

原 著

結核菌の Rifampicin, Kanamycin, Ethionamide, Lividomycin
および Enviomycin に対する「*In vivo* 耐性発現」時間の比較

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 52 年 12 月 3 日

A COMPARISON OF THE TIME OF *IN VIVO* RESISTANCE
DEVELOPMENT OF TUBERCLE BACILLI TO RIFAMPICIN,
KANAMYCIN, ETHIONAMIDE, LIVIDOMYCIN, AND
ENVIOMYCIN (TUBERACTINOMYCIN-N) IN PATIENTS
WITH CHRONIC CAVITARY TUBERCULOSIS

Michio TSUKAMURA*

(Received for publication December 3, 1977)

Patients with chronic cavitory pulmonary tuberculosis who were treated previously with antituberculous agents for more than two years were treated with a regimen composed of an agent previously unused and two agents to which tubercle bacilli were already resistant, and the time of resistance development was observed. The time that required for resistance development to a single agent was as follows: rifampicin resistance (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (0.45 g per day, daily, *per os*) 2.27 months; rifampicin resistance (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (0.45 g per day, twice weekly, *per os*) 2.50 months; kanamycin low level resistance (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (1 g per day, three times weekly, intramuscularly) 3.07 months; ethionamide resistance (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (0.5g per day, daily, *per os*) 3.33 months; kanamycin high level resistance (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (1 g per day, three times weekly, intramuscularly) 5.07 months; lividomycin resistance (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (1 g per day, three times weekly, intramuscularly) 4.68 months; enviomycin resistance (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (1 g per day, daily, intramuscularly) 4.80 months.

From the results obtained, the generation time of tubercle bacilli growing in cavities was estimated theoretically as 54 hours. This value is much longer than the generation time of 12 hours estimated in *in vitro* experiments (Ogawa egg medium).

From theoretical considerations based on the above results, the ranking of *in vivo* effectiveness of antituberculous drugs was summarized as follows: rifampicin (daily or intermittent) > kanamycin=lividomycin > enviomycin.

Rifampicin (RFP) を結核患者に使用したときに、患者体内での耐性出現 (正確には、患者体内での RFP による population change というべきであろうが、以下、

簡単に「*in vivo* 耐性発現」と呼ぶ) が、他の抗結核剤より速いことが多くの著者によつて指摘されている。耐性出現の速度を論じるにあつては、単独使用またはそ

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

れに準じる条件で耐性発現の時間を比較しなければならないが、RFP 耐性の *in vivo* 出現が速いことは指摘されても、実際の比較は必ずしも行なわれていない。本報の目的は、この比較を行なうことと、その結果に基づいて、多分に speculative ではあるが、空洞内での結核菌の発育速度を推定することにある。空洞内での結核菌の発育速度は、このような間接的方法でない、推定する方法がないからである。

方 法

観察対象とした患者は昭和33年以降、国立療養所大府荘および中部病院に入院していた患者である。これらの患者の耐性検査の成績を retrospective に調査した。患者は有空洞の病巣の拡りが学研分類で「2」以上の患者で、化学療法を過去2年以上うけた患者である。化学療法により菌陰性化が起こった例は対象としなかつた。

観察は、Rifampicin (RFP), Kanamycin (KM), Ethionamide (TH), Lividomycin (LVM) および Enviomycin (Tubercactinomycin-N, TUM-N) について行なつた。これらの化学療法剤の1剤と、すでに耐性を示す薬剤が併用された「準単独使用例」を観察の対象とした。例えば KM については、過去に2年以上 SM・INH・PAS 3者併用が行なわれ、これら3剤に耐性が発現した場合に、KM・INH・PAS を使用した症例を対象とした。このような使用法は、今日からみれば、拙劣な治療法であるが、KM 出現当時の昭和33年にはやむをえない治療法であつたと思われる。他の抗結核剤についても、その抗結核剤が出現した時期の患者が観察の対象となつた。

抗結核剤の使用法は次の通りである。(1)RFP 1日 0.45g 毎日、(2)RFP 1日 0.45g 週2日、(3)KM 1日 1g 週3日、(4)TH 1日 0.5g 毎日、(5)LVM 1日

