

原 著

ガス曝露下における結核化学療法剤の効果に関する実験的研究
第3編 薬剤耐性獲得について

山 鳥 英 世

京都大学結核胸部疾患研究所内科 I (主任教授：前川暢夫)

国立療養所南京都病院(院長：磯部喜博博士)

受付 昭和 56 年 5 月 2 日

IN VITRO EFFECTS OF SEVERAL KINDS OF GAS EXPOSURE ON THE
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ANTITUBERCULOUS AGENTS

Chapter III. The Development of Drug Resistance

Hideyo YAMADORI*

(Received for publication May 2, 1981)

In the previous reports, unfavourable conditions for the growth of tubercle bacilli were prepared by replacing air with various other gases using Kirchner's medium containing various drugs, and the bacteriostatic and bactericidal effects of anti-tuberculous agents were investigated.

In this report, the development of drug resistance of *M. tuberculosis* which was not killed by the bactericidal tests was investigated.

The development of drug resistance was not observed, regardless of the duration of drug contact with bacilli and of exposure to several kinds of gases.

緒 言

前編ではシリコン被覆スライド培養法¹⁾²⁾を用いて、ガス曝露下において、結核化学療法の臨床に広く用いられる streptomycin(SM), kanamycin(KM), para-aminosalicylic acid(PAS), isoniazid(INH), および rifampicin(RFP) を殺菌効果の面から検討した。すなわち液体培地上の空気を窒素、炭酸ガス、および酸素を用いて、それぞれ単独で置換し、結核菌の発育に不適当と思われる条件下で殺菌効果を検討した。

さて、試験管内においてさえ、抗結核剤によつてすべての結核菌を死滅させることはかなり困難なことであるが、このことは抗結核剤による生体内殺菌の難しさを如実に示唆するものである。この生き残つた菌が薬剤に対

して感性であるか、耐性であるかは特に臨床上、治療効果に重大な関係がある。

前川ら³⁾は結核菌の発育に不適当な条件と化学療法に関する研究の一環として、培養温度と化学療法剤の効果を検討する実験を行なつた。すなわち試験管内で結核菌 H₃₇Rv 株に INH を作用させ、その作用温度を 25°C, 4°C とすると、37°C の場合に比較して、薬剤効果は非常に減弱された。その際の INH 耐性上昇は認めなかつたと報告している。

著者は抗結核化学療法剤のうち SM, KM, PAS, INH, および RFP を試験管内において、種々の薬剤濃度で作用させながら、培地上の空気を窒素、炭酸ガス、および酸素にそれぞれ単独で流入させることで置換し、これらのガス曝露下における結核化学療法で、結核菌が獲得す

* From the First Department of Medicine Chest Disease Research Institute, Kyoto University, 53 Kawaramachi Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

る耐性の有無について試験管内実験により検討した。

第1章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

試験管, シリコン被覆スライド (以下SSと略す), 菌株, 菌液および菌接種方法, 培地はすべて第1編, 第2編と同様である。被検薬剤も同様である。なお, これら他に増菌培養の目的に1%小川培地を使用した。

第2節 実験条件および実験方法

第1編記載の方法によつて発育阻止効果を判定し, 更に第2編の方法によつて殺菌効果を判定し, この殺菌効果の判定の際に認められた菌集落について, それぞれ耐性検査を行なつた。

実験群の構成: ①各薬剤 (SM, KM, PAS, INH, RFP) 単独作用2週間で, 窒素, 炭酸ガス, および酸素をそれぞれ単独に作用。②①と同様に薬剤作用3週間。③①と同様に薬剤作用4週間。これらについて, それぞれの薬剤の耐性検査を行なつた。

