

結核治療中患者から経時的に得られた結核菌株での、 薬剤耐性菌と感受性菌の割合の変化

阿野 裕美 松本 智成 吉多 仁子 石田智恵子
谷川 信子 河原 邦光 鳥羽 宏和 高嶋 哲也
露口 泉夫

要旨：〔目的〕今回われわれは、結核患者体内の薬剤耐性菌と感受性菌の割合の変動を明らかにすることを目的とした。〔対象〕長期にわたり抗結核薬治療中の患者を対象として、治療途中で新たに薬剤耐性を獲得した菌株や、特定の抗結核薬に対して感受性と耐性との間を揺れ動いている菌株を選出した。治療経過が判明し菌株が保存されている5名の患者を対象とし、合計19検体202コロニーを検討した。〔方法〕選出した検体を単一コロニーに分離して、BrothMIC-MTB1法（極東製薬）により、各コロニーのMIC値を測定した。同時にOligoArray法（日清紡）によって、薬剤耐性変異遺伝子を検出した。菌株全体の薬剤感受性は、検体提出時点における小川試験管法の判定結果を参照した。〔結果〕選出した5名中2名にKM, SM, INHの3薬剤について、耐性コロニーと感受性コロニーの混在する菌株がみられた。その薬剤感受性を経時的に解析すると、薬剤治療の変化とともに、薬剤耐性菌と感受性菌の割合もダイナミックに変動することがわかった。そして、結核菌株が特定の抗結核薬投与によって耐性を獲得する時には、耐性菌が急速に増加するが、抗結核薬の使用が中止されて感受性に復帰する時は、感受性菌の割合が徐々に増加することがわかった。また一度耐性化した菌株は、感受性に復帰した後も、再び同じ抗結核薬を投与されると、急速に耐性菌が増加することがわかった。

キーワード：結核菌、薬剤耐性、コロニー、MIC値、RFLP分析、薬剤感受性の変動

はじめに

INH耐性結核菌株の、宿主体内における耐性菌と感受性菌の割合の変動と増殖速度の問題は、1950年代からG.Canetti¹⁾²⁾をはじめ久世³⁾、佐藤⁴⁾⁵⁾、石川⁶⁾等により詳細に研究されている。INH耐性菌と感受性菌を混合して薬剤の入っていない培地で継代培養すると、ついにINH耐性菌は消失して感受性菌のみになるという現象は、Welschの現象⁷⁾と呼ばれている。この薬剤耐性菌の速やかな減少は、実際の臨床の場でも薬剤耐性から感受性に復帰するというかたちで経験されるところであり、INH耐性以外にも、RFP, CS, THが耐性から感受性に復帰した1例が報告されている⁸⁾。薬剤耐性菌と感受性菌のポピュレーション比率に基づく考え方は、現在の結核菌

検査指針⁹⁾においても、小川培地比率法の中に生かされているが、臨床検体のなかに、実際にどの程度の耐性菌と感受性菌がふくまれているのかは、厳密なポピュレーション法¹⁰⁾を実施しないかぎり、日常検査法ではわからない。

今回われわれは、長期にわたる抗結核薬治療の途中で、患者体内の薬剤耐性菌と感受性菌の割合が実際に変動している姿を明らかにしたいと考えた。そこで、抗結核薬治療中に新たに薬剤耐性を獲得した患者や、薬剤耐性から感受性に復帰した患者を対象として、経時的に菌株を抽出した。得られた菌株の一部をコロニー分離し、コロニーごとの最小発育阻止濃度（MIC値）を測定することによって、耐性菌と感受性菌の混在している菌株が、治療経過の中でどのような時期にみられるのかを検討

し、さらに耐性コロニーと感受性コロニーの違いを遺伝子レベルで検証した。

先にわれわれは、同一患者の検体に、同じ菌株でありながら IS6110 DNA Fingerprinting が若干異なるコロニーが存在していること、ならびに経時的に変化していることを観察した(松本, 他: 投稿中)。そこでさらに、同一菌株内における IS6110 DNA Fingerprinting の変化と薬剤感受性の変化との間に、どのような関係があるのかも検討しようと試みた。

対 象

治療歴が判明し菌株が保存されており、抗結核薬による治療中に薬剤耐性が変化した5名を対象とした。1名につき2回から7回、平均7.7カ月の間隔で検体を抽出した。1検体から10~20コロニーを分離培養し、BrothMIC-MTB1法を用いて19検体202コロニーのMIC値を測定した(Table)。なお、結核菌保存および解析に際しては、各患者からあらかじめ文書にて同意を得た。

