

原 著

人型結核菌の KM, VM, CPM, LVM, TUM に対する交叉耐性に関する研究

第1報 患者から分離した人型結核菌の5剤
に対する感受性の面から

齊藤 健利・福原 徳光

東京大学医科学研究所

受付 昭和48年12月6日

CROSS RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI TO KM, VM, CPM, LVM AND TUM*

I. The Sensitivity of Human Tubercle Bacilli Isolated from Patients to the Five Antibiotics

Taketoshi SAITO and Yoshimitsu FUKUHARA

(Received for publication December 6, 1973)

For researching the cross resistance and its degree among five antibiotics including KM, VM, CPM, and new antibiotics of LVM and TUM, the sensitivities to the five antibiotics were examined with strains isolated from patients in the 1% Ogawa's medium (O medium), the Kirchner semi-liquid agar medium (K medium), the Youmans semi-liquid agar medium (Y medium) and the Dubos medium (D medium). The results are as follows.

1) The sensitivity of human tubercle bacilli isolated from patients to the five antibiotics was examined in the O medium and the K medium; The antibacterial activities of VM and TUM were strongly observed in the O medium, and the antibacterial activities of KM and LVM were strongly observed in the K medium. In the latter medium, it was noted that the antibacterial activity of VM was the weakest.

2) MIC of the five antibiotics to the H₃₇Rv strain and the Schacht strain in the media of K, Y and D was in the order of VM>TUM=CPM>LVM=KM.

3) According to the experiments on the sensitivities to the five antibiotics by the kinds of media, the antibiotics may be grouped into two classes, that is, the group of KM and LVM and the group of VM and TUM; and CPM seems to be positioned between the groups.

緒 言

人型結核菌の Kanamycin (KM), Viomycin (VM),
Capreomycin (CPM) 3 剤に対する交叉耐性については

すでに多くの報告がある。このうち、VM と CPM 間の
交叉耐性はこれを認めるものが多いが、KM と VM、KM
と CPM 間の交叉耐性については必ずしも意見の一致が
みられていない。私ども¹⁾はかつて、これら3剤間では

* From the Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108 Japan.

VM \leftrightarrow CPM (両方向), KM \rightarrow CPM (一方向: KM 耐性菌は CPM にも耐性) の交叉耐性が顕著であることを報告した。一方, 最近, これら 3 剤と類似の抗結核作用を有する抗生物質, すなわち Lividomycin (LVM)²⁾³⁾ と Tuberactinomycin (TUM)⁴⁾ がわが国で開発され, 臨床的治療実験が進行中である。

ここにおいて, 新抗生物質 LVM と TUM を含めて, KM, VM, CPM, LVM, TUM 5 剤間の交叉耐性の有無およびその程度を知る目的で, 人型結核菌の 5 剤に対する感受性を種々の条件下で, その都度 5 剤同時に検査した。

今回はまず患者から分離した人型結核菌の KM, VM, CPM, LVM, TUM 感受性を, 1% 小川培地および Kirchner 半流動寒天培地で比較検討した成績を報告する。

実験方法

使用菌株: 医科研附属病院および桜町病院入院中の結核患者喀痰から分離した人型結核菌を使用した。

使用培地: 医科研規格メタルキャップ付き小試験管 (10×100 mm) を使用し, これに薬剤を含まない培地 (対照) と各薬剤の種々の濃度含有培地の 2ml ずつを分注した。

1% 小川培地ではこれを 90°C, 60 分加熱凝固滅菌した。

Kirchner 半流動寒天培地では, 血清以外の培地成分を型のごとく加温溶解し, 120°C, 15 分加熱滅菌。以後無菌操作でこれに血清を加え適量をコルベンに分配。各コルベンに所定量の薬液を加えこれを 2ml ずつ小試験管に分注した。

培地内薬剤濃度: 実験ごとに薬剤の濃度段階を多少変更した。実験成績の各項で記述する。

接種菌量: 培地作製後 1 週以内に菌を接種した。あらかじめ Dubos 培地で 2 代以上継代して結核菌の均等浮遊液を得, これを適宜希釈して 10⁻⁸mg 相当量を接種した。

判定: 1% 小川培地を使用した場合は培養 3~4 週後に, Kirchner 半流動寒天培地を使用した場合は培養 1~2 週後に判定を行った。

実験成績

I. 1% 小川培地における成績

濃度段階は各薬剤とも 25, 100mcg/ml の 2 段階としたが, この実験では主として 25mcg/ml のところで発育する菌の有無, 程度により, 感性, 不完全耐性, 完全耐性に区分して観察した。

