

原 著

交叉耐性がない既往の化学療法によっても後続の化学療法の
効果が影響されることを示唆する試験管内実験

東 村 道 雄

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臨床研究部

受付 平成2年5月29日

IN VITRO EXPERIMENT SHOWING THAT CHEMOTHERAPY
OF TUBERCULOSIS BY AMINOGLYCOSIDE
ANTIBIOTICS MAY INFLUENCE SUCCESSIVE
CHEMOTHERAPY WITH RIFAMPICIN

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication May 29, 1990)

When *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv was cultivated in Ogawa egg medium containing 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and/or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin, which were considered as subinhibitory, it was observed that growing bacterial population contained several times more rifampicin-resistant mutants than did the parent strain. The ratio of isoniazid-resistant mutants did not change by the above treatment. The finding suggests that, even without the use of rifampicin, the bacterial population of patients becomes more resistant to rifampicin by chemotherapy in the past with streptomycin or kanamycin. Furthermore, it was shown that the ratio of streptomycin-resistant mutants increased by pre-treatment with kanamycin and the ratio of kanamycin-resistant mutants by pre-treatment with streptomycin.

Parent, susceptible bacterial population develops 4R-phenotype mutants which are resistant to four drugs, high concentrations of kanamycin, lividomycin and paromomycin and a low concentration of capreomycin, whereas streptomycin-resistant mutant population does not develop the 4R mutants but develops only mutants with the KR phenotype which is almost mono-resistant to kanamycin.

Key words : Chemotherapy in the past, Therapeutic effect, Rifampicin, Streptomycin, Kanamycin, Isoniazid

キーワード : 既往の化学療法, 治療効果, Rifampicin, Streptomycin, Kanamycin, Isoniazid

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

緒言

Rifampicin (RFP), isoniazid (INH), streptomycin (SM), kanamycin (KM)の間には、交叉耐性がないことになっている。したがって、理論的には、どの薬剤を先に使っても後続する化学療法に影響がないはずである。例えば、前にSMまたはKMを使用した患者に対するRFPの効果は、未治療患者に対する効果と同じと思われる。

ところが、最近われわれが行った試験管内実験の結果では、交叉耐性がないはずの薬剤の間でも、先行する化学療法が後続する化学療法に影響を与えることが考えられた。本報では、この現象について報告する。

研究方法

被検株は *Mycobacterium tuberculosis* 05001 (H₃₇Rv) 株である。1947年、当時の名古屋大学医学部細菌学教室阿多実茂助教授から分与され、国療中部病院で保存された。

培地は、全実験を通じて「1%小川培地」を使用した。培地は7mlずつ、165×16.5mm試験管に分注され、90°C 60分間滅菌により斜面培地とした。streptomycin sulfate (明治製菓, 東京), kanamycin sulfate (明治製菓), enviomycin sulfate (東洋醸造, 静岡), viomycin sulfate (台糖-Pfizer, 東京), capreomycin sulfate (塩野義, 大阪), lividomycin sulfate (興和, 東京), paromomycin sulfate (協和醸酵, 東京), isoniazid (塩野義) は蒸留水に溶解し, rifampicin (Lepetit, Milano) のみは propylene glycol に溶解し, 滅菌前の小川培地 100 容に対し, 薬剤溶解液 1 容を加えることにより所要の濃度とした。

菌株の前処理 (前培養)

先行する化学療法のモデルとして、菌を次の培地に接種し、37°C 21日間培養した。(1) 対照培地 (薬剤なし), (2) SM 5 µg/ml 含有培地, (3) KM 10 µg/ml 含有培地。接種菌液は、小川培地 14 日培養菌を「ガラス玉コルベン」中で 5 分間振盪して均一化した後、0.1% Tween 80 水溶液に湿菌量 10 mg/ml の濃度に浮遊させた。接種は、渦巻白金耳 (0.02 ml を 1 白金耳で接種できる) で 1 白金耳ずつ接種した。この培地を 21 日間培養した後、発育した集落から同じ方法で菌液を作り、次の耐性菌含有率測定に用いた。前処理に用いた SM 5 µg/ml および KM 10 µg/ml は、'actual count' 法¹⁾²⁾ で測定した最小発育阻止濃度の 1/2 の濃度である。

