限を越える線にある。しかし注意を要する例外が2つある。1つは交叉耐性がある場合で、基礎的研究で交叉耐性のある薬剤が使用してある患者の菌株は当然除外しなければならない。次は自然耐性¹⁶⁾の問題である。自然耐性がはじめて指摘されたのは ethionamide (TH) についてである。自然耐性 (natural resistance) とは primary drug resistance (患者体内で生じた耐性菌が他の患者に感染した場合) と異なり、その化学療法剤が出現する前からともと存在していた耐性菌である。TH の場合、TH 未使用患者の菌株に耐性度の高いものがあることは、フランスの学者^{17)~19)} によつて指摘されていたが、東村ら^{20) 21)} は TH 未使用患者の耐性度の変動範囲は幅広く、この中で耐性度 5~20 $\mu\text{g/ml}$ のものは TH 投与によつて臨床症状の好転がみられたが、TH 30 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性度を示す患者では TH の臨床効果が認められないことを観察し、TH 使用前に 30 $\mu\text{g/ml}$ 以上耐性を示すものを自然耐性とした (以上の耐性度は「Actual Count 法」による)。自然耐性の述語は、primary drug resistance との混同を避けるために使用した¹⁶⁾。

RFP に関しては、耐性度 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下のものでは明らかに臨床効果があるので (表6)、自然耐性の可能性は問題にならない。12.5 $\mu\text{g/ml}$ 耐性を一過性に示した例については、1例のみなので、今のところ RFP 自然耐性を積極的に示す証拠にはならない。したがつて RFP に関しては、自然耐性も交叉耐性も現段階では問題にならない。

(2) 耐性形式

抗結核剤の耐性形式は種々の型がある²²⁾。SM のごとく少なくとも数々の耐性度があるものから²²⁾、rifamycin SV¹³⁾、EB²³⁾、capreomycin²⁴⁾ のごとく耐性度が1つしかないものもある。

たとえば KM には 100~200 $\mu\text{g/ml}$ の段階と 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上の段階の耐性度がある。感性菌の耐性度は 20 $\mu\text{g/ml}$ 以下である (添加濃度)²⁵⁾。この場合、KM 500 $\mu\text{g/ml}$ をもつて「臨床耐性」の境界とすれば、100~200 $\mu\text{g/ml}$ の低耐性菌が出現しても分からない。したがつて「臨床耐性」の境界値は低耐性菌を発見できるものでなければならない。実際に KM 100 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌の出現は、KM の臨床効果の事実上の消滅を意味する²⁶⁾。

Rifamycin SV および RFP に関しては、single-step pattern であることが知られているので、RFP 未使用患者の菌の耐性度変動の上限 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の上に線をひけば問題はないと思われる。この濃度は RFP 25 $\mu\text{g/ml}$ である。RFP の場合、RFP 使用時の臨床観察でも耐性度の上昇は一挙に起こることが観察された。「Actual

Count 法」または routine 法で 25 $\mu\text{g/ml}$ 耐性がみられるときは同時に 200 $\mu\text{g/ml}$ 耐性がみられる。Rifamycin SV¹²⁾ についても、また RFP^{2) 27)} についても交叉耐性は認められない。

以上の結果から、「Actual Count 法」の場合も、Routine 法の場合も、「臨床耐性」の境界線は 25 $\mu\text{g/ml}$ とするのが妥当と思われる。この濃度の耐性が認められれば RFP の臨床効果は期待できないと思われる。RFP の耐性測定は接種生菌数によつてあまり影響されないので、面倒な「Actual Count 法」その他の方法を用いなくても、Routine 法で十分役立つと思われる。

以上の結果を、これまで報告された成績と比較してみる。

まず日結研⁴⁾の成績であるが、耐性の境界を 5 $\mu\text{g/ml}$ とした理由が明らかにされていないが、培地が Kirchner 寒天培地または半流動寒天であるので直接の比較は困難である。