患者から分離した 65 菌株中, 既往に 5 剤がいずれも未使用のものは 44 株, KM だけが 1 か月以上使用されているものは 11 株, KM と VM が使用されているものは

10 株であった。CPM が使用されている菌株はなかつた。LVM も TUM も使用されていなかった。

(1) 既往に 5 剤がいずれも未使用の 44 菌株について

44 株中 25mcg/ml のところで菌の発育をみた菌株は (表 1), LVM が 43.2% で最も多く, ついで CPM が 36.4%, KM が 25.0% であった。これに対し VM は 11.4%, TUM は 13.6% で極めて少なかった。すなわち VM と TUM は 1% 小川培地では抗菌力が他の薬剤よりも強く現われるものが多かった。

また 44 菌株中 25mcg/ml のところで KM 感性を示したものは 33 株, 不完全耐性を示したものは 11 株であったが, この KM 不完全耐性 11 株の他の薬剤に対する感受性をみると (表 2), VM と TUM に対しては多くのもの (おのおの 9 株) が感性であったが, 逆に CPM と LVM に対しては多くのもの (それぞれ 10 株, 11 株) が不完全耐性を示した。

(2) 既往に KM だけが使用されている 11 菌株について (表 3)

11 菌株中, KM 感性 3 株, 不完全耐性 6 株, 完全耐性

Table 1. Sensitivity of 44 Strains Isolated from Patients, Who had no Previous History of Chemotherapy with Any of the Five Antibiotics. Number of the Cases Partially Resistant to 25mcg/ml of Each Antibiotic

	KM	VM	CPM	LVM	TUM
Number of the cases	11	5	16	19	6
%	25.0	11.4	36.4	43.2	13.6

Table 2. Sensitivity to VM, CPM, LVM and TUM of 11 Strains, Which Showed Partially Resistance to KM

		VM		CPM		LVM		TUM		
		S	P.R	S	P.R	S	P.R	S	P.R	
KM	S	33	30	3	27	6	25	8	29	4
	P.R	11	9	2	1	10	0	11	9	2

S: Sensitive P.R: Partially resistant

Table 3. Sensitivity of 11 Strains Isolated from Patients, Who had been Treated by KM Previously

		VM			CPM			LVM			TUM		
		S	P.R	R	S	P.R	R	S	P.R	R	S	P.R	R
KM	S	3	3		3			3			3		
	P.R	6	5	1				6			5		1
	R	2	1	1			1	1			2	1	1

S: Sensitive P.R: Partially resistant R: Completely resistant

Table 4. Sensitivity of 10 Strains Isolated from Patients, Who had been Treated by KM and VM Previously

		VM			CPM			LVM			TUM		
		S	P.R	R	S	P.R	R	S	P.R	R	S	P.R	R
KM	S	1	1				1			1		1	
	P.R	4	4			1	3			4		4	
	R	5	3	2			2	3		3	2	4	1

S: Sensitive P.R: Partially resistant
R: Completely resistant

2株であつたが、このうちKM不完全ないし完全耐性の計8株はCPM, LVMに対しても不完全ないし完全耐性を示したが、VMとTUMに対しては多くのもの(それぞれ6株)が感性であつた。

(3) 既往にKM, VMが使用されている10菌株について(表4)

10菌株中、KM感性1株、不完全耐性4株、完全耐性5株であつた(VMには2株だけが不完全耐性を示した)が、このうちKM不完全ないし完全耐性の9株ではやはりCPM, LVMに耐性を示すものが多く(それぞれ8株、9株)、逆にVMとTUMに対しては感性を示すもの(それぞれ7株、8株)が多かつた。

(4) 以上の患者分離菌についての1%小川培地上の成績は以下のごとく要約される

被検菌株の多くが、KM, CPM, LVMに対しては近似の感受性を示し、VMとTUMに対しては違つた様相を呈した。

II. Kirchner 半流動寒天培地における成績(表5)

各薬剤の濃度段階は、2, 5, 10mcg/mlとした。これに患者分離菌19株を接種した。19株中KM未使用のものは14株(No.1~14)、KM既使用のものは5株(No.15~19)であつた。