耐性菌含有率の測定法

上記の方法で作った菌液を、0.1% Tween 80 水溶液で 10⁻⁷ まで希釈し、10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ 希釈液を 0.02 ml ずつ渦巻白金耳で薬剤なし培地 5 本ずつに接種

し、10⁰ および 10⁻¹ 菌液を薬剤含有培地 20~50 本に、それぞれ、渦巻白金耳で接種した。培地は、底に「3 mm」の切れ目の入った「ダブルゴム栓」をかぶせ、37°C に培養した。薬剤なし培地の集落数は 21 日後に数えた。耐性菌を数えるために使用された薬剤濃度は、INH 10 µg/ml, RFP 100 µg/ml, SM 100 µg/ml, KM 1,000 µg/ml および PM (paromomycin) 1,000 µg/ml であった。INH 耐性菌は、28 日後にすでに eugonic colonies として発育したので、耐性菌数は 28 日後に数えた。一方、他の耐性菌は、初代分離の時は、dysgonic であったので、42 日後 (時に 35 日後) に数えた。

耐性菌の表現型の測定

われわれは、前に、H₃₇Rv 株からは、single mutation によって変異した 6 剤, 4 剤, 3 剤耐性菌 (多重耐性菌) を分離できることを報告した³⁾。これらの多重耐性菌は、KM 1,000 µg/ml または PM 1,000 µg/ml の濃度に発育する集落として分離された。これらの耐性菌の表現型は次のように測定した。単個集落を白金耳で取って、いったん、小川培地に培養し、これから 1 mg/ml の菌液を作った。菌液濃度測定は比濁によった。この菌を、通常白金耳で 1 白金耳ずつ次の培地に接種した (接種量, 0.003~0.005 ml)。 (注: 白金耳の接種量測定は、あらかじめ秤量した濾紙に 10 白金耳を接種して再び秤量して、前後の差を測定した。) 使用培地は、EVM, VM, CPM, KM, LVM, PM の 6 剤を、0, 100, 200, 500, 1,000 µg/ml の濃度に含有する培地である。接種した培地は、37°C 21 日培養し、対照培地とほぼ同等の発育を示す濃度を「耐性度」とした。上述の濃度は、前の研究の結果から³⁾、表現型を明瞭に区別しうる濃度として選んだものである。

研究結果

SM 培地または KM 培地に継代された菌の耐性菌含有率 (Table 1)

対照培地に発育した菌と比較すると、SM 5 µg/ml 培地に発育した菌の中の RFP 100 µg/ml, KM 1,000 µg/ml および PM 1,000 µg/ml 耐性菌含有率は、5~8 倍に増加していた。SM 100 µg/ml 耐性菌は 290 倍になっていた。一方、INH 10 µg/ml 耐性菌含有率は対照と差がなかった (t-test で P>0.05)。一方、KM 10 µg/ml 培地に発育した菌中の耐性菌含有率は、RFP 100 µg/ml 耐性菌 9 倍, SM 100 µg/ml 耐性菌 8 倍, PM 1,000 µg/ml 耐性菌 13 倍であった。KM 1,000 µg/ml の含有率は 70 倍であった。しかし、INH 10 µg/ml 耐性菌の含有率だけは、対照と統計学的有意差がなかった。

前処理と得られた耐性菌の表現型との関係 (Tables

Table 1. Increased Prevalence Rates of Resistant Mutants in Bacterial Populations Caused by Cultivation in a Subinhibitory Concentration of Streptomycin or Kanamycin

Agent used for isolating mutants	Ratio, mutants per 10 ⁸ colony-forming units of the bacterial population		
	Medium used for cultivating <i>M. tuberculosis</i> H37Rv		
	No drug (control)	Streptomycin 5 µg/ml	Kanamycin 10 µg/ml
Rifampicin 100 µg/ml	19.5 ± 13.0	151.6 ± 73.5	174.0 ± 73.4
Isoniazid 10 µg/ml	153.1 ± 51.4	121.3 ± 73.0	391.6 ± 181.7
Streptomycin 100 µg/ml	32.0 ± 9.0	9,328. ± 383.	274.2 ± 120.6
Kanamycin 1,000 µg/ml	19.0 ± 2.7	143.4 ± 45.5	1,324. ± 110.
Paromomycin 1,000 µg/ml	4.8 ± 2.8	26.7 ± 18.1	66.0 ± 53.8

Determined in *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, using Ogawa egg medium. The numbers in the table are (mean ± standard deviation) determined in three independently made experiments.

