

総 説 (展 望)

結核菌の交叉耐性(第1編)

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 51 年 10 月 26 日

CROSS-RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI (A REVIEW) (I)

Michio TSUKAMURA*

(Received for publication October 26, 1976)

The conditions necessary for studies of the cross-resistance of tubercle bacilli (*Mycobacterium tuberculosis*) are discussed in the present paper.

1) Strains should be derived from single colonies. This is the most important, basic condition to obtain clear-cut results. Use of mixtures of sensitive and resistant organisms or of resistant organisms of different phenotypes may lead to misunderstanding of the nature of cross-resistance.

2) The degree of resistance (phenotype) should be estimated by a most sensitive method, for example "actual count method" (Tsukamura, M.: *Med. & Biol.*, 49: 87, 1958; *Jap. J. Tuberc.*, 12: 46, 1964; Canetti, G. et al.: *Bull. Int. Un. Tuberc.*, 37: 185, 1966). The method for estimating the phenotype may be changed according to the purpose of studies. In order to deal with a large difference of the resistance, a non-quantitative method may be used, whereas, to deal with a little difference, the "actual count method" must be used. The "actual count method" is a method in which the degree of resistance is estimated by the highest concentration of a drug in which 20 to 50 (if this is unavailable, 10 to 100) viable organisms are able to grow.

3) Sensitive organisms are defined as a population which is not exposed to any drug previously or a population which shows the same phenotype as the above population, and resistant organisms are defined as resistant mutants which retain heritably resistant properties. Unheritable resistant properties are due to the phenomenon of 'pseudoresistance'; the use of heavy inoculation makes visible residual growth of sensitive organisms.

4) Cross-resistance studies should be done on different phenotypes. The number of resistant phenotypes of *M. tuberculosis* (H₃₇Rv) remains usually a few.

5) From descriptive convenience, the cross-resistance was divided into the following categories: (1) complete cross-resistance (Resistant organisms selected by a drug A are resistant to drugs A and B, and those selected by a drug B are also resistant to both drugs); (2) one-way cross-resistance (Resistant organisms selected by a drug A are resistant to drugs A and B, but those selected by a drug B are resistant to only the drug B); (3) 'major' cross-resistance (Resistant organisms selected by a drug A are resistant to another drug B, and the increase of resistance to a drug B is more than ten-times when compared with the degree of resistance of the parent strain); (4) 'minor' cross-resistance (Resistant organisms selected by a drug A are resistant to a drug B, and the increase of resistance to the drug B is less than five-times when compared with the degree of resistance of the parent strain).

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

結核菌(以下、結核菌とは人型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* を意味する)の交叉耐性については、数多くの研究があるが、その結果については、かなりの「くいちがい」がある。このような「くいちがい」がなぜ起こったか、そして結核菌の交叉耐性の本態はいかに考えるべきかを考察することが、本稿の目的である。なお本稿には、総説のみならず、交叉耐性の本態に関する筆者の見解をつけ加えた。これ、すなわち、展望なる副題をつけた所以である。

耐性の定義

交叉耐性を論じるためには、まず耐性の定義を明らかにしておく必要がある。

耐性は、臨床的と細菌学的と2つの見地から定義できる。

臨床的な耐性は、奏功すべき抗結核剤が、特定の患者で効かない現象で、細菌学的耐性が生じた場合と、菌が感性菌であつても硬化壁空洞のために薬剤が病巣に浸透しない場合とがある⁵⁵⁾。

ここで問題にしようと思うのは、細菌学的な耐性の定義で、これを次のように分けることができる。

1) 最初から耐性がある場合。化学療法または試験管内で薬剤に接触する前から、特定の菌株が他の菌株より、より高濃度の薬剤中で発育する現象。

(a) 一次耐性(primary resistance)。化学療法によって出現した耐性株が他の患者に感染したと思われる場合。

(b) 自然耐性(natural resistance)⁴⁸⁾⁵⁴⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶²⁾。抗結核剤の出現する前から自然に存在する耐性株の存在を意味する。自然耐性の述語は、筆者が提唱したものであるが⁶²⁾、TH および Tb₁ 耐性について、この現象がみられる。

2) はじめは低濃度の薬剤中にしか発育しなかつた菌株が、化学療法または試験管内での菌と薬剤との接触により、より高濃度の薬剤中で発育する現象。通常、耐性という場合、この現象を指す。「耐性化」の現象は、感性菌集団から耐性菌集団への population change と考えられ、「突然変異菌の薬剤による選択」と考えられている⁵⁾⁹⁾¹⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁸⁾⁸³⁾⁸⁴⁾。適応説¹⁾¹¹⁾²⁵⁾⁸⁷⁾は現在否定されている。また SM に突然変異誘導作用があるという説もある³⁾。