方 法

継代培養による影響を避けるために、喀痰を酸処理(スプータメントゾル・極東製薬)して培養した2%小川培地がある時には、その2%小川培地上の独立コロニーをマイコプロス(極東製薬)に分離培養した。当院では、一部の多剤耐性菌株を除き、2%小川培地の菌株は1年間しか保存されていない。それ以前の菌株は、10%グリセリンに懸濁して-80℃で冷凍保存している。そこで2%小川培地の菌株がない場合には、冷凍保存菌液を7H11寒天培地に培養し、7H11寒天培地上の独立コロニーをマイコプロスに分離培養した。

マイコプロスの菌液濃度がMcFarland No.1になった時点で、BrothMIC-MTB1法(極東製薬)¹¹⁾を用いて各コロニーのMIC値を測定した。測定結果は、BrothMIC-MTB1法の基準に従い、以下のように判定した。

・KM: 4 $\mu\text{g/ml}$ $\geq$ 感受性, 8~32 $\mu\text{g/ml}$ 判定保留域, 64

$\mu\text{g/ml}$ $\leq$ 耐性,

・SM: 4 $\mu\text{g/ml}$ $\geq$ 感受性, 8~16 $\mu\text{g/ml}$ 判定保留域, 32 $\mu\text{g/ml}$ $\leq$ 耐性,

・INH: 0.5 $\mu\text{g/ml}$ $\geq$ 感受性, 1~2 $\mu\text{g/ml}$ 判定保留域, 4 $\mu\text{g/ml}$ $\leq$ 耐性,

BrothMIC-MTB1法を実施するに当たっては、H37Rv株を感受性コントロールとして使用した。

各検体の薬剤感受性は、検体提出時点の薬剤感受性検査による判定結果を参照した。なお、当院の日常業務における薬剤感受性検査は、2000年4月より小川絶対濃度法から小川比率法に切り替えられたが、引き続き小川培地試験管法を採用している。迅速性を追求するために、MGITで検出された菌株については、2003年3月よりBrothMIC-MTB1法で薬剤感受性を判定し、MIC値で判定保留域と耐性になった菌株については、さらに小川比率法を用いて感受性の判定を行っている。

上述マイコプロスの菌液を再び2%小川培地に培養して、ガラスビーズ法¹²⁾を用いてDNAを抽出した。KMとSMの耐性菌・感受性菌混在例(Case 1)は、Oligo-Array(日清紡研究開発センター・市原氏より供与)¹³⁾によって薬剤耐性遺伝子の存在を確認した。INH耐性菌・感受性菌混在例(Case 2)はOligoArray法によってINH耐性遺伝子を確認できなかったため、ルシミックMTB-SR法(極東製薬)¹⁴⁾¹⁵⁾を用いて、各コロニーの薬剤感受性を再確認した。

同時に、ガラスビーズ法で抽出したDNAを用いて、van Soolingen D. 等の方法¹⁶⁾に準拠してRFLP分析を実施し¹¹⁾、コロニーごとのIS6110パターンの違いと薬剤感受性を比較検討した。

結 果

検討対象となった5名中2名に薬剤耐性菌と感受性菌が混在する菌株を認めた(Case 1, 2)。治療中にEBが耐性化した1名(Case 3)とRFPが耐性化した2名(Case 4, 5)については耐性菌と感受性菌の混在株を認

Table Materials

Case No.	Changes of the drug susceptibility* Drug	Susceptibility	Clinical isolates**	Colonies
Case 1	Kanamycin	(S $\rightarrow$ R $\rightarrow$ S $\rightarrow$ R)	7	78
Case 2	Isoniazid	(S $\rightarrow$ R)	3	37
Case 3	Ethambutol	(S $\rightarrow$ R)	4	39
Case 4	Rifampin	(S $\rightarrow$ R)	3	28
Case 5	Rifampin	(S $\rightarrow$ R)	2	20

This table shows 5 cases of patients whose medical records were clearly recorded and drug susceptibility changed.

*The drug susceptibility were measured by the proportion method on egg-based Ogawa media.

