

原 著

Mycobacterium avium Complex の抗結核剤に対する交叉耐性

束 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和 63 年 5 月 25 日

CROSS-RESISTANCE RELATIONSHIPS OF ANTITUBERCULOSIS DRUGS
IN *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication May 25, 1988)

At present, infection caused by *Mycobacterium avium* complex is usually treated by chemotherapy of antituberculosis drugs. However, cross-resistance relationships of antituberculosis drugs in the *M. avium* complex have not yet been studied. In the present study, we studied on this subject using three strains which were isolated from sputum specimens of patients who were not treated by any antituberculosis drugs : strain 13008 (serotype 20), strain 13016 (serotype 4) and strain 13034 (serotype 18). The methods used for isolating mutants resistant to rifampicin, isoniazid, ethambutol, streptomycin, kanamycin and/or enviomycin were described previously (Tsukamura, M. : Kekkaku 62 : 445-458, 1987). Mutants resistant to ethionamide were isolated from strains 13008 and 13016 at a rate of 10^{-6} and mutants resistant to kidasamycin at a rate of 10^{-5} to 10^{-6} (these were not isolated from strain 13034). In contrast, mutants resistant to minocycline were isolated from strain 13034 only at a rate of 10^{-4} .

Susceptibility testings to antituberculosis drugs were carried out as follows. Bacterial suspensions, 10 mg wet weight/ml, were prepared from ten day-old cultures of the strains growing on Ogawa egg medium slants. Each 0.02 ml-sample of the suspensions was inoculated onto Ogawa egg medium with or without a drug by a spiral loop. The media inoculated were incubated at 37°C for 14 days. Minimal inhibitory concentration was determined as a concentration, on which no membranous growth could occur.

The results are shown in Tables 1 to 3. Cross-resistance relationships were observed only between ethionamide and isoniazid. Ethionamide-resistant mutant strains were resistant to isoniazid. However, isoniazid-resistant mutant strains were as susceptible as parent strains to ethionamide. Therefore, there existed only "one-way cross-resistance" relationship from ethionamide resistance to isoniazid resistance. Other cross-resistance relationships were not observed. Ethambutol-resistant mutant strains isolated from strain 13008 were fourfold more resistant to streptomycin, kanamycin and enviomycin. However, ethambutol-resistant mutant strains from strain 13016 were not resistant to these drugs, showing no existence of such one-way cross-resistance relationship.

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

Key words : *Mycobacterium avium* complex,
Cross-resistance

キーワード : *Mycobacterium avium* complex,
交叉耐性

緒 言

Mycobacterium avium complex による肺感染症は、現在、難治の疾患として呼吸器臨床家の関心を集めている。本症は、通常、抗結核剤の組合せで治療されているが、抗結核剤にどの程度の治療効果が期待できるのかという点と、結核菌の場合のように抗結核剤使用による耐性の出現があるのかどうかということが問題となる。最近、Tukamura¹⁾は、*M. avium* complex でも、抗結核剤の投与によって耐性の上昇が起こることを示した。このように、臨床的に耐性菌の出現が起こり得るとなると、次には、*M. avium* complex では交叉耐性がどうなっているのが問題となる。*M. avium* complex は、結核菌とは別の菌種であるから、結核菌の交叉耐性の知識がそのまま通用するとは限らない。したがって、われわれは、本報で、*M. avium* complex の抗結核剤交叉耐性について研究してみることにした。

研究方法

1) 菌 株

Mycobacterium avium complex に属する3株を使用した。すなわち、13008 (血清型 20)、13016 (血清型 4) および 13034 (血清型 18) である。3株とも、抗結核剤未使用の患者の喀痰から分離同定された。このうち、前2株は、大部分の抗結核剤に感受性が高く、後の1株は感受性が低い。これら3株は、われわれが前に抗結核剤に対する耐性発現形式を研究した株なので、前報²⁾に感受性の度合いを示してある。

