

短 報

Mycobacterium avium Complex の Isoniazid および
Ethionamide 感受性についての知見補遺

東 村 道 雄 ・ 矢 守 貞 昭

藤田学園保健衛生大学医学部微生物学教室
国立療養所中部病院呼吸器科

受付 平成元年7月20日

IN-VITRO SUSCEPTIBILITY OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX
TO ISONIAZID AND ETHIONAMIDE

Michio TSUKAMURA * and Sadaaki YAMORI

(Received for publication July 20, 1989)

In this study, it was investigated whether or not *Mycobacterium avium* complex strains were inhibited by such low concentrations of isoniazid and ethionamide as possible in blood. The inhibitory concentrations were determined by the "Actual Count" method (Tsukamura, M. : Japan. J. Tuberc. 12 : 46-54, 1964), in which the inhibitory concentration was measured as a concentration that can inhibit the growth of 'countable' colony-forming units. The ratio of strains which were inhibited by such low concentrations as 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ isoniazid or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethionamide was 14%. The result suggests that there are some strains in which isoniazid or ethionamide are clinically effective, though their prevalence was low (14%).

Key words : *Mycobacterium avium* complex, Susceptibility to isoniazid, Susceptibility to ethionamide

キーワード : *Mycobacterium avium* complex, INH 感受性, TH 感受性

緒 言

Mycobacterium avium complex 感染症の治療における抗結核剤の臨床効果の評価は、極めて重要な問題でありながら、これほどよく分かっていない問題もないといってよい。われわれは、日常、抗結核剤の組み合わせで治療を行いながら、その評価が判然としないということは、明確な効果がないということであるかもしれない。

その中でも、特に Isoniazid (INH) の役割については、全く知られていないといえる。

M. avium complex 感染症の患者は、菌の同定ができるまで肺結核症として治療されるのが通例であるから、この段階で、ほとんど全部の患者が INH の投与を受けるはずである。それにもかかわらず、INH の効果についての知見がない理由の1つは、結核菌用の耐性検査で、ほとんど全部の *M. avium* complex 株が INH に耐性

* From the Department of Microbiology, Fujita-Gakuen Health University Medical School, Toyoake, Aichi 470-11 Japan.

を示すことによると思われる。これらのINH感受性測定は、比較的大量の生菌単位 (colony-forming units = CFU) を使用して行われた。“Actual Count”法¹⁾²⁾のように、比較的小さいCFUを使用して測定されたことがない。“Actual Count”法で、結核菌の場合に感受性と考えられているINHの濃度に、感受性を示す株が、*M. avium* complexの中に何%くらいあるのだろうかと考えたのが、この研究の発端である。

ところで、INHに対する感受性を“Actual Count”法のような手間のかかる方法で測定する以上、ついでに他の抗結核剤の感受性も測る方が能率的である。このような対象としてEthionamide (TH)を選んだ。この薬剤に対する感受性も、今まで精確に測られたことがない。また、その臨床的役割も今まで積極的に評価されたことがない。THは、Davidson³⁾、Dutt and Stead⁴⁾、田村ら⁵⁾によって、多剤併用療法の一環として使用され、ある程度の効果があったと報じられているが、彼らのような効果は、多剤併用の効果であるので、果たしてTHの効果があったのかどうかは明らかでない。そこで、試験管内感受性試験から、THが効果がある見込みがあるのかどうか観察してみたいと思った次第である。

実験方法

被検株は58株で、いずれも既報の方法⁶⁾によって同定された。同定にあたっては、全株、単個集落を分離し、これを継代保存した。保存は凍結乾燥または -20°C 冷凍によった。58株中19株は、ニワトリの病巣から分離したものである。これらの菌株の番号は、はじめ2桁が11となっている。もちろん、化学療法を受けたニワトリはいない。他の39株は、患者から分離したものである。3カ月以上の化学療法歴のある患者の分離株は除外した。