(S: susceptible R: resistant)

**Samples were selected with time course of medication.

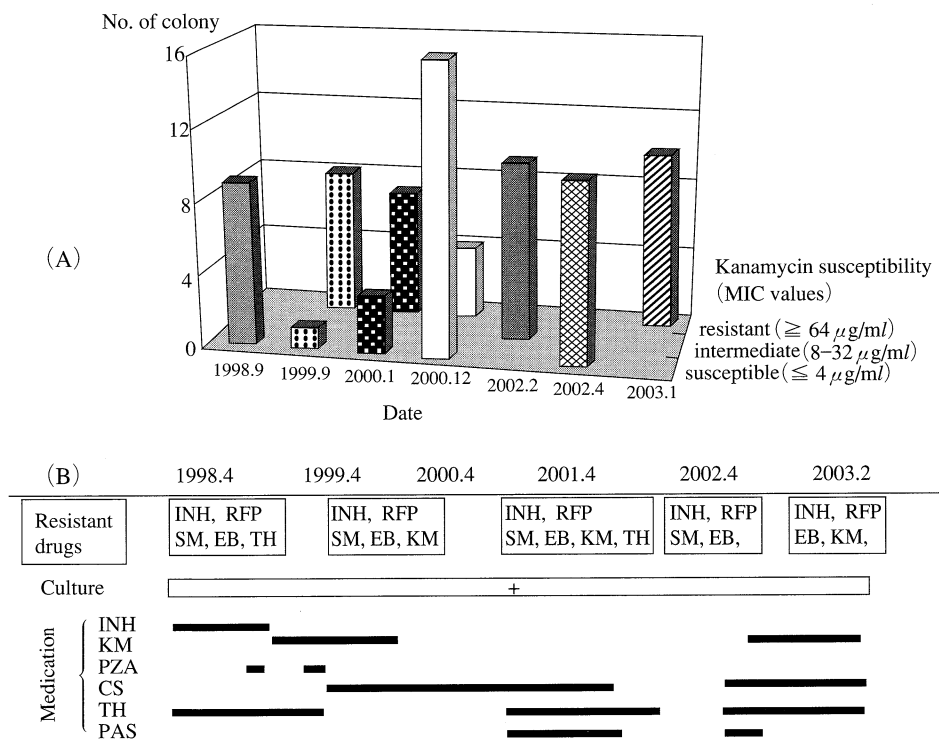


Fig. 1 MIC of kanamycin changes during medication in Case 1

Isolates were selected throughout the medication and separated into single colonies.

(A) MIC value of each colony was measured by BrothMIC MTB-1 method.

(B) Clinical course of Case 1

The drug susceptibility was measured by proportion method on egg-based Ogawa media.

INH: isoniazid KM: kanamycin PZA: pyrazinamide CS: cycloserine

TH: ethionamide PAS: para-aminosalicylic acid

めることができなかった (Table)。

耐性菌と感受性菌の混在株がみられた2名のうち、Case 1は1980年代から他院にて肺結核の通院治療を受け、1991年5月から当院でINH, RFP, EB, KM治療を受けていたが、自己中断を繰り返していた持続排菌患者である。1991年時点での日常検査の小川法による薬剤感受性結果は、INH, RFP, SMの多剤耐性であったが、KMは感受性であった。1998年4月に当院に再入院し、INH, TH治療を開始した時には、日常検査の小川法ではINH, RFP, EB, TH耐性で、やはりKMは感受性であり、コロニー分離してMIC値を測定した結果も9コロニー全部KM感受性であった (Fig. 1)。ところが1998年7月から14か月間KMが治療に使用され、1999年9月には日常検査の小川法でもKM耐性となり、コロニー分離すると8コロニーが耐性で1コロニー感受性の混在株となった。この時点でKM投与は中止されたが、2000年1月には7コロニー耐性で3コロニー感受性の混在株、2000年12月も4コロニー耐性で16コロニー感受性の混在株となり、OligoArray法により耐性コロニーにのみKM耐性遺伝子変異シグナルが確認された (Fig. 2)。

2002年2月には10コロニー全部がMIC値16 $\mu\text{g/ml}$ の判定保留域となり、4月には10コロニーすべてが感受性で、日常検査の小川法もKM感受性となった。ところが、2002年7月から再び治療にKMが使用され、2003年1月には10コロニーすべてMIC値128 $\mu\text{g/ml}$ 以上のKM耐性となり、日常検査の小川法でもKM耐性にもどった症例である。

さらにCase 1の場合、コロニーごとのSM感受性結果も変動した (図示せず)。1998年には全コロニー判定保留域であったが、1999年には3コロニー耐性で7コロニー判定保留域の混在株となり、2000年1月には全10コロニー耐性となり、2000年12月には1コロニー耐性、15コロニー判定保留域、4コロニー感受性の耐性菌・判定保留域菌・感受性菌混在株となった。その後、2002年2月には5コロニー耐性で5コロニー判定保留域の混在株、2002年4月には1コロニー判定保留域で9コロニー感受性の混在株となったが、2003年1月には再び感受性コロニーがなくなり、8コロニー判定保留域で2コロニー耐性の混在株となった。なおこの症例の場合、当院でSMが治療に使用されたのは1991年5月からの4