2) 抗結核剤耐性菌の分離

耐性菌は、前報の研究で *in vitro* で分離したものを使用した。原株中における耐性菌の出現頻度 (突然変異頻度 mutation frequency) は前報に示した²⁾。抗結核剤の中で、rifampicin (RFP), isoniazid (INH), ethambutol (EB), streptomycin (SM), kanamycin (KM), および enviromycin (EVM) 耐性菌の分離法は、前報²⁾に示してあるが、ethionamide (TH), kansasmycin (KT) および minocycline hydrochloride (MC) 耐性菌の分離については示されていない。これらの耐性菌は、同じ方法で分離したが、実験に使用した薬剤濃度は、次のごとくである。TH, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 0 μ g/ml。KT, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 0 μ g/ml。MC, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.6, 0.8, 0 μ g/ml。

TH 耐性菌は、13008 株および 13016 株から 10^{-6} の頻度で分離できた。13034 株は、10 mg/ml 菌液 0.02 ml の接種で 800 μ g/ml に菌膜発育を示したので、TH 耐性菌は分離できなかった。KT 耐性菌も、同じように、13008 および 13016 の2株だけから分離できた。原株中の耐性菌含有率は約 10^{-5} ~ 10^{-6} であった。逆に、MC 耐性菌は、13008 および 13016 株では、 10^8 ~ 10^9 生菌単位中にも見出されず、分離は不可能であった。ただ、13034 株からは、 10^{-4} の割合で分離できた。

3) 抗結核剤感受性の測定

小川培地に10日間培養した原株および耐性株の集落を取って10 mg 湿菌量/ml の菌液を作り、その0.02 ml を各培地に接種した。測定には、「1%小川培地」を使用し、各薬剤は培地滅菌前に、次の濃度となるように添加した。KM, EVM, 400~1.6, 0 μ g/ml; RFP, SM, TH, INH, 200~0.8, 0 μ g/ml; EB, KT, MC, 100~0.4, 0 μ g/ml (2倍希釈列)。RFP と TH は水に不溶のため propylene glycol に溶解し、他の薬剤は水に溶解し、その1容を滅菌前の小川培地100容に添加し所定の濃度を得た。培地は、165×16.5 mm の試験管に7 ml ずつ分注し、90°C 60分滅菌して斜面培地とした。接種後の試験管に、底に3 mm の切れ目のあるダブルゴム栓を覆せ、37°C 14日間培養の後、最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。MIC は完全発育阻止の起こる最小濃度とした。しかし、時に僅少の痕跡的発育がみられる場合があったが、これは発育阻止と判定した。対照培地では、常に豊富な膜状発育 (集落融合発育) がみられたからである。

研究成績および考察

研究結果を Table 1~3 に示した。著明な交叉耐性が認められたのは、TH→INH の場合だけであった。13008 株および 13016 株の TH 耐性菌は、TH 耐性が原株の32倍以上に上昇していた (MIC が32倍以上であった)。これに伴って、INH 耐性は、16~64 倍上昇していた (INH の MIC が16~64 倍増加した)。しかしながら、INH 耐性菌の TH 感受性は不変であった。したがって、この両株で観察された TH と INH に対する感受性の関係は、完全交叉耐性ではなく、TH 耐性→INH 耐性という「一方向性交叉耐性」であると考えられた。その他の薬剤については、著明な交叉耐性は認められなかった。ただ、13008 株から得た EB 耐性菌のみが、SM, KM, EVM に対して4~8倍の耐性度上昇を起こしていた

Table 1. Comparison of the susceptibilities to antituberculosis drugs between parent strain and their drug-resistant mutant strains of *Mycobacterium avium* complex