1g 週3日、(6)TUM-N, 1日 1g 毎日。RFP, TH は経口投与、KM, LVM, TUM-N は筋注である。

結核菌の分離と耐性検査は、毎月、月1回施行した。朝痰に等量の4% NaOH 液を加えて15分間振盪して液化し、その0.02 ml を渦巻白金耳で1% 小川培地に接種し、37°C 4週ないし8週培養した。分離した集落をいつたん、薬剤を含ませぬ1%小川培地に培養し、発育した集落を耐性検査に用いた。耐性検査は、「actual count 法」¹⁾²⁾で、1 mg/ml (湿菌量) の菌液、10倍、10²倍、10³倍および10⁴倍の5種の菌液を0.02 ml ずつ耐性培地に接種し、37°C 4週後に、対照培地に20~100集落を示す接種量で起こる最高薬剤濃度を耐性度とした。4週後に集落が発生せず、判定不能の場合は、6週後に判定した。耐性と判定した critical concentrations は次の通りである。RFP 25 μg/ml³⁾, KM 100 μg/ml (低耐性)、500 μg/ml (高耐性)⁴⁾⁵⁾, TH 30 μg/ml⁶⁾, LVM 200 μg/ml⁷⁾, TUM-N 100 μg/ml⁷⁾。使用した薬剤は次の通りである。RFP: rifadin 第一製薬 (Lepetit, Milano), KM: 明治製菓, TH: 塩野義製薬, LVM: 興和, TUM-N: 東洋醸造。

結 果

耐性発現の平均月数を表1に示す。*In vivo* 耐性発現の時間を *t*-test ($p < 0.05$ を有意とする) で比較すると次のごとくである。(1)RFP 毎日法と RFP 週2日法では、耐性発現時間に有意の差はない。(2)KM 低耐性(100 μg/ml)発現と TH 耐性発現の間に有意差はない。(3)LVM 耐性発現と KM 高耐性(500 μg/ml)発現の間に有意差はない。(4)KM 高耐性発現と TUM-N 耐性発現の間にも有意差はない。

一方、次の順序で有意差がみられる。(1)RFP 耐性発現は最も速く、他と有意差がある。(2)KM 低耐性発現

Table 1. Comparison of the Time of *in vivo* Appearance of Resistant Populations of Tubercle Bacilli in Patients by Administrations of Rifampicin (RFP), Kanamycin (KM), Ethionamide (TH), Lividomycin (LVM), and Enviomycin (Tubercactinomycin-N, TUM-N)

Chemotherapy	Resistant population	Time in months required until resistant populations appeared*
RFP (Daily)	RFP-resistant	2.27 ± 0.80 (n = 15)
RFP (Intermittent)	RFP-resistant	2.50 ± 0.83 (n = 20)
KM (Intermittent)	KM-lowly-resistant	3.07 ± 0.48 (n = 14)
KM (Intermittent)	KM-highly-resistant	5.07 ± 0.78 (n = 6)
TH (Daily)	TH-resistant	3.33 ± 1.62 (n = 18)
LVM (Intermittent)	LVM-resistant	4.68 ± 0.58 (n = 3)
TUM-N (Daily)	TUM-N-resistant	4.80 ± 0.45 (n = 5)

All patients had moderately- or far-advanced, chronic, cavitary lesions and were treated with an agent shown in table plus two agents to which tubercle bacilli already showed resistances.

* (Average time in months) ± (Standard deviation). n = Number of patients.

と TH 耐性発現が, RFP に次いで速く, KM 高耐性, LVM 耐性, TUM-N 耐性発現より有意差で速い。(3) KM 高耐性, LVM 耐性, TUM-N 耐性の発現は最も遅い。

以上の観察結果から, 観察対象の抗結核剤を3群に分かつことができる。

- 1) 耐性発現速やか: RFP 耐性 (2.3~2.5カ月)。
- 2) 耐性発現速度中等度: KM 低耐性および TH 耐性 (3.1~3.3カ月)。
- 3) 耐性発現が遅い: KM 高耐性, LVM 耐性および TUM-N 耐性 (4.7~5.1カ月)。

考 察

耐性出現という現象は, 感性菌の発育は薬剤によつて阻止されるが, 治療前から存在していた突然変異耐性菌の発育は阻止されないため, 初めの感性菌集団が耐性菌集団に置き換えられる現象 (population change) に他ならない。

治療を始めて 't' 時間後の耐性菌と感性菌の比率 p は次の式によつて与えられる。

$$p = n \times 2^a / N \times 2^b$$

ここに, n は治療前に存在した突然変異耐性菌の数 (生菌数), N は感性菌の数 (生菌数)。 $a = t/g$, $b = t/G$, g は耐性菌の薬剤存在下における平均 generation time, G は感性菌の薬剤存在下での平均 generation time である。 t 時間後に耐性菌の数は $n \times 2^a$ となり, 感性菌の数は $N \times 2^b$ となる。