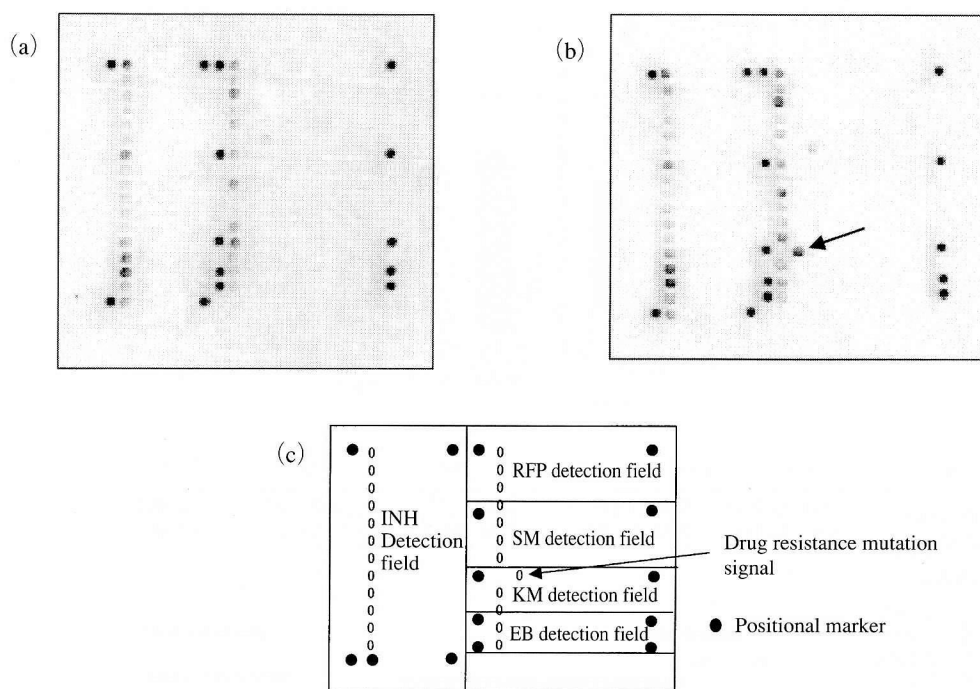


Fig. 2 OligoArray patterns of kanamycin

(a) OligoArray pattern of KM susceptible colony in Case 1

(b) OligoArray pattern of KM resistant colony in Case 1

(c) Schematic presentation of Fig. (b) OligoArray pattern

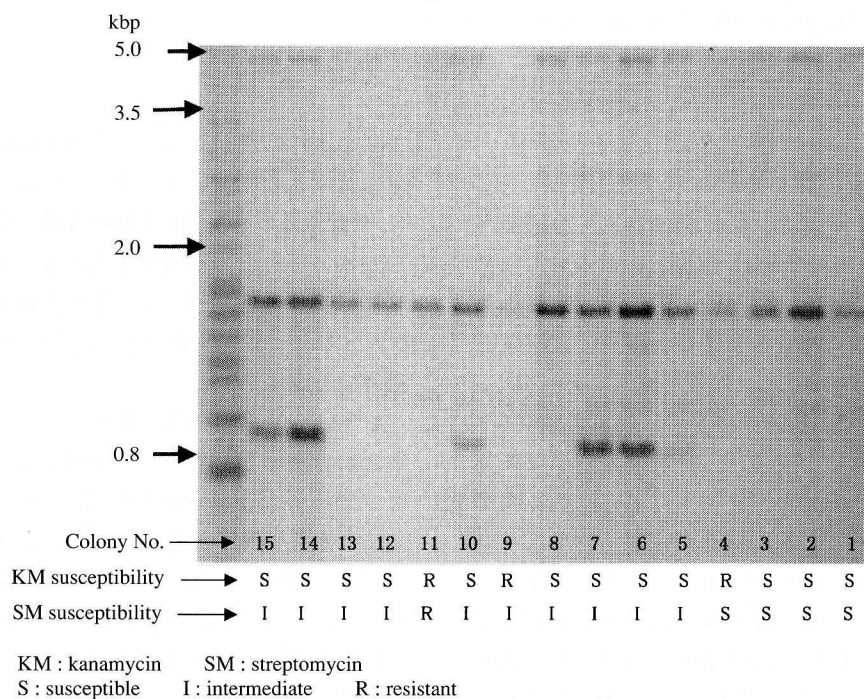


Fig. 3 IS6110 fingerprinting and drug susceptibility of each colony

This figure shows IS6110 DNA fingerprinting of each colony. MIC result for kanamycin (KM) and streptomycin (SM) are described under the colony number. The left end lane shows the fingerprinting of H37Ra reference strain.