Table 2. Difference of the Phenotypes of Mutants According to the Drugs Used for isolating the Mutants

Agent used for isolating mutants	Medium used for pre-cultivating the test strain	Number (%) of mutants determined for their phenotype			
		Phenotype			Total no.
		6 R	4 R	3 Ra	
Kanamycin 1,000 µg/ml	No drug (control)	4 (4%)	93 (96%)	0 (0%)	97 (100%)
	Streptomycin 5 µg/ml	0 (0%)	80 (100%)	0 (0%)	80 (100%)
	Kanamycin 10 µg/ml	0 (0%)	100 (100%)	0 (0%)	100 (100%)
Paromomycin 1,000 µg/ml	No drug (control)	79 (58%)	48 (35%)	9 (7%)	136 (100%)
	Streptomycin 5 µg/ml	15 (17%)	71 (83%)	0 (0%)	86 (100%)
	Kanamycin 10 µg/ml	95 (95%)	5 (5%)	0 (0%)	100 (100%)

In the table, the phenotype designated as 6R includes the phenotypes 6Ra, 6Rb and 6Rc, and the phenotype 4R includes both 4R and 4Ra phenotypes (see Table 3).

2および3) 分離された耐性菌の種類は、当然のことながら、分離に使用する薬剤の種類によって違ってくる³⁾。KMで耐

性菌を分離した時と、PMで分離した時では、耐性菌の種類が違う。Tableに示すように、KM 1,000 µg/ml培地に発育した耐性菌の表現型を調べてみると、その96

Table 3. Designation of the Phenotypes of Mutants

Phenotype	Resistance levels ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of the mutant					
	Enviomycin	Viomycin	Capreomycin	Kanamycin	Livido-mycin	Paromomycin
6 R	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
6 Ra	>1,000	>1,000	>1,000	500	>1,000	>1,000
6 Rb	>1,000	500	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
6 Rc	>1,000	500	>1,000	500	>1,000	>1,000
4 R	10	20	200	>1,000	>1,000	>1,000
4 Ra	200	200	200	>1,000	30	100
3 Ra	10	20	20	200	>1,000	>1,000
KR	10	20	20	>1,000	100	200
Parent	10	20	20	20	30	100

Table 4. Comparison of the Phenotypes of Mutants Isolated from the Parent H37Rv Strain with Those of Its Streptomycin-Resistant and Isoniazid-Resistant Mutants

Strain ^{a)}	Method of Isolating mutants ^{b)}	No. of mutants determined for their phenotype	Phenotype								Total no.
			6 R	6 Ra	6 Rb	6 Rc	4 R	4 Ra	3 Ra	KR	
Parent	KM 19.0	1	0	3	0	91	2	0	0	97	
		└──────────(4%)──────────┘				└──────────(96%)──────────┘				(100%)	
	PM 4.8	71	3	0	5	48	0	9	0	136	
		└──────────(58%)──────────┘				(35%)		(7%)		(100%)	
SM-R	KM 4.2	15	0	0	0	0	0	0	69	84	
		(18%)								(82%)	(100%)
	PM 1.0	21	0	0	0	0	0	0	0	21	
		(100%)								(100%)	
INH-R	KM 8.0	1	0	0	0	34	2	0	0	37	
		(3%)				└──────────(97%)──────────┘				(100%)	
	^{a)} SM-R, 5.0	24	2	0	0	83	0	5	0	114	
		└──────────(23%)──────────┘				(73%)		(4%)		(100%)	

a)SM-R, Streptomycin-resistant mutant isolated by two step-selections, first by $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ and second $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. INH-R, Isoniazid-resistant mutant isolated by one step-selection by $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ isoniazid. b)KM, Kanamycin $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$; PM, Paromomycin, $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$. These concentrations were used for isolating resistant mutants shown in the right columns. The numbers in this column show the frequency of mutants growing on these media per 10^8 colony-forming units of each strain or mutant.