INHおよびTHに対する感受性検査は、“Actual Count”法¹⁾²⁾により、次のごとく行った。菌株を「1%小川培地」に 37°C 10日間培養し、まず10 mg/ml (湿菌量)の菌液を作り、これを0.1% Tween 80水溶液で希釈し、 10^{-7} までに至った。 10^{-5} 、 10^{-6} および 10^{-7} 希釈液を接種源とし、その0.02 mlずつを渦巻白金耳で次の培地に接種した。小川培地 (対照)、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INH含有小川培地、2.5および5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TH含有小川培地 (各2本ずつ)。小川培地は、7 mlずつ165×16.5 mm試験管に分注し、 90°C 60分間滅菌して斜面培地とした。上記濃度を使用した理由は、考察で述べる。INHは蒸留水に、THはpropylene glycolに溶解し、その1容を100容の滅菌前の小川培地に加えて所要の濃度を得た。

接種後の培地には、3 mmの切れ目を底に持つダブルゴム栓を覆せ、 37°C に21~28日培養した。被検株には、

平たい広がった集落を形成するものと、小さく盛り上がった集落を形成するものがあり、前者は一般に21日後に、後者は28日後に集落数を数えた。「発育阻止濃度」は、対照培地に10~100集落を示す菌液を接種した培地の組で、全く集落発育を認めない濃度として判定した。すなわち、“Actual Count”法によった¹⁾²⁾。

実験成績

Table 1に実験成績を示す。58株中、INH 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ により発育を阻止された株が、8株 (14%)あった。また、TH 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ によって発育を阻止された株が、それぞれ6株 (10%)および8株 (14%)あった (Table 2)。

考 察

実験方法の部で、*M. avium* complex株の集落形態にふれたが、INHとTHの感受性と集落形態の間には、有意の相関性は認められなかった。これについては別報するが、他の抗結核剤、Rifampicin, Ethambutol, Streptomycin, Kanamycin, Enviomycin および Sulfadimethoxineの感受性と集落形態の間には、相関性が認められた。

われわれは、前に、*M. avium* complexの抗結核剤感受性検査を行ったが、最小発育阻止濃度 (MIC) は接種生菌単位によって結核菌以上に影響されることが分かった⁷⁾。冒頭にも述べたように、INHとTHとは、*M. avium* complexの治療にほとんど無効と考えられているが、本当に無効かどうか知りたかった。その理由の1つに、最近のわれわれの観察によれば、INHの投与によって菌のINH感受性が低下する現象、すなわち、耐性出現の現象が見られたからである⁸⁾。このことは、INH投与によって、感受性菌の発育が阻止されたことを意味するから、INHの投与が、必ずしも無効ではないことを示すといえるからである。それでは、INHに感受性のある株が、どの位の頻度で存在するかが知りたい。この研究は、そのような目的で行った。

結核菌では、INH 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性菌が出現すれば、INHがその臨床効果を著減することが知られている⁹⁾。INHの血中濃度は、常用量で2~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達するのであるから¹⁰⁾¹¹⁾、このように0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性菌が出現すると、効力が著減することは、一見、不可解にみえるかもしれない。著者の1人は、かつて、パスツール研究所のCanetti博士に面会した際、彼も0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性出現が、INHの効力をほとんど無効にする境界点と考えていることを知った¹²⁾。

ところで、束村・安保¹³⁾¹⁴⁾の研究によると、INHで結核を治療した場合に出現するINH耐性の上限は、個人によってまちまちであり、相当数の患者では、いくら

Table 1. Susceptibility of *Mycobacterium avium* Complex to Isoniazid and Ethionamide Determined by the "Actual Count" Method