KM susceptibility: (S) MIC 4 $\geq$ (I) MIC 8-32 (R) MIC 64 $\leq$

SM susceptibility: (S) MIC 4 $\geq$ (I) MIC 8-16 (R) MIC 32 $\leq$

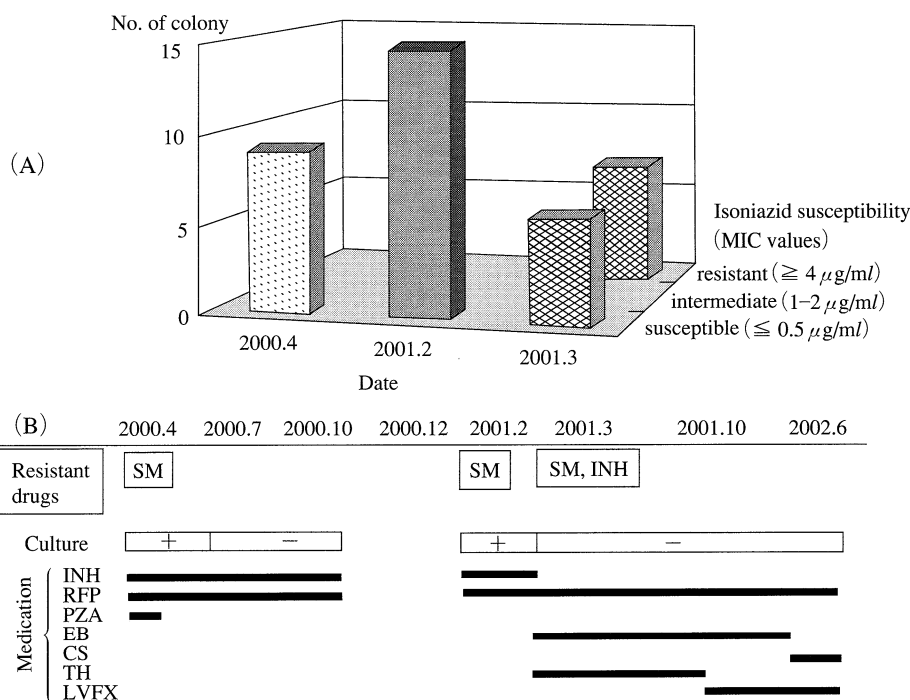


Fig. 4 MIC of isoniazid changes for during medication in Case 2
 (A) MIC value of each colony was measured by BrothMIC MTB-1 method.
 (B) Clinical course of Case 2
 INH: isoniazid RFP: rifampin PZA: pyrazinamide EB: ethambutol
 CS: cycloserine TH: ethionamide LVFX: levofloxacin

カ月間だけであり、その後はKM治療に切り替えられ、SMは一度も使用されていない。

Case 1の場合、同一菌株内に IS6110 DNA Fingerprinting の若干異なるコロニーがみられた (松本他, 投稿中)。Fig. 3に、2000年12月におけるコロニー No. 1~15の IS6110 DNA Fingerprintingを示した。さらにこのパターンの下に、各コロニーのKMとSMの薬剤感受性結果を示したが、IS6110 DNA Fingerprintingが異なるコロニーとKMやSM耐性コロニーとの間には、一定の関係はみられなかった。1999年9月、2000年1月の菌株にも、薬剤感受性結果の異なるコロニーはあったが、この場合も薬剤感受性結果と IS6110 DNA Fingerprintingの異なるコロニーとの間に、一定の関係はみられなかった。

Case 2は、治療開始当初の2000年4月には、日常検査の小川法によるとSM単独耐性で、INHは10コロニー全部感受性であった (Fig. 4)。2000年4月からINH, RFP, PZA治療が開始され、2001年2月の再発時にもINHが治療に用いられた。得られた検体をコロニー分離すると2001年2月には全15コロニーともINH感受性であったが、同年3月には7コロニーがMIC値 $32 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性で6コロニーが $0.06 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性を示す耐性菌・感受性菌混在株になり、日常検査の小川法でもINH耐性となった症例である。この時 OligoArray 法で

は、耐性コロニーに遺伝子変異を認められなかったため、ルシミック MTB-SR 法により混在株の薬剤耐性を再確認した。Case 2は、2001年6月以降、RFP, EB, CS, LVFX治療によって菌陰性化したため、その後の経過を追うことはできなかった。

Case 2の場合、IS6110 DNA Fingerprintingに明らかな変異が見られたのは2000年4月と2001年2月の菌株であった (松本他, 投稿中)。耐性菌・感受性菌混在株が見られた2001年3月の検体の IS6110 DNA Fingerprinting は、すでに1種類に収束していたので、この場合にも、INH感受性結果と IS6110 DNA Fingerprintingが異なるコロニーとの間には、一定の関係はみられなかった。