~100%が4剤耐性菌(4R)であった。一方、PM $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 培地の前培養菌の表現型を調べてみると、対照培地前培養菌では、6剤耐性菌(6R)が58%、4Rが35%であった。

これに対して、SM $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 培地に前培養した菌からPM $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性菌を取ると、その83%が4R、17%が6Rで、表現型の分布が異なっていた。一方、KM $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 培地に前培養すると、6Rが95%、

4Rが5%となった。上述の表現型の定義はTable 3に示してある。

SM耐性菌から得られたKM耐性菌と感性菌から得られたKM耐性菌の比較(Table 4)

SM耐性菌を持つ患者にKMを使用した場合を想定して、SM耐性菌から得られたKM耐性菌の表現型を、感性菌の自然突然変異で得られたKM耐性菌のそれと比較してみた。感性株からKM $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 培地で得

られた KM 耐性菌は、その 94% が 4 R であった。それに対して、SM 耐性菌 (感性株からまず SM 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性菌を取り、これからさらに SM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地で得た耐性菌) から得た KM 耐性菌の 82% が KM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上単独耐性の表現型 KR の菌であった。4 R 菌は分離できなかった。INH 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性菌から得た KM 耐性菌は、感性菌から得たものと差がなかった。一方、PM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性菌を取った場合は、SM 耐性菌からは 6 R だけが取れ、INH 耐性菌から得た PM 耐性菌では、6 R の比率が減少していた。

考 察

RFP, INH, KM, SM の間には、交叉耐性はないとされている。したがって、SM, INH, KM など治療された患者を RFP で治療する場合は、理論的には、初回治療と同じように効果があるものと考えられる。もちろん、これらの患者では、病巣の硬化のような不利な条件はあるが、菌自体に対しては、同等の効果があるものと信じられてきた。しかし、RFP 出現当時の臨床的感触からすると、これら治療失敗例の治療では、RFP の効果がやや低い場合があるとの印象を受けた。過去の治療は、果たして後続する治療に無影響であるのか。この問題の解決の一つの方法として、本実験を行った。

SM 培地または KM 培地に植えたのは、SM または KM による過去の治療を想定したものである。SM 培地に発育した菌の中の RFP 耐性菌、KM 耐性菌、PM 耐性菌の比率は 5 ~ 8 倍増加していた。この所見は、SM で治療された患者では、RFP 耐性菌、KM 耐性の比率が増加していて、RFP 耐性または KM 耐性が生じやすいことを示唆している。この原因は、SM の存在する環境では、RFP 耐性菌および KM 耐性菌の発育に有利であることを示している。一方、SM の存在は、INH 耐性菌と感性菌の発育に同等に作用し、SM が存在しても、INH 耐性菌の比率が変わらなかったためと思われる。SM 存在下で、SM 耐性菌の比率が 300 倍に増えたのは次の原因によると思われる。本実験では、MIC の 1/2 の SM を前培養に使用したが、この濃度で SM の影響が全くないわけではなく、感性菌の発育は多少遅延される⁴⁾。一方、SM 耐性菌は、SM の影響をほとんど受けないので⁵⁾⁶⁾、SM 耐性菌の含有率が高くなったわけである。

KM 培地に前培養した場合も、SM 耐性菌、RFP 耐性菌、PM 耐性菌の含有率が、8 ~ 13 倍に高まった。この結果も、先行する KM の治療が、後続する RFP および SM の治療を不利にすることを示している。INH 耐性菌の含有率には変化がなかった。また、KM 耐性菌の比率が 70 倍になったのは、SM の場合と同様の理由によるものと考えられる。

SM または KM の阻止濃度以下に菌を継代することは、KM 耐性菌 (6 R, 4 R, 3 Ra などがある) の表現型分布には影響がなかったが、PM 耐性菌のそれには影響があった。しかし、PM が臨床に使用されることは希なので、この意義については論じない。