以上の式は, 耐性菌の発育速度 (generation time の逆数) の大まかな目安をつけるために作つた式であつて, 厳密にはいろいろの補正が必要である。例えば, (1) 以上の式では, 薬剤が感性菌に対して殺菌作用がないと仮定している。しかし, 後述するように, 空洞中の結核菌が *in vitro* でみられるよりもずつと発育が遅いとすれば, 殺菌作用も *in vitro* よりは遙かに弱く考えてよい。(2) 抗結核剤がない場合でも, 分裂によつて新生する菌もあれば, 一方では老化して死んでゆく菌もあると思われる。しかし, この機構は耐性菌でも感性菌でも同じであるために p が一定の比率にあると考えられる。しかし, 薬剤があると感性菌の生活環が修飾されて死ぬ方の菌が多くなる⁸⁾。このような作用も上述の式では補正されていない。

上述の式は次のようにかきかえられる。

$$\begin{aligned} t \times \{(1/g) - (1/G)\} \times \log 2 \\ = \log p - \log(n/N) \end{aligned}$$

または,

$$t = \{\log p - \log(n/N)\} / \{(1/g) - (1/G)\} \log 2$$

今, RFP の場合の値を, この式に入れてみる。RFP を使用して空洞中の結核菌がほとんど全部耐性菌となる

とき ($p=100$ となる時) は, 表1の結果から2.5カ月と思われる。RFP 自然耐性菌の出現率は 10^{-8} であるので, $(n/N) = 10^{-8.9}$ 。RFP によつて感性菌の発育がとまつたとすると, $G = \infty$, すなわち $(1/G) = 0$ 。これらの数値を上式に入れると, $g = 54$ 時間または2.25日となる。この結果は, RFP 耐性菌の generation time が RFP 中で54時間であることを示す。RFP 耐性菌は *in vivo* に存在するような微量の RFP によつては発育速度が変わらないから, この generation time 54時間は, RFP を使用しないときの空洞内における結核菌の発育速度と考えてよい。従来, 空洞内の結核菌の発育速度については全く資料がないから, 上記の推定はおおまかではあるが, それなりの意義があると思う。空洞中の結核菌の発育速度が host によつて大分違うのではないかという心配はあまりないと思われる。これは, 表1に示すように, *in vivo* 耐性発現速度の標準偏差が比較的小さいことから考へうる。

上記の空洞中結核菌の generation time 54時間という数値は, *in vitro* の generation time の測定値12時間 (Youmans & Youmans¹⁰⁾ の方法によつて, 1% 小川培地で測定^{11,12)} という成績と比較すると随分と長い。すなわち, 空洞中の結核菌の発育速度は, *in vitro* で起こる速度よりも4倍以上遅い。このことは, 抗結核剤の *in vivo* の効果を考えるうえで充分注意する必要がある。抗結核剤の殺菌効果は actively growing cells には著明でも dormant cells には著明ではない^{13)~20)}。したがつて, *in vitro* でみられるような殺菌作用は, *in vivo* ではあまり期待できないのではないかと思われる。

次に上述の式で, g はほぼ一定と考えられるので, (n/N) がほぼ等しい二つの薬剤耐性発現の時間をみれば, その化学療法の強さを推定できる。すなわち, 感性菌に対する発育阻止作用が強い方が速く耐性発現が起るはずである。

今, RFP (毎日または間欠) と KM (1日1g週3日) を比較してみる。 (n/N) は両者とも約 10^{-8} の値が測定されている^{9,21,22)}。そして, RFP 耐性の発現は2.5カ月, KM高耐性の発現は5.1カ月であるから, 耐性発現の速い RFP の方が結核菌に対する阻止作用が強いと推定される。

また KM と TUM-N の比較も可能である。KM 低耐性に対する (n/N) は約 10^{-6} , TUM-N 低耐性に対する (n/N) は $10^{-6} \sim 10^{-7}$ で大差はない²²⁾。一方, KM 低耐性の発現は3.1カ月, TUM-N 低耐性の発現は4.8カ月であるから, *in vivo* における KM の作用は TUM-N より強いと推定される。

KM と LVM (両者とも1日1g週3日投与) では, (n/N) はともに 10^{-8} (KM 高耐性菌または LVM 耐性菌の感性株中の出現率²²⁾, 耐性発現は KM 高耐性が