考 察

今回のわれわれの検討により、INH, KM, SM耐性菌において、治療経過途中で薬剤耐性菌と感受性菌の混在する菌株を見出すことができた。さらに、KM, SM耐性菌株では、抗結核薬の使用を中止することによって感受性に復帰した現象を、コロニー単位で捉えることができた。

薬剤感受性の異なる菌が同一喀痰内に混在していた場合、①同一菌株の結核菌集団内で、薬剤による選択をうけて耐性菌の占める割合が増え、耐性菌と感受性菌の混

じった耐性菌・感受性菌混在株の状態にあったと考えることができる。それ以外には、②再感染や重複感染により、体内に異なる薬剤耐性を持つ別の菌株が存在していたとも考えられる。

さらにその他にも、③検査方法や検査手技によるMIC値変動の可能性も考えられる。しかし本報では、H37Rv株を感受性コントロールとして用いているので、検査キットのロット間の格差ではない。また同一人物により実験が行われ、耐性菌・感受性菌混在株以外の全コロニーの全9薬剤についてBrothMIC-MTB1 プレートの1～2管以内の変動におさまっているため、検査手技によって耐性菌と感受性菌が混在する現象がみられたとは考え難い。

次に、②再感染や重複感染の可能性について考える。この検討では、対象となった全コロニーについてRFLP分析を実施しIS6110 DNA Fingerprintingの変異を検討した。その結果、今回の報告の中には、IS6110バンドパターンが若干異なるコロニーはみられたが、全く異なるバンドパターンのコロニーは存在せず、すべて同じ菌株であったことが証明された。そこで、この②再感染や重複感染の可能性についても否定できる。

最後に、①薬剤耐性菌と感受性菌が、同じ菌株内で互いに共存し、その時々によって割合が変動しているという仮説に基づいて考えてみる。結核菌株には耐性変異菌がRFPで $1/10^8$ 個、INH, KM, SMで $1/10^6$ 個、EBで $1/10^4$ 個存在し¹⁷⁾、新たに薬剤耐性を獲得する時期には耐性菌が増加すると考えられる。その結果、Case 2のように薬剤耐性化直後に耐性菌と感受性菌が混在する現象をみることができたと思われる。薬剤耐性を獲得しながら、耐性菌・感受性菌混在株を見つけることのできなかったCase 4, Case 5, Case 6では、1検体当たりのコロニー検数数が少ないので、耐性化した菌株の中にあった少数の感受性コロニーを見出せなかったのか、または検体を抽出することのできなかった期間の間に、耐性菌・感受性菌混在株のみられる時期があった可能性が考えられる。しかし今回以上に検討コロニー数を増やすという点については限界がある。そこで検査期間のみについて考えると、Case 3では全コロニーが2カ月でEBに耐性に変化しており、Case 4では10カ月で、Case 5では6カ月でRFPに耐性化しており、もしもこの間の検体を得ることができれば、混在株を見出せる可能性があったかもしれない。また、Case 1でKMが耐性化したのは12カ月、一度感受性に戻ってから再度耐性化したのは9カ月、SMが一度感受性に戻ってから再度耐性化したのは9カ月、Case 2でINHが耐性化したのは1カ月であった。このことから、結核菌株が耐性を獲得する場合には、かなり急速に薬剤耐性菌が増加するものと思われる。

一方、長期にわたる持続排菌症例では、特定の抗結核薬を使用しないことによって薬剤耐性から感受性に復帰する例がみられた。このような患者の略痰中では、つねに耐性菌と感受性菌の割合が変化しつづけていることが、理論上ではなく、実際の臨床検体を用いて証明できた。Case 1では、KMを連続14カ月間治療に使用した後に耐性化し、KM耐性化直後の検体では耐性コロニーの割合が高い混在株であった。その後KMが処方されない期間の間、KMの耐性菌・感受性菌混在状態が続くが、その間徐々に感受性コロニーの割合が高くなっていった。2年6カ月後には、日常検査の小川法でもKM感受性、コロニー分離してもすべて感受性となった。しかし再びKMが治療に使用されると、わずか9カ月で全コロニーがMIC値 $128 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性コロニーになり、日常検査の小川法でもKM耐性となった。この結果から、菌株が抗結核薬治療によって耐性化する時には急速に耐性菌の比率が増えるが、抗結核薬の使用が中止され、耐性から感受性に復帰する時には、耐性化する場合より長い時間をかけて徐々に感受性菌の比率が増加するよう思われた。さらに、一度耐性化した菌株では、菌株全体を対象とする日常検査の小川法で感受性に復帰したとしても、再び同じ抗菌薬が使用されれば、すぐに耐性化してしまうことがわかった。