ここにいう耐性を取り扱う場合、当然問題となるのは、はじめと比較して、どの程度の耐性度上昇があれば、耐

性と認めるかということである。この問題は、耐性度測定の見誤差と密接に関係する。測定誤差を越えた耐性度上昇を観察してはじめて耐性株と定義できる。

耐性度の測定に最も正確な方法は、接種「生菌数」を一定にする定量的方法であることはいままでもない。この方法には、「actual count 法」⁷⁾³⁶⁾⁵¹⁾と「proportion method」⁷⁾とがあるが、耐性度の表現には前者の方が便利である。「actual count 法」は、培地あたり 20~50 (これができなければ 10~100) の生菌単位を接種して、37°C 4 週後に集落が発生する最高濃度をもつて耐性度とする方法である。なお生菌数算定の基礎についての研究もある⁶⁸⁾⁶⁹⁾⁷²⁾。

注意を要するのは、湿菌量 10mg/ml の菌液を作つて一定量を接種しても、その生菌数は 1~100 倍位の変化があることである。生菌数は、培地での発育状態や培養日数によつて変化する。「actual count 法」を成功させるためには、通常 4 種の菌液 (10mg/ml を原液とした場合、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷) が必要である。筆者は、この他に参考として原液および 10 倍希釈液の接種も併用している。

「actual count 法」は、現在、考える最も正確な耐性度測定法であるが、それでも 1~2 倍の測定誤差は避けえない。したがつて耐性度 2 倍上昇といった細かい耐性度の変化を問題にする場合には、測定を何回も繰り返す必要がある。

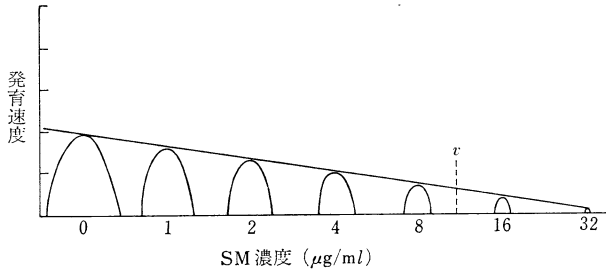
筆者は「actual count 法」が最も正確な耐性度測定法であると述べたが、この方法の使用を強制するつもりはない。問題は、対象とする耐性度上昇の程度であると思われる。4 倍位の耐性度上昇を取り扱う場合には是非「actual count 法」が必要であるが、10 倍以上の耐性度上昇を取り扱う場合には、非定量的な方法でも十分判定可能である。

「actual count 法」で、結核菌 (H₃₇Rv) の KM 耐性度を測定すると 10~20 μg/ml (小川培地) となる。したがつて、これ以上の濃度に発育する菌は、一応耐性菌といえる。しかし接種に大量の菌 (10⁸~10⁹) を用いると、KM 50 μg/ml にも薄膜形成がみられる。しかし、この発育は、「偽耐性」³⁵⁾と呼ばれる現象で、決して耐性菌とはいえない。その証拠に、この菌をとつて、「actual count 法」で耐性度を測定すると、やはり 10~20 μg/ml の耐性度しか示さない。このような事例は、定量的測定法の必要を示す一例であるが、この現象は次のように説明できる。

本稿では次の略号を使用した。

SM: Streptomycin, EVM: Emviomycin (Tuberactinomycin-N), VM: Viomycin, CPM: Capreomycin, KM: Kanamycin, LVM: Lividomycin, PM: Paromomycin, INH: Isoniazid, PAS: *p*-Aminosalicylate, Tb₁: Amithiozone, NM: Neomycin, TH: Ethionamide, CS: Cycloserine, EB: Ethambutol, RFP: Rifampicin.

図1. SM濃度と発育速度を示す模型図



図の砲弾型は集落の大きさ(縦断面)を示す。単個集落の発育速度は、SM濃度が大きなるにつれて遅くなる。 v は肉眼での可視限界を示す。単個集落の場合は、 $16 \mu\text{g/ml}$ (添加濃度)で不可視となるが、多数の菌が接種されると薄膜状集落として可視状態となる。

抗結核剤は一般に濃度に比例して発育遅延作用を起こす³⁴⁾³⁷⁾⁴¹⁾⁷¹⁾。一定濃度で急に発育がとまるのではない(ただしINHは比較的これに近い)³⁷⁾。したがって肉眼で集落がみえなくても、個々の菌から多少の発育は起こっている(図1)。大量の菌を接種すると、微少の菌の発育が集まって可視域に達し、薄膜となるものと思われる。耐性菌と感性菌との差は、薬剤存在下での発育速度の差であるといえる⁴²⁾。(注。前記のKM $50 \mu\text{g/ml}$ に発育した薄膜は主として感性菌から構成されるが、KM耐性菌の含有率は原株より多い。これは、発育速度の差によって、耐性菌の選択が起こっているからである。)