KM未使用(VM, CPMも未使用)の14株についてみると、KMとLVM各含有培地ではすべての菌株が2mcg/mlで完全に発育が抑えられていること、CPMとTUMに対しては感受性の弱い菌株が若干(それぞれ7株、5株)あること、更にVM含有培地ではほとんどすべての菌株が5mcg/mlで、菌株によつては10mcg/mlでも発育しているもの(9株)があること、などが顕著であつた(KM既使用の5株については例数が少ないのでここでは保留する)。

すなわち、人型結核菌の5剤に対する感受性は小川培地とKirchner半流動寒天培地とでその様相が異なり、感受性がことに強く表現される薬剤をまとめると、

Table 5. Sensitivity of 19 Strains Isolated from Patients —Results on Kirchner semi-liquid agar medium—
(The sensitivity is expressed by the degree of growth on each batch of drug-containing media and on control media)

KM*	Strain	0	KM			VM			CPM			LVM			TUM		
			2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10
-	1F	###	-	-	-	##	##	##	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	2N	###	-	-	-	###	###	##	+ ₅	+ ₂	-	-	-	-	###	-	-
-	3H	###	-	-	-	###	##	+ ₈	+ ₅₀	-	-	-	-	-	-	-	-
-	4A	###	-	-	-	###	###	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	5M	###	-	-	-	###	###	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	6K	###	-	-	-	###	###	+ ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	##	-	-
-	7S	###	-	-	-	+	-	-	+ ₂₆	-	-	-	-	-	-	-	-
-	8K	###	-	-	-	###	###	##	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	9N	###	-	-	-	###	##	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	10L	###	-	-	-	###	###	##	##	##	+ ₈₀	-	-	-	###	##	+ ₈₀
-	11K	###	-	-	-	###	###	+ ₅₀	+ ₁₀	-	-	-	-	-	###	-	-
-	12M	###	-	-	-	###	##	-	+ ₈	-	-	-	-	-	-	-	-
-	13K	###	-	-	-	##	##	+ ₁₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	14N	###	-	-	-	###	##	##	+ ₂₀	-	-	-	-	-	##	-	-
+	15K	###	##	-	-	###	##	##	##	+ ₁₀	-	-	-	-	+ ₁₀	-	-
+	16S	###	###	##	##	###	##	-	###	+ ₅₀	-	-	-	-	-	-	-
+	17S	###	###	##	+ ₂₀	###	##	-	###	##	+ ₅	+ ₁₀₀	+ ₃₀	-	-	-	-
+	18Y	###	###	###	##	###	###	-	###	###	##	###	##	-	+ ₅	-	-
+	19S	###	###	###	##	###	###	-	###	##	+ ₁₀	###	+ ₅₀	-	-	-	-

* Among the 19 cases, 14 had not been treated with KM [KM (-), No.1~14] and 5 had been treated with KM [KM (+), No.15~19].

Table 6. MIC of the Five Antibiotics in Various Media (mcg/ml)

Drugs	Dubos medium	Kirchner semi-liquid agar medium	Youmans semi-liquid agar medium
KM	0.25~1	0.5~2.5	2.5~5
VM	5~25	2.5~5<	50
CPM	1~2.5	0.5~5	10~25
LVM	0.5~1	0.5~1	2.5~5
TUM	2.5~5	0.5~5	10~25

小川培地では VM と TUM

Kirchner 培地では KM と LVM

ということになる。しかも、VM の Kirchner 培地における阻止力が他の薬剤に比べ極めて弱いことは注目に値する。

ここにおいて更に Dubos Tween-Albumin 培地、Youmans 半流動寒天培地（次報記述予定）などの卵を含まない培地も追加して、研究室保存の標準株である H₃₇Rv 株と Schacht 株に対する 5 剤の MIC を調べた（表 6）。接種菌量によりかなりの幅がみられたが、この表は数回にわたり行われた実験成績をまとめたものである。すなわち、これらの培地では小川培地の場合と異なり、VM の MIC が最も高く、ついで TUM、CPM で、これに反し KM と LVM は最も低い値を示した。

考 案

普通筋注で用いられる抗結核薬の中で、わが国では一般に、初回治療では SM が用いられ、再治療の段階では KM がしばしば用いられる。その次には VM が用いられることがある。したがって、現在の時点では KM、VM、CPM、LVM、TUM 5 剤については、KM 耐性株または VM 耐性株は患者から比較的得られやすい。これに反し新しい 2 剤、すなわち TUM と LVM の純粹の耐性株を臨床材料より得ることは極めて困難である。このゆえに、患者分離株について 5 剤間の交叉耐性を調べるには大きな制約がある。