INHの耐性復帰については、すでに臨床的にも *in vitro* でも詳しく研究されている^{1)～6)}が、それ以外の薬剤では、RFP, CS, THが感受性に復帰した1例が重藤等によって報告されている⁸⁾。この症例では、RFPは使用中から4年4カ月後に菌が感受性に復帰し、再度投与されてから3カ月後には早くも耐性となったが、再び投与を中止して3年10カ月後には感受性となっていた。THは投与が中止されて5年後、CSも4年8カ月後に感受性に復帰していた。この結果は、今回のKMの感受性復帰例とよく一致していた。重藤等は、RFPとTH, CSに感受性復帰したことおよび患者の免疫状態が良好であったことが、菌陰性化に成功した鍵であろうと述べている。今回、INH, RFP以外にもKM, SMで感受性に復帰した現象が見られたということは、薬剤感受性判定結果に基づいて有効な抗結核薬のみを選択投与し、無効な抗結核薬の投与を中止することにより、INH, RFP, SM, KM, TH, CSといった多くの抗結核薬に対する感受性復帰もありえることを示唆していた。

また、今回のCase 1では、SMは副作用のため治療当初の4カ月間しか投与されておらず、その後はKM治療に切り替えられているにもかかわらず、SMの感受性復帰と耐性化がみられた。以前からSM, KM, EVMの間には交差耐性があると言われており¹⁸⁾、KMに耐性化したものはSMにも耐性化しやすいので、EVM→KM→

SMの順に薬剤投与を行うように奨励されている。今回のデータでも検体ごとにコロニーのMIC値を詳しく検討すると、KM耐性コロニーが減少するに従ってSM耐性コロニーも減少し、KM耐性コロニーが増加するに従ってSM耐性コロニーも増加していた。この結果は、SM、KMのあいだに交差耐性があることを示唆する内容であり、従来から提言されているように、抗結核薬の使用順序にも充分注意する必要があると思われる。

最後に、われわれは、今回対象となったすべてのコロニーについてRFLP分析を実施した。その結果IS6110 DNA Fingerprintingに若干の変異のあるコロニーはあったが(松本他、投稿中)、本報の結核菌株は、すべてのcaseで同一菌株であることが証明された。また、このIS6110 DNA Fingerprintingの変異と薬剤感受性結果の間には、特定の関係は見受けられなかった。RFLP分析で見られる現象は、挿入配列IS6110の移動またはIS6110に関係する遺伝子配列の変異の結果生じるものであり、薬剤耐性遺伝子変異の部位とは異なる個所である可能性が高いことから、今回の結果は当然のものと考えられる。

ま と め

①抗結核薬治療中の患者の菌株を経時的に抽出してコロニー分離し、そのMIC値を測定したところ、2名にKM、SM、INHの各薬剤について、薬剤耐性コロニーと感受性コロニーの混在する菌株が認められた。

②結核菌株が、特定の抗結核薬に対して薬剤耐性を獲得する場合には、急速に薬剤耐性コロニーが増加していた。

③一度薬剤耐性を獲得した結核菌株が、抗結核薬を投与されないことによって薬剤感受性に復帰する場合には、比較的ゆっくりと薬剤感受性コロニーが増加していた。

④一度耐性化した結核菌株は、薬剤感受性に復帰した後に、再び同じ抗結核薬を投与されると、急速に薬剤耐性菌が増加していた。

⑤今回対象となった菌株には、RFLP分析によるIS6110 DNA Fingerprintingに若干の変異のあるコロニーが見受けられた。しかし、この現象と薬剤耐性結果との間には、明らかな関係は認められなかった。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、ご指導ご助言をいただいた当院(前)医務局長・菊井正紀先生、アイソトープ科部長・平島智徳先生、OligoArrayをご提供いただいた日清紡株式会社研究開発センターの市原竜生様、吉川陽子様、平野充茂様、ルシミックMTB-SRをご提供いただいた極東製薬工業研究開発部の岡沢豊様、佐藤直樹様、波多