実験操作: 実験操作は, 第2編で述べたように殺菌効果判定後, 結核菌付着 SS 上の菌集落を1%小川培地に移して4週間にわたり増菌し, 第1編と同様にシリコン被覆スライド培養法を用いて行なつた。すなわち菌集落の発育した SS を直接ピンセットではさんで1%小川培地面に密着させることで全集落を増菌に供した。また菌集落が少ないものについては, ピペットで1%小川培地へ注入した。こうして4週間, 37°Cで培養増菌後, 1%小川培地上に発育した全集落で耐性検査を行なつた。耐性検査は1%小川培地上に発育した菌集落から石油ベンジン菌液をつくり, 硫酸バリウム標準液と比色することにより約 0.1 mg/ml の菌液を作つた。次いでこの菌液を小試験管に3ml 注入し, SS を1枚ずつ菌液中に瞬時浸漬した後, 数秒間そのまま保持して引き上げ石油ベンジンが蒸発, 除去された後, あらかじめ用意をした薬剤含有培地に投入し37°Cで培養した。

耐性検査培地および検査方法: 10%牛血清加キルヒナー培地を用いた。耐性検査濃度は第1編と同様に希釈し, SM, KM, PAS は第1管を 20 µg/ml とし, 第2管から第9管まで倍数希釈し第10管は対照培地とした。INH, RFP は第1管を 2 µg/ml とし, 同様に倍数希釈し第10管は対照培地とした。

判定方法: 第1編と同様である。

第2章 実験成績およびその比較検討

耐性検査成績は薬剤作用4週間の場合について表1, 2, 3に示した (薬剤作用2週間および3週間については, 4週間とほぼ同様の成績であつたので省略した)。

第1節 薬剤作用2週間の場合

耐性検査の結果, いずれの薬剤および薬剤濃度におい

表1 耐性検査成績(窒素曝露)薬剤作用4週間

薬	剤 (µg/ml)	耐性検査濃度 (試験管番号)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
SM	1	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	10	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	100	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
KM	10	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	100	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍
PAS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卍
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍
	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍
INH	0.1	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍
	1	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍
RFP	0.1	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍

判定方法: 第1編記載の方法による。
耐性検査濃度: 第1管濃度 SM: 20 µg/ml, KM: 20 µg/ml, PAS: 20 µg/ml, INH: 2 µg/ml, RFP: 2 µg/ml。
以後第9管まで倍数希釈, 第10管は対照, 以下表2, 表3も同様である。

表2 耐性検査成績(炭酸ガス曝露)薬剤作用4週間

薬	剤 (µg/ml)	耐性検査濃度 (試験管番号)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
SM	1	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	10	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	100	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
KM	1	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	10	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	100	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍
PAS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍
	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍
INH	1	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍
	K	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍

ても, いずれのガス曝露でも, 薬剤非含有培地でガス流入させた対照 (以下Kと略す) と同様で耐性上昇は認めなかつた。

第2節 薬剤作用3週間の場合

表3 耐性検査成績(酸素曝露)薬剤作用4週間

薬 剤 ($\mu\text{g/ml}$)		耐性検査濃度 (試験管番号)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
SM	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	K	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
KM	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	K	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PAS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
INH	0.1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	K	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

耐性検査の結果、いずれの薬剤および薬剤濃度においても、いずれのガス曝露でも、薬剤非含有培地でガスを流入させたKと同様に耐性上昇は認めなかつた。

第3節 薬剤作用4週間の場合

耐性検査成績を窒素曝露について検討してみると、菌発育はSMのKで第7管まで、すなわち minimal inhibitory concentration (MIC) は $0.63 \mu\text{g/ml}$ であつた。KMのKで第8管、すなわち MIC は $0.31 \mu\text{g/ml}$ であつた。PASはKにおいてのみ菌の発育を認めた。INHのKで第8管、すなわち MIC は $0.03 \mu\text{g/ml}$ であつた。RFPのKでは第6管、すなわち MIC は $0.12 \mu\text{g/ml}$ であつた。SM, KM, PAS, INH, および RFP ともに被検菌株の菌発育は、いずれの薬剤濃度でも、ほとんどKと同様に耐性上昇は認めなかつた。炭酸ガス、酸素曝露の場合も同様に、ほとんどKと同様に、耐性上昇は認めなかつた。