Drug ^{a)}	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) determined in the Ogawa medium									
	Strain 13008 ^{b)}									
	Parent	RFP-R	SM-R	TH-Ra	TH-Rb	INH-R	EB-R	KM-R	EVM-R	KT-R
RFP	0.8	> 200.	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
SM	3.13	6.25	> 200.	3.13	3.13	3.13	12.5	6.25	6.25	3.13
TH	25.	12.5	12.5	> 800.	> 800.	25.	50.	25.	25.	25.
INH	1.6	1.6	3.13	25.	25.	> 200.	3.13	1.6	1.6	1.6
EB	0.8	0.4	1.6	0.8	1.6	1.6	50.	1.6	1.6	0.4
KM	6.25	6.25	6.25	3.13	6.25	6.25	25.	> 400	25.	1.6
EVM	6.25	12.5	6.25	3.13	6.25	6.25	50.	6.25	50.	6.25
KT	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	> 200.
MC	3.13	3.13	3.13	1.6	3.13	1.6	3.13	3.13	3.13	1.6

a) Abbreviations. RFP, Rifampicin; SM, Streptomycin; TH, Ethionamide; INH, Isoniazid; EB,

Ethambutol; KM, Kanamycin; EVM, Enviomycin; KT, Kitasamycin; MC, Minocycline.

b) R=Resistant strain. Strains TH-Ra and TH-Rb were isolated in independent experiments.

Table 2. Comparison of the susceptibilities to antituberculosis drugs between parent strain and their drug-resistant mutant strains of *Mycobacterium avium* complex

Drug	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) determined in the Ogawa egg medium									
	Strain 13016									
	Parent	RFP-R	SM-R	TH-Ra	TH-Rb	INH-R	EB-R	KM-R	EVM-R	KT-R
RFP	0.8	50.	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
SM	3.13	3.13	> 200.	3.13	3.13	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13
TH	25.	50.	25.	> 800.	> 800.	12.5	25.	50.	50.	25.
INH	3.13	3.13	6.25	200.	50.	100.	3.13	6.25	3.13	3.13
EB	0.8	0.8	1.6	0.8	0.8	0.8	6.25	0.8	1.6	0.8
KM	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25	> 400.	12.5	6.25
EVM	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	50.	12.5
KT	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	100.
MC	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	3.13

Drug	Strain 13034						
	Strain 13034						
	Parent	RFP-R	SM-R	INH-R	KM-R	EVM-R	MC-R
RFP	50.	> 200.	50.	50.	25.	50.	50.
SM	50.	100.	> 200.	50.	50.	100.	50.
TH	25.	25.	25.	50.	50.	12.5	25.
INH	12.5	6.25	12.5	> 200.	25.	3.13	6.25
EB	6.25	12.5	12.5	6.25	6.25	3.13	12.5
KM	100.	200.	50.	100.	> 400.	200.	50.
EVM	100.	100.	50.	100.	50.	> 400.	100.
KT	50.	100.	50.	50.	50.	100.	100.
MC	25.	50.	12.5	25.	12.5	25.	100.

Table 3. Comparison of the susceptibilities to antituberculosis drugs between parent strains and their ethambutol-resistant mutant strains of *Mycobacterium avium* complex

Drug	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) determined in the Ogawa egg medium										
	Strain 13008						Strain 13016				
	Parent	Parent	EB-Ra	EB-Rb	EB-Rc	EB-Rd	Parent	Parent	EB-Ra	EB-Rb	EB-Rc
RFP	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
SM	6.25	3.13	25.	12.5	25.	25.	6.25	6.25	12.5	3.13	6.25
TH	25.	50.	25.	50.	100.	50.	25.	50.	25.	12.5	50.
INH	3.13	1.6	6.25	1.6	6.25	1.6	3.13	3.13	3.13	3.13	12.5
EB	0.8	0.8	50.	6.25	25.	50.	0.8	0.8	6.25	6.25	6.25
KM	6.25	6.25	25.	12.5	25.	50.	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25
EVM	6.25	12.5	50.	25.	50.	50.	12.5	25.	50.	6.25	50.
KT	12.5	25.	12.5	6.25	12.5	25.	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
MC	3.13	3.13	6.25	6.25	3.13	3.13	1.6	1.6	3.13	1.6	1.6

Ethambutol-resistant strains, EB-Ra, EB-Rb, EB-Rc and EB-Rd, were isolated in independent experiments.