岡ら⁹⁾の成績は 1% 小川培地を使用したものであるが、21 例中 2 例が RFP 投与前であるにもかかわらず 25~50 $\mu\text{g/ml}$ 耐性を示したということは理解しがたい。耐性の基準を 25 $\mu\text{g/ml}$ とする点では、われわれと一致するが、RFP 使用前に 21 例中 2 例もこれを上まわる耐性がみられるということは、25 $\mu\text{g/ml}$ を境界とすることと矛盾するのではなからうか。

療研⁵⁾の成績は 1% 小川培地を使用し、その論旨も一応妥当と思われる。しかし耐性のとり方については若干問題があると思われる。療研は「10 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性 (または 10 $\mu\text{g/ml}$ ないし 50 $\mu\text{g/ml}$ 不完全耐性) 以上とすることが適当である」としている。ところが、療研の報告にも述べているごとく、「未使用菌株群にも既使用菌株群にも 30% 前後の 10 $\mu\text{g/ml}$ 不完全耐性菌を認める」とあり、これを「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」点に難点がある。結局、療研は RFP 10 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性に境界線をおいているが、RFP 25 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性に境界線をおくわれわれの方法との得失はいかがであらうか。

(1) 療研が 10 $\mu\text{g/ml}$ をとつた理由は、RFP 未使用患者株の耐性上限になるべく近い濃度をとつたためであらう。この点の基本的な考え方はわれわれと同じであると思われるが、それでは、なぜ 10 $\mu\text{g/ml}$ という紛しい濃度をとつたのであらうか。かりに RFP の耐性度の段階がいくつかあり、その最低段階をとるにしても、「臨床耐性」の境界線は「遺伝的な耐性菌」を選択できる濃度をとるべきであつて、RFP 未使用患者株が不完全耐性を示すような濃度は境界値として低すぎると思われる。要は、療研の研究の段階では RFP 耐性の発現様式が十分に把握されていなかったためではなからうか。

また療研は 10⁻⁸ mg または 10⁻⁵ mg という小接種菌

量を用いているが、接種生菌数を規制しなければ、10 $\mu\text{g/ml}$ に完全耐性を示す例もでてくるはずである。この点、25 $\mu\text{g/ml}$ をとると、接種生菌数にあまり顧慮なくとも、感性株がこれに発育することはない。したがって耐性と感性の境界を明瞭に分かつことができる。

(2) 25 $\mu\text{g/ml}$ をとつた場合、感性株を明確に区別することができるが、もしこの濃度が結核菌の RFP 低耐性よりも低ければ、低耐性菌を見逃してしまうことになる。しかし、われわれが *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株および青山Bおよび患者株で研究した結果では、結核菌の RFP 耐性形式は single-step pattern であつて、耐性菌はすべて 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上 (実際に測定してみると実験した菌株はすべて 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上) 耐性であつて、中間的な耐性度はない。結核菌の感性菌は RFP 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 耐性以上の耐性度を示すことはないし、耐性菌 (遺伝的に耐性を示す resistant mutants) は RFP 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上耐性である。この耐性度の区別は接種生菌数の影響による偽耐性の現象¹⁰⁾を除くために「Actual Count 法」で測定してみるときわめて明確である。生体内における耐性菌集団の出現様式 (表6) も single-step pattern の存在を示唆している。この結核菌の RFP 耐性形式を考慮すると「臨床耐性」の境界値は比較的高い濃度をとつてよいことは明瞭で、25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度は決して高すぎることはない。むしろ 50 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性の線をとつても差支えないと思われる。

RFP の耐性形式については別報するが、RFP は rifamycin SV の誘導体であるから、rifamycin SV 耐性形式が single-step pattern であるという報告¹³⁾を参照すれば RFP 耐性形式も single-step pattern であることは当然予想されたことである。

耐性形式について特異なことは、一般に耐性形式は薬剤特異性があり、菌種特異性はないのに、RFP 耐性については事情が異なることである。rifamycin SV 耐性形式は、結核菌は single-step pattern であるが¹³⁾、*Staphylococcus aureus* では facultative single-step pattern すなわち「SM 型」である²⁸⁾。上述したように、RFP 耐性形式は結核菌については single-step pattern であるが、*Staphylococcus aureus* ではやはり「SM 型」であることが最近報告された²⁹⁾。これらの所見は、さきにわれわれが rifamycin SV について観察した所見が正しかったことを裏書きしている。