次に、過去に SM 耐性菌または INH 耐性菌が生じていたところに KM を使用して、KM 耐性菌が生じた場合、これらの KM 耐性菌は、感性菌から直接生じた KM 耐性菌と同じなのか、違っているのか。これについて、INH 耐性菌から得られた KM 耐性菌の表現型は、感性菌から得られたそれとは大差がなかった。しかし、SM 耐性菌から生じた KM 耐性菌は、感性菌から直接生じた KM 耐性菌とは、大いに違っていることが分かった。感性菌から分離された KM 耐性菌は、その 94% までが 4 R 表現型であり、KM, LVM, PM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上耐性で CPM にも 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性である。これに対して、SM 耐性菌から生じた KM 耐性菌の 82% は KR 表現型であり、ほとんど KM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独耐性である。「ほとんど」というのは、他では、LVM と PM の耐性度がわずかに上っていただけである故である (Table 3)。SM, KM などの aminoglycoside 系抗生物質および VM などの peptide 系抗生物質の耐性には、ribosomes の変異が関係していると考えられている⁷⁾⁸⁾。SM 耐性変異によって生じた ribosomes は、もはや 4 R 型に変異できない型となっていると想像される。

なお、KM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地に発育する菌には 4 R が多く、PM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地に発育する菌には 6 R が多い理由は次のごとくである。4 R の generation time (GT) は、感性株と同様に 13.4 \pm 0.6 時間であるが (感性株の GT は 13.2 \pm 0.8 時間)、KM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 中でも 14.4 \pm 0.3 でほとんど変わらない。しかし、PM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でははなはだ遅れる (GT 42.0 \pm 2.0)。一方、6 R の GT は薬剤なし小川培地でも少し遅く 16.7 \pm 0.8 である。PM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 中でも 16.4 \pm 0.4 で、ほとんど不変であるが、KM 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 中では、20.6 \pm 1.3 で少し遅れる (GT の測定は小川培地で、Youmans & Youmans⁹⁾ によった。上記 GT 値は、3 ~ 10 回測定 of 平均値と標準偏差)。以上の GT の差によって、KM 培地では 4 R が多くとれ、PM 培地では 6 R が多くとれるようになると思われる。

結 論

試験管内実験で、SM または KM の低濃度に結核菌を継代すると、継代 population 中の RFP 耐性菌の比率が増加する。しかし、INH 耐性菌の比率は不変である。この所見は、臨床の場合、SM または KM を使用した患者では、RFP を使用しなくても RFP 耐性菌

の比率が増加しており、RFP 耐性が生じやすいことを示唆する。SM と RFP または KM と RFP との間には交叉耐性がないとされているが、僅少の差ではあるが、RFP 耐性菌は感性菌と比べて、SM または KM によって発育遅延作用を受ける度合いが少ないものと考えられる。

また、感性菌から KM 耐性菌をとると、4R 型（4 剤耐性）の耐性菌がとれるが、SM 耐性菌から KM 耐性菌をとると、KR 型（KM 単独耐性）の耐性菌が得られることが分かった。

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, Jpn J Tuberc, 12 : 46-54, 1964.
- 3) Tsukamura, M. and Mizuno, S. : Cross-resistance relationships among the aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis*, J Gen Microbiol, 88 : 269-274, 1975.
- 4) 東村道雄・水野松司 : 抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較, 結核, 55 : 365~370, 1980.
- 5) Tsukamura, M., Noda, Y. and Guidi, V. : Action of streptomycin on the growth rate of *Mycobacterium tuberculosis*, J Antibiotics, Ser. A, 11 : 268-272, 1958.
- 6) Tsukamura, M. : The effect of streptomycin in delaying the growth rate of streptomycin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis*, J Antibiotics, Ser. A, 12 : 105-106, 1959.
- 7) Weisblum, S. and Davies, J. : Antibiotic inhibition of the bacterial ribosome, Bacteriol. Rev, 32 : 493-528, 1968.
- 8) Nomura, M. : Bacterial ribosome, Bacteriol. Rev, 34 : 228-277, 1970.
- 9) Youmans, G. P. and Youmans, A. S. : A method for the determination of the rate of growth of tubercle bacilli by the use of small inocula. J Bacteriol, 58 : 247-255, 1949.