Strain	Minimal Inhibitory Concentration Determined by the "Actual Count" Method ($\mu\text{g/ml}$)			
	No Drug	Isoniazid 0.2 $\mu\text{g/ml}$	Ethionamide 2.5 $\mu\text{g/ml}$	Ethionamide 5 $\mu\text{g/ml}$
111001	80	72	42	40
111004	20	18	14	9
111006	15	12	12	11
111008	20	22	12	16
111009	20	22	18	16
111014	25	27	28	26
111003	32	16	33	20
111005	10	8	7	9
111007	50	25	42	40
111012	18	12	12	9
111013	13	9	14	6
111015	26	26	24	31
111016	62	55	44	20
111021	40	28	0	0
111037	16	10	0	0
111038	12	10	0	0
111019	15	15	15	14
111020	25	19	12	15
111025	23	25	25	15
130008	20	15	15	5
13016	10	4	8	2
13021	30	24	18	17
13038	12	10	20	15
13543	30	15	0	0
13885	14	12	0	0
13887	17	13	15	13
13984	50	42	27	14
13985	22	8	10	0
13-1868	20	15	16	5
13-1870	20	0	24	2
13-1871	48	48	33	19
13-1872	27	25	18	10
13034	25	25	22	12
13039	30	25	24	20
13542	22	20	15	2
13884	15	0	12	9
13009	18	10	0	0
13011	20	18	24	18
13013	30	20	34	36
13022	25	29	20	23
13023	52	40	36	29
13025	32	20	34	18
13032	20	18	16	14
13033	62	50	74	60
13-1873	54	44	40	36
13-2726	22	10	23	22
13-2730	53	18	59	4
13-2732	8	0	11	0
E12332	39	44	43	21
E12337	127	0	70	71
E12417	46	2	50	25
E12457	11	0	21	24
E12458	72	0	77	46
E12460	91	0	69	53
13-2902	16	15	20	18
13-3013	25	22	18	11
13-3200	18	19	16	19
13-3458	18	16	18	10

The numbers shown in the table show the numbers of colonies grown in a medium after incubation at 37°C for 21 to 28 days.

Table 2. The Ratio of *Mycobacterium avium* Complex Strains which were Inhibited by Low Concentrations of Isoniazid and Ethionamide, Respectively and in which Clinical Efficacy of These Drugs were Expected

The Number of Strains Inhibited by Concentration of Isoniazid 0.2 $\mu\text{g/ml}$	8 / 58 (14%)
The Number of Strains Inhibited by Concentration of Ethionamide 2.5 $\mu\text{g/ml}$	6 / 58 (10%)
The Number of Strains Inhibited by Concentration of Ethionamide 5 $\mu\text{g/ml}$	8 / 58 (14%)

INH 投与を続けても 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性以上に耐性度が上がらない場合がある。上述したように、INH の血中濃度にも個人差が大きい、いわゆる“Rapid inactivator”といえども 2 $\mu\text{g/ml}$ に達する。それにもかかわらず、結核菌の耐性度は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上に上がらない場合がある (1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性にならない場合がある)。この現象は、不可思議に思われるが、事実である。このような状況を考えると、*M. avium* complex 症で INH の効力が期待できる場合も、INH 0.1~0.2 $\mu\text{g/ml}$ 感受性 (“Actual Count” 法) と考えた方がよいと思われる。以上を考慮して、INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 感受性の有無を調べてみることにした。

一方、結核の場合に、TH 感受性と TH の臨床効果を調べた研究がある¹⁵⁾。“Actual Count” 法で結核菌の感受性を調べて、TH 5 $\mu\text{g/ml}$ また TH 10 $\mu\text{g/ml}$ に感受性があれば、TH は効果があり、TH 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上に耐性があると無効のように思われた。したがって、TH が有効な感受性の境界値は 10 $\mu\text{g/ml}$ 感受性であるよう思われる。しかし、0.25 g 投与の場合の TH の血中濃度の最高値は 3~6 $\mu\text{g/ml}$ であるという報告¹⁶⁾ を考慮すれば、5 $\mu\text{g/ml}$ を境界値とする方が、より確かと思われた。