菌 株

菌株は菌の集団である。菌株は感性菌の集団のこともあり、耐性菌集団のこともあり、両者の混合集団のこともある。臨床の場合、はじめ感性菌の集団であつたものが、感性菌と耐性菌の混合集団になり、遂には耐性菌の集団になることはよく知られている。

交叉耐性の研究では、使用する菌株が混合物である場合は、明確な結論を出しえないのは自明の理である。したがって交叉耐性の研究には、単個集落由来の「純系集団」を使用することが絶対に必要である。単個集落由来の菌株の中にも突然変異による耐性菌が $10^{-5} \sim 10^{-8}$ の割合で含まれている⁴⁷⁾。

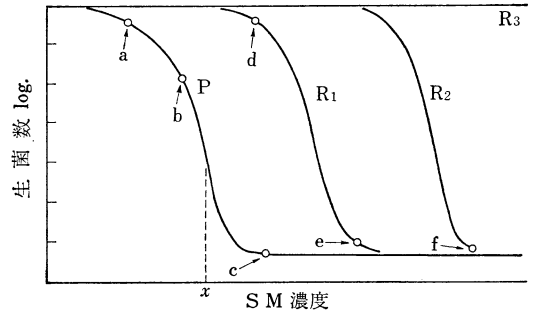
(注。液体培地を使用して、順次高い濃度に継代して耐性株を得ようとする場合、淘汰が十分でない「まじりもの集団」(感性菌と耐性菌または低耐性菌と高耐性菌)を使用することになるから注意を要する。)

感性菌と耐性菌

生物には彷徨変異と突然変異がある。微生物にも突然変異があることは早くから知られており⁵⁾⁹⁾¹⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁸⁾、彷徨変異の存在も報告されている³⁸⁾⁴³⁾⁶⁴⁾⁷⁰⁾⁷⁸⁾。

単個集落由来の感性株の生残曲線を描くと図2のPの曲線が得られる。この曲線は累積頻度曲線で“ x ”に変曲点がみられる。この“ x ”より低い濃度に発育した集

図2. SM耐性度の不連続性を示す模型図



Pは *M. tuberculosis* H₃₇R_vの生残曲線(survival curve)。 x は変曲点。

変曲点以下の濃度に発育した集落 a および b からつた菌株の生残曲線は、P に等しい。b が a よりも高濃度に発育したのは彷徨変異による。変曲点を越えた濃度に発育した集落 c に由来する菌株は、原株とは違つた R₁, R₂, R₃ のごとき生残曲線を示す*。生残曲線 R₁ で、d の集落由来の菌株は、R₁ と同じ曲線を与える。一方、e 由来株は R₂ の生残曲線を描く。R₂ の f 由来株は R₃ の生残曲線を描く。

*図では、c は1つになっているが、実際には、R₁, R₂, R₃ と与える集落の頻度は異なっている。

落由来の菌株は、原株と同じ曲線Pを描く。しかし“ x ”より高い濃度からつた集落由来の菌株は、原株とは全く違つた曲線 R₁~R₃ を書く⁴⁷⁾⁷⁸⁾。すなわち変曲点“ x ”より高濃度に発育した菌の耐性上昇という性質は遺伝的であり、この後、薬剤なし培地に何代継代しても変わることはない。原株中に見出される頻度も $10^{-5} \sim 10^{-8}$ である(結核菌の場合)。したがって明らかに突然変異菌由来と考えられる⁴⁷⁾。

以上の結果から、感性菌とは薬剤にふれたことのない株を構成する菌または、これと同等の耐性度を示す菌と定義され、耐性菌とは突然変異によつて耐性度上昇を起こした菌と定義される。感性菌と耐性菌とは明らかに耐性度が異なり、その耐性度の差は階段的である⁴⁷⁾。Yudkin⁸⁷⁾ のいうごとき感性菌から高耐性菌に至る連続的な耐性段階は実際には認めることができない。結核菌の場合、耐性度の段階は通常 1~2 である⁴⁷⁾。この結論は、筆者および共同研究者によつて得られたが、これは単個集落由来の株を使用することによつて、はじめて得られた結果である。したがって交叉耐性の研究には、種

々の耐性度の菌株を使用しないと、交叉耐性の実態はわからないといえる。

(注. 液体培地または半流動寒天を用いて耐性株を得た場合は、耐性菌の選択が十分でない場合、混合集団を用いることになる。この場合、恰も連続的な耐性度があるかのごとく錯覚することがありうるから注意を要する。ただし、耐性度の測定自体に液体培地を用いるのは、非定量的方法の1つとして差支えない)。