第4節 薬剤作用2週間、3週間、および4週間における比較検討

抗結核化学療法下において、窒素、炭酸ガス、および酸素をそれぞれ単独で流入し、各薬剤を作用期間2週間、3週間、および4週間作用させ、死滅しなかつた菌株について、それぞれの薬剤に対する耐性獲得の有無について、耐性検査を行なつた。いずれのガス流入においても、各薬剤の種類と濃度、ならびにいずれの薬剤作用期間においても、耐性の上昇は認められなかつた。

第3章 考 案

試験管内モデル実験の一つとして、結核菌の発育に不

適当と思われる条件を、液体培地上の空気を窒素、炭酸ガス、および酸素で、それぞれ単独で置換することにより作製し、抗結核剤 SM, KM, PAS, INH, RFP を2週間、3週間、および4週間作用させ殺菌効果を判定した後、死滅しなかつた菌株について、それぞれの薬剤の耐性検査を行なつたところ、耐性上昇は認められなかつた。

前川ら³⁾は結核菌の発育に不適當な培養温度 25°C および 4°C で、INHを中心に抗結核剤を作用させたときの殺菌効果を検討し、作用温度 25°C 、 4°C では、 37°C の場合に比較して、薬剤効果は非常に減弱され、その際のINH耐性上昇は認めなかつたと報告している。

裏辻⁴⁾は結核菌の発育に不適當な培養温度 4°C 、 25°C で抗結核剤 RFP を単独作用させた菌株について、RFP耐性検査を行なつたところ、 4°C 、 25°C 、 37°C すべてについて耐性上昇は認められなかつたと報告している。

太田⁵⁾はほとんど増殖を休止しているSM依存性人型結核菌18b株に対して、通常ガス環境で、INH, INH・KM, INH・KM・TH, INH・KM・TH・EBを作用させ、これらの菌株について耐性検査を施行し、耐性上昇は全く認められなかつたと報告している。

第4章 結 語

結核菌の発育に不適當と思われる条件を、液体培地上の空気を窒素、炭酸ガス、および酸素で、それぞれ単独で置換することにより作製し、抗結核剤 SM, KM, PAS, INH, RFP を2週間、3週間、および4週間作用させた菌株について、耐性検査を施行した。これらの菌株については、いずれの薬剤および薬剤作用期間、ならびに、いずれのガス環境においても耐性上昇は認められなかつた。すなわち結核菌の培養過程で、その環境を窒素、炭酸ガス、および酸素等で置換しながら抗結核剤を作用させた後の結核菌の薬剤耐性を検討したが、耐性獲得は全く見られなかつた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜つた池田宣昭講師に深甚なる謝意を表す。また終始御協力頂いた研究室の西尾貞子、本間トキエ、細木春世の各氏に心から感謝する。

なお、本論文の要旨は第46回日本結核病学会近畿支部学会で発表した。

文 献

- 1) 東向一郎：結核菌の Silicone-coated Slide Culture Method (SSC), 京大結研紀要, 7: 増刊1号, 461, 1959.
- 2) 東向一郎：結核菌の Silicone-coated Slide Culture Method (SSC), 京大結研紀要, 7: 増刊2号, 22, 1959.

- 3) 前川暢夫他：結核菌の発育に不適當な条件と化学療法—I. 培養温度と化学療法剤の效果, 結核, 46 : 235, 1971.
- 4) 裏辻康秀：Rifampicin (RFP) の抗結核作用と作用時間に関する試験管内実験的研究—III. 薬剤耐性獲得について, 京大結研紀要, p. 13, 1977.
- 5) 太田令子：Streptomycin依存性結核菌を用いた増殖休止菌に対する抗結核剤の效果に関する研究, 結核, 46 : 295, 1971.