われわれの目的は、TH が効果がありそうな *M. avium* complex 感染症の症例数を知りたいのが目的であるから、TH 感受性の境界値をやや低目に設定した方が、より無難と考えて、本法では、TH 2.5 $\mu\text{g/ml}$ と 5 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を “Actual Count” 法で調べてみることにした。その結果は、Table 2 に示すとおりで、INH の場合は、14%、TH の場合は、10~14% の患者で効果が期待できると思われた。一般に、*M. avium* complex 感染症の治療に INH は無効と考えられ、TH も多くを期待されていないが、症例によってはある程度の有効性が期待できるのではないと思われる。

総括

“Actual Count” 法で *Mycobacterium avium* complex の INH および TH 感受性を検査すると、おおよそ 14% (8/58) の菌株は、INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ または TH 5 $\mu\text{g/ml}$ に感受性があった。一般に、*M. avium* complex は、INH および TH 特に INH には高耐性であると思われているが、すべての株が高耐性ではなく、少数の株は、意外にも、上記のような低濃度にも感受性を示すことが分かった。このことは、INH および TH が、臨床的に全く無効とはいえないことを示唆している。約 14% の患者では、ある程度の効果が期待できると思われる。

文献

- 1) 東村道雄：Kanamycin の耐性検査，医学と生物学，49：87~90，1958。
- 2) Tsukamura, M. : “Actual count” method for the resistance test of tubercle bacilli, Japan J Tuberc, 12 : 46-54, 1964.
- 3) Davidson, P. T. : Treatment and long-term follow-up of patients with atypical mycobacterial infection, Bull Int Union Tuberc, 51 : 257-261, 1976.
- 4) Dutt, A. K. and Stead, W. W. : Long-term results of medical treatment in *Mycobacterium intracellulare* infection, Am J Med, 67 : 449-453, 1979.
- 5) 田村昌敏, 山田正雄, 生垣 浩他 : *Mycobacterium intracellulare* 症に対する化学療法, 結核, 54 : 75~84, 1979.
- 6) Tsukamura, M. : Numerical classification of slowly growing mycobacteria, Int J Syst

- Bacteriol, 26 : 409-420, 1976.
- 7) 東村道雄 : *Mycobacterium avium* Complex に対する Sulfadimethoxine の試験管内活性に対する知見補遺—Sulfadimethoxine と他抗結核剤との併用効果—結核, 64 : 379-386, 1989.
 - 8) 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.
 - 9) 国立療養所結核菌薬剤耐性共同研究班 : 結核化学療法における臨床的耐性の限界, 医療, 14 : 154-159, 1960.
 - 10) Harris, H. W., Knight, R. A. and Selin, M. J. : Comparison of isoniazid concentrations in the blood of people of Japanese and European descent, Am Rev Respir Dis, 78 : 944-946, 1958.
 - 11) Price Evans, D. A., Storey, P. B., Wittstadt, F. B. et al. : The determination of the isoniazid inactivation phenotype, Am Rev Respir Dis, 82 : 853-861, 1960.
 - 12) Canetti, G., Rist, N. and Grosset, J. : Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Methodologie, critères de résistance, résultats, interprétation, Revue de Tuberculose et de Pneumologie, 27 : 217-272, 1963.
 - 13) 東村道雄 : SM, PAS, INH 耐性上限の個人差および routine 法耐性検査による完全耐性度の誤差について, 結核, 35 : 704-708, 1960.
 - 14) Tsukamura, M. and Abo, T. : Further observations on the individual difference in the upper limit of drug resistance to streptomycin, PAS and isoniazid of tubercle bacilli occurring in sputa of tuberculous patients, Chemotherapy (Tokyo), 9 : 337-340, 1961.
 - 15) Rist, N. : L'activité antituberculeuse de l'ethionamide (L'alpha-ethyl-thioisonicotinamide ou 1314Th). Étude expérimentale et clinique, Adv Tuberc Res, 10 : 69-126, 1960 (Karger, New York).
 - 16) 東村道雄, 安保 孝 : 結核菌の alpha-ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th) 耐性に関する臨床的研究, 結核, 36 : 361-365, 1961.