今回 1% 小川培地で感受性が調べられた菌株数は 65 株であったが、これらの菌株中 KM 25mcg/ml 含有培地で菌発育のみられないもの（感性）とみられるもの（不完全耐性あるいは完全耐性）があつた。この菌発育のみられたものは、KM 未使用の 44 株中 11 株（表 2）、KM だけ既使用の 11 株中 8 株（表 3）、KM と VM が既使用の 10 株中 9 株（表 4）であつた。これらの菌株の他の 4 剤に対する感受性を検討した結果、KM 不完全ないし完全耐性を示す患者分離菌の多くが LVM と CPM にも耐性を示し、逆に LM と TUM に対しては感性を示した。すなわち、患者分離菌における 1% 小川培地上の成績からは 5 剤間の交叉耐性についてはこの程度のことのみが推定されるだけで、詳細は試験管内で得られた各

薬剤耐性株についての実験に引き継がれた（第 2 報に掲載予定）。

なお、小川培地とは別に、患者分離菌の一部を、5 剤のおのおのを含有した Kirchner 半流動寒天培地に接種して感受性を調べたところ小川培地の場合と異なる成績が得られた。すなわち、小川培地では VM と TUM の抗菌力が他の 3 剤よりも強く現われる菌株が多かつたが、Kirchner 半流動寒天培地では逆に VM の抗菌力が最も劣り、TUM、CPM がこれに次いで劣り、KM と LVM の抗菌力が最も強く示された。

ここにおいて、Kirchner 半流動寒天培地のほかに、Youmans 半流動寒天培地と Dubos 培地を使用し、これに人型結核菌 H₃₇Rv 株や Schacht 株を接種してこれらの培地における 5 剤の MIC を比較してみたが、この場合も小川培地の場合とは異なり Kirchner 半流動寒天培地の場合と同様の成績で MIC は VM>TUM=CPM>LVM=KM の順に高値を示した。この際、VM の抗菌力が特に弱く示されていることは注目に値する。これについては大里⁶⁾も KM、VM、CPM 3 剤の抗菌力の比較において類似の成績を報告している。

以上、5 剤の抗菌力の培地別の明らかな違いから、これら 5 剤は KM、LVM 群と VM、TUM 群の両群に分けられ、CPM はその中間に位置するがごとく考えられた。これらは卵成分との吸着率の違いや血清蛋白との結合率の違いなどが関係しているかと思われるが、いずれにしても以上の事実は KM、VM、CPM、LVM、TUM 5 剤間の親近性別組分けを培地別抗菌力の面から推定させるものがあり、交叉耐性との関連においても興味を持たれることである。また 5 剤間の交叉耐性を種々の培地で検討するにあたっては以上の事実を考慮して判定する必要があると思われた。

結 語

KM、VM、CPM に新抗生物質 LVM、TUM を加えた 5 剤間の交叉耐性の有無および程度を知る目的で、今回はまず、患者分離菌株、H₃₇Rv 株、Schacht 株の 5 剤に対する感受性を、1% 小川培地（O 培地）、Kirchner 半流動寒天培地（K 培地）、Youmans 半流動寒天培地（Y 培地）、Dubos 培地（D 培地）で調べた。得られた成績を次に列記する。

1. 患者から分離した人型結核菌の 5 剤に対する感受性を O 培地と K 培地で検査して、前者では VM と TUM の抗菌力が強く現われ、後者では反対に KM と LVM の抗菌力が強く現われた。しかも後者では VM の抗菌力が最も弱かつたことが顕著であつた。

2. K 培地、Y 培地、D 培地における 5 剤の H₃₇Rv 株あるいは Schacht 株に対する MIC を比較すると、VM>TUM=CPM>LVM=KM の順に高値を示した。

3. 以上の5剤の培地別感受性の実験成績を総合すると、KM, LVM 群と VM, TUM 群はおのおの違ったパターンを示すものとして大きく区分でき、CPM は両群の中間に位置するがごとき所見であつた。

(本論文の要旨は、第47回および第48回本学会総会において発表した)

文 献

- 1) 北本治・福原徳光・小林宏行・斎藤健利 他：結核, 43: 384, 1968.
- 2) Oda, T. et al.: J. Antibiotics, 24: 333, 1971.
- 3) Mori, T. et al.: J. Antibiotics, 24: 339, 1971.
- 4) Nagata, A. et al.: J. Antibiotics, 26: 680, 1971.
- 5) 大里敏雄 他：結核 41: 297, 1966.