結 論

Rifampicin (RFP) の「臨床耐性」の境界線としては、「Actual Count 法」でも「Routine 法」でも、1% 小川培地で RFP 25 $\mu\text{g/ml}$ 耐性の線をとるのが適当である。

接種生菌数をとくに規制しない場合は (Routine 法)、RFP 25 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性の出現をもつて、「臨床耐性」

の発現と考えてよい。

結核菌の RFP 耐性形式は single-step pattern であるので、RFP 25 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性の線をとれば、接種生菌数の影響をあまり気にする必要はない。

文 献

- 1) Pallanza, R., Arioli, V., Furesz, S. and Bolzoni, G.: *Arzneimittel-Forschung*, 17: 524, 1967.
- 2) Verbist, L. and Gyselen, A.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 98: 923, 1968.
- 3) Nitti, V., Catena, E., Bariffi, F. and Veneri, F.D.: *Arch. Tisiol.*, 22: 417, 1967.
- 4) 日本結核化学療法研究会: *結核*, 45: 251, 昭 45.
- 5) 結核療法研究協議会: *結核*, 45: 317, 昭 45.
- 6) 岡捨己・今野淳・大泉耕太郎・林泉・佐藤秀雄・宮野文子: *日胸*, 30: 79, 昭 46.
- 7) 東村道雄: *医学と生物学*, 49: 87, 昭 33.
- 8) Tsukamura, M.: *Jap. J. Tuberc.*, 12: 46, 1964.
- 9) Canetti, G., Armstrong, A.R., Bartmann, K., Cetrangolo, A., Hobby, G.L., Lucchesi, M., Stewart, S. M., Sula, L., Tsukamura, M., and Schmiedel, A.: *Bull. Int. Union Tuberc.*, 37: 185, 1966.
- 10) 東村道雄: *結核*, 33: 815, 昭 33.
- 11) 東村道雄: *医学と生物学*, 62: 131, 昭 37.
- 12) 東村純雄・東村道雄: *結核*, 37: 586, 昭 37.
- 13) Tsukamura, S. and Tsukamura, M.: *Japan. J. Microbiol.*, 5: 457, 1961.
- 14) Canetti, G., LeLirzin, M., Porven, G., Rist, N. and Grumbach, F.: *Tubercle*, 49: 367, 1968.
- 15) 東村道雄: *医療*, 20: 69, 昭 41.
- 16) 東村道雄: *結核*, 37: 103, 昭 37.
- 17) Rist, N., Grumbach, F. and Libermann, D.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 79: 1, 1959.
- 18) Brouet, G., Marche, J., Rist, N., Chevallier, J. and LeMeur, G.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 79: 6, 1959.
- 19) Routier, J., Audrin, J. and Mme Boyer: *Poumon et Coeur*, 7: 657, 1960.
- 20) 東村道雄・安保孝: *結核*, 36: 361, 昭 36.
- 21) 東村道雄・安保孝・河西栄文: *結核*, 37: 141, 昭 37.
- 22) Tsukamura, M.: *Jap. J. Tuberc.*, 9: 43, 1961.
- 23) Tsukamura, M.: *Acta Tuberc. et Pneumol. Scand.*, 46: 89, 1965.
- 24) 東村道雄・外山春雄: *結核*, 43: 161, 昭 43.
- 25) Tsukamura, M., Kasai, E. and Tsukamura, S.: *Jap. J. Tuberc.*, 12: 27, 1963.
- 26) 東村道雄・安保孝・勝沼六郎: *結核*, 34: 625, 昭 34.
- 27) 津久間俊次・山田栄一・岩田猛邦・内藤益一: *日本胸部臨床*, 28: 380, 昭 44.
- 28) Tsukamura, M.: *J. Antibiotics, Ser. A.*, 15: 254, 1962.
- 29) 渡辺力・菅原花登美・渡辺満: *日本細菌学雑誌*, 26: 192, 昭 46.