(Table 1)。しかし、13016株のEB耐性菌のSM, KM, EVMに対する感受性は原株と同じであった。このように、EB耐性菌の他抗結核剤感受性については、菌株による差が認められたので、確認のために次の追加実験を行った。13008株からは、独立に行った4実験で4株のEB耐性株を分離し、13016株からは、3実験で3株のEB耐性株を分離した。13034株からは、EB耐性株を分離できなかった²⁾。これらのEB耐性株の他抗結核剤に対する感受性を調べてみると、やはり、13008株のEB耐性株のみが、SM, KM, EVMに対して4倍程度の耐性度上昇を示した (Table 3)。われわれの行った方法で、SM, KM, EVM感受性測定誤差は4倍 (2段階) を越えないと思われるので¹⁾、13008株のEB耐性菌は、SM, KM, EVMに対しても軽度の耐性度上昇を起こしていると思われる。しかし、この現象は、今のところ、13008株に限って認められた現象であり、普遍的なものとはいえないように思われる。

M. avium complex 感染症に対して抗結核剤が一般的に使用されているにもかかわらず、菌の交叉耐性については全く研究されたことがなかった。今回、われわれは、これについて研究したわけであるが、TH耐性菌を分離しえた2株については、いずれもTH耐性→INH耐性という「一方向交叉耐性」だけが認められた。逆に、INH耐性菌のTH感受性は変わっていない。*M. avium* complex 感染症の治療でも、最初は、RFP, INH, SM, EBなどのいわゆる major drugs が使用されることが多く、THの使用はINHの後になることが多い。したがって、*M. avium* complex については、交叉耐性のことを、あまり考慮せずに治療を行ってもよいといえる。

上記のTH→INHの「一方向交叉耐性」は、*Mycobacterium tuberculosis* では認められていない。

Rist³⁾もTHとINHの間に交叉耐性はないと述べているし、われわれの研究結果でも、THとINHの間に交叉耐性はなかった⁴⁾。*(M. tuberculosis* では、THとAmithiozoneの間に交叉耐性が報告されている)³⁾⁴⁾。したがって、*M. tuberculosis* と *M. avium* complex では、交叉耐性の様相はちがっている。これは、別の菌種であるから、交叉耐性にちがいがあっても不思議ではないと思われる。

結 論

Mycobacterium avium complex の3株を用いて、この菌の抗結核剤に対する交叉耐性を研究した。TH耐性菌は、2株でのみ分離できたが、2株とも、TH耐性→INH耐性という交叉耐性が認められた。逆に、INH耐性菌は、TH感受性を変えていないことが、3株とも観察された。したがって、THとINHの間では、TH耐性→INH耐性という一方向交叉耐性のみが存在する。13008株のEB耐性菌は、SM, KMおよびEVMに対して、約4倍の耐性度上昇を示した。しかし、他の13016株では、この現象は認められなかった。*M. avium* complex における交叉耐性の関係は、*M. tuberculosis* のそれとは異なっている。

文 献

- 1) Tsukamura, M.: Evidence that antituberculosis drugs are really effective in the treatment of pulmonary infection caused by *Mycobacterium avium* complex, Am Rev Respir Dis, 137: 144-148, 1988.

- 2) 束村道雄 : *Mycobacterium avium* complex の抗結核剤に対する耐性形式, 結核, 62 : 445~458, 1987.
- 3) Rist, N. : L'activité antituberculeuse de l'ethionamide (l'alpha-éthyl-thioisonicotinamide ou 1314Th). Étude expérimentale et clinique. *Advances in Tuberculosis Research*, 10 : 69-126, 1960.
- 4) 束村道雄 : 結核菌の α -ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th) 耐性に関する基礎的研究. 耐性形式, 交叉耐性ならびに併用効果について, 結核, 36 : 733~738, 1961.