交叉耐性研究に必要な条件

以上の考察から、交叉耐性の研究には、次の条件を満たすことが望ましい。

- 1) 単個集落由来の「純系」菌株を使用する。
- 2) 種々の耐性度の菌株を使用する。
- 3) 可及的測定誤差の少ない方法を用いて耐性度を測定する。
- 4) 菌株特異性を考慮して、できれば数株について研究する。
- 5) 培地を一定にする。

筆者は交叉耐性の研究に一貫して1%小川培地を使用した。これは固形培地が生菌数算定に便利であり、また卵培地の方が再現性に富むからである。(注. IWGMTで Löwenstein-Jensen 培地と7H10培地とで非定型抗酸菌の耐性度測定の一一致率をしらべたが、前者の方がよく一致した)。一定の培地であれば、必ずしも卵培地でなくてよいと思われるが、培地によつて交叉耐性の相対的な尺度が違ふといわれているので注意を要する²⁰⁾²³⁾。

交叉耐性の定義

1) 耐性度上昇の尺度

結核菌の耐性度上昇をみる場合、例えば、「actual count 法」で測定して感性株のINH耐性度が0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ある耐性株のINH耐性度が10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という成績が得られた場合、これを500倍の耐性度上昇(耐性度の比率)と表現することもできるし、9.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の上昇ともいうことができる。一方、感性株のSM耐性度が5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、耐性株のそれが50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であれば、10倍の耐性度上昇とも、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の上昇ともいうことができる。この場合、絶対濃度でみて、INHの耐性度上昇9.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の方が、SMの場合の45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より少ないから、INH耐性度上昇の方が小さいというのは常識的に不合理である。

したがつて耐性度の上昇は、感性株の耐性度を1として、耐性度の倍率で表現するのが妥当と思われる。

2) 交叉耐性の種類

感性株からA剤を使用して、A剤耐性株をとつた場合、この菌株が他のB剤に対しても耐性を示せば、AとBとの間に交叉耐性があるといわれる。交叉耐性とは、この

ような現象である。

交叉耐性には、次の2種が区別されている。

(1) 完全交叉耐性。A剤を使用してA剤耐性株を得ると、それがB剤耐性であり、またB剤を使用してB剤耐性株を得ると、それがA剤耐性である場合。これを便宜上、次のごとく書く。A \rightarrow B, B \rightarrow A。

(2) 一方向交叉耐性。A剤を使用してA剤耐性株を得ると、それがB剤耐性である。しかしB剤を使用してB剤耐性株を得ても、A剤感受性である。これをA \rightarrow B, B \nrightarrow Aと書く。

換言すれば、「完全交叉耐性」は、A剤使用によりA剤耐性株が得られ、またB剤使用によつてもA剤耐性株が得られる場合で、「一方向交叉耐性」とは、A剤使用によつてはA剤耐性株が得られるが、B剤使用によつてはB剤耐性株が得られる場合といえる。

現在までに知られた成績をみると、交叉耐性と化学構造は密接な関係がある。完全交叉耐性を示すものは、特に化学構造がよく似ている。

(3) 「Minor交叉耐性」と「Major交叉耐性」(Minor cross-resistance および major cross-resistance)。

交叉耐性の報告は、著者によつて成績の違いがあり、使用した菌株の耐性度を明らかにした研究は意外に少なく、培地も同一ではない。この結果をいかに表示すべきかと頭を悩ました結果、記載の便宜上から、交叉耐性に minor と major を分けることとした。この両者は、耐性度上昇の倍率によつて分けたが、この倍率を明らかにした研究は、大部分1%小川培地を用いた研究であつた。minor と major は次のように分けた。

(a) Minor交叉耐性。A剤使用によつて得た耐性株のB剤耐性度の上昇率が5倍以下の場合。

(b) Major交叉耐性。A剤使用によつて得た耐性株のB剤耐性度の上昇率が10倍以上の場合(6倍以上と思われる場合も含める)。

このような分け方は、便宜上設定したものであるが、このような分け方をして、これまでの報告を整理してみると、一つ重要なことがわかつた。それは「minor交叉耐性」の場合は、すべて「一方向交叉耐性」に属することであつた。

この他に「不完全交叉耐性」という述語がある。これは、「一方向交叉耐性」の意にも用いられて紛らわしい。したがつて、次の場合をいうことに限定したい。すなわちA剤使用によつて得た耐性株が、A剤に対しては100倍の耐性度上昇を示すのに、B剤に対しては10倍の耐性度上昇しか示さない場合である。しかしこの述語は、交叉耐性の本質論(後述)からすれば、誤解を招きやすい述語である。

(文献は第3編に示す)