5.1カ月, LVM 耐性が 4.7カ月で大差がない。したがって, KM と LVM の *in vivo* の抗結核菌作用はほぼ等しいと推定される。

以上の考察は多分に speculative な要素を含んでいるが, 空洞内の結核菌の発育速度についても, また *in vivo* 抗結核菌作用 (空洞内結核菌に対する) についても, これまで全く測定の方法がなかつたのであるから, ここに行なつた推定もそれなりの意義があると思われる。*In vivo* 抗結核菌作用の推定結果は, 次のごとくなり, これはほぼわれわれ臨床家の実感と一致している。

In vivo 抗結核菌作用の強さの順序:

RFP(毎日または週2回) > KM(週3g)
= LVM(週3g) > TUM-N(毎日)。

注. TH については, 「自然耐性菌」の存在が予想されるので推定はできない。「自然耐性菌」は突然変異菌ではなく, 治療前から存在する耐性菌である⁶⁾²³⁾。

結 論

抗結核剤を単独の条件で患者に使用した場合の耐性発現の期間は次のごとくであつた。RFP (1日 0.45g, 毎日, *per os*) 2.27カ月, RFP (1日 0.45g, 週2日, *per os*) 2.50カ月, KM(1日 1g, 週3日, 筋注) 3.07カ月 (KM 低耐性), TH (1日 0.5g, 毎日, *per os*) 3.33カ月, KM (1日 1g, 週3日, 筋注) 5.07カ月 (KM 高耐性), LVM (1日 1g, 週3日, 筋注) 4.68カ月, TUM-N (1日 1g, 毎日, 筋注) 4.80カ月。

以上の成績から, 空洞内の結核菌の発育速度の理論的推定を行なつた結果, generation time 54時間の数値を得た。この値は, *in vitro* (1%小川培地) の generation time 12時間に比較すると著しく長い。

また, 上述の結果に基づいて, *in vivo* 抗結核菌作用の理論的推定を行なつた結果, 空洞内結核菌に対する抗

菌作用の強さは, 強いものから弱いものへ次の順序であると推定された。

RFP(毎日または間欠) > KM=LVM > TUM-N

文 献

- 1) 東村道雄: 医学と生物学, 49: 87, 1958.
- 2) Tsukamura, M.: Jap.J. Tuberc., 12: 46, 1964.
- 3) 東村道雄: 結核, 47: 113, 1972.
- 4) 東村道雄・安保孝・勝沼六郎: 結核, 34: 625, 1959.
- 5) Tsukamura, M., Kasai, E. and Tsukamura, S.: Jap.J. Tuberc., 12: 27, 1963.
- 6) 東村道雄・安保孝: 結核, 36: 361, 1961.
- 7) 東村道雄・水野松司・村田浩・大島つな子: 結核, 50: 123, 1975.
- 8) Tsukamura, M. and Yamamoto, M.: J. Antibiotics, A, 11: 156, 1958.
- 9) Tsukamura, M.: Tubercle, 53: 111, 1972.
- 10) Youmans, G.P. and Youmans, A.S.: J. Bacteriol., 58: 247, 1949.
- 11) 東村道雄・野田用: 医学と生物学, 45: 150, 1957.
- 12) Tsukamura, M., Noda, Y. and Guidi, V.: J. Antibiotics, A, 11: 268, 1958.
- 13) 東村道雄: 医学と生物学, 22: 41, 1952.
- 14) Mitchison, D.A.: Brit. Med. J., 1: 1333, 1965.
- 15) 東村道雄: 結核, 26: 263, 1951.
- 16) Schaefer, W.B.: Amer. Rev. Tuberc., 69: 125, 1954.
- 17) 鈴木鐸三郎・東村道雄: 結核, 30: 567, 1955.
- 18) Van Orden, L.S. and Kirchheimer, W.F.: Amer. Rev. Tuberc., 71: 743, 1955.
- 19) Mitchison, D.A. and Selkon, J.B.: Amer. Rev. Tuberc., 74: 109, 1956.
- 20) Tsukamura, M., Noda, Y. and Torii, F.: J. Antibiotics, A, 13: 406, 1960.
- 21) Tsukamura, M.: Jap.J. Tuberc., 9: 43, 1961.
- 22) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: J. Gen. Microbiol., 88: 269, 1975.
- 23) 東村道雄: 結核, 37: 103, 1962.