宏幸様、山下研也様他の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Canetti G, Froman S, Grosset J, et al.: Mycobacteria: Laboratory methods for Testing Drug sensitivity and resistance. Bull Org mond Santé. 1963; 29: 565-578.
- 2) Canetti G, Fox W, Kohmenko A, et al.: Advances in techniques of testing Mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull Org mond Santé. 1969; 41: 21-43.
- 3) 久世彰彦: INAH自然耐性結核の研究 第2報. 結核. 1956; 31: 39-49.
- 4) 佐藤直行: イソニコチン酸ヒドラジッド治療患者の喀痰中結核菌の耐性 population の変動. 結核. 1954; 29: 393-397.
- 5) 佐藤直行: イソニコチン酸ヒドラジッド感性および耐性結核菌を人工的に混合した菌群の耐性度の動態について. 結核. 1955; 30: 119-122.
- 6) 石川哲也: INAH耐性の復帰に関する臨床的観察. 結核. 1955; 30: 183-189.
- 7) 露口泉夫: 多剤耐性結核に対する免疫療法—その可能性をさぐる. 結核. 1999; 74: 479-491.
- 8) 重藤えり子, 村上 功, 横崎恭之: リファンピシン耐性が消失し、治療17年目に菌陰性化に成功した薬剤耐性結核の1例. 結核. 2001; 76: 379-383.
- 9) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 新結核菌検査指針. 結核予防会, 東京, 2000.
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes; Tentative standard-second edition, M24-T2, NCCLS, Wayne, USA, 2000.
- 11) 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第3報): 微量液体希釈法を原理とする BrothMIC MTB の多施設評価—施設間再現性と AgarProportion法との判定互換性の解析. 臨床病理. 1999; 47: 745-766.
- 12) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 他: RFLP分析に基づく、結核感染状況の疫学的検討. 結核. 2002; 77: 783-788.
- 13) 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, 他: DNAチップによる結核菌の耐性診断. BIO INDUSTRY. 2000; 17: 36-44.
- 14) 山崎利雄, 佐藤直樹, 岡沢 豊, 他: 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法—*Mycobacterium tuberculosis* H37Rvを用いた基礎的検討. 臨床病理. 1998; 46: 834-840.
- 15) 山崎利雄, 佐藤直樹, 山下研也, 他: 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法(第Ⅲ報). 臨床病理. 2000; 48: 167-173.
- 16) van. Soolingen D, de Hass PEW, Kremer K: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Bithoven. The Netherlands: Protocol. National Institute of Public Health and the Environment. 1999.
- 17) 鈴木定彦, 田丸亜貴, A. Ruhul, 他: 結核菌の薬剤耐性

獲得機序の解析と迅速診断への展開. J Antibact Anti-fung Agents. 2000 ; 128 ; 561-573.

18) 岩井和郎:「結核病学」I (基礎・臨床編), 第4版, 結核予防会, 東京, 1995, 46-47.

Original Article

FLUCTUATION IN THE RATIO BETWEEN DRUG-RESISTANT AND -SUSCEPTIBLE
M. TUBERCULOSIS BACILLI WHICH WERE ISOLATED FROM PATIENTS
WITH PROLONGED ANTI-TUBERCULOSIS TREATMENT

Hiromi ANO, Tomoshige MATSUMOTO, Hiroko YOSHIDA, Chieko ISHIDA,
Nobuko TANIGAWA, Kunimitsu KAWAHARA, Hirokazu TOBA, Tetsuya TAKASHIMA,
and Izuo TSUYUGUCHI

Abstract [Purpose] In this study, we examined the fluctuation in the ratio between strains of tuberculosis bacilli resistant and susceptible to the anti-tuberculosis drugs.

[Material & method] We selected the cases in which the bacilli acquired drug resistance during the therapy and the cases in which drug resistance was fluctuating during prolonged anti-tuberculosis treatment. We selected the isolates throughout the medication period, and the selected isolates were separated into respective single colonies. Then we measured the minimal inhibitory concentration (MIC) for each colony by microdilution test for *M. tuberculosis* complex, BrothMIC MTB-1 (Kyokuto Pharmaceutical Inc., Tokyo).

[Results] Five patients were eligible for analysis because their medical histories were clearly recorded and drug resistance changed during the course. The MIC of 19 isolates, 202 colonies were measured. Isolates with coexisting drug-resistant and -susceptible colonies were detected in 2 patients. From these results, we considered that the fluctuation in the ratio between drug-resistant and -susceptible bacilli changes

with the progression of anti-tuberculosis medication.

[Conclusion] We showed in this article that the drug-resistant bacilli increased rapidly when the strains acquired the drug resistance during medication, and when the administration of particular anti-tuberculosis drug was stopped, the susceptible bacilli seemed to increase gradually. However, the strain immediately became fully drug-resistant when the particular antibacterial drug was readministered.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Drug resistance, Colony, Minimal inhibitory concentration, RFLP analysis, Fluctuation in drug-susceptibility

Osaka Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases

Correspondence to : Hiromi Ano, Osaka Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan.

(E-mail: ano@zeus.eonet.ne.jp)