

諸種抗結核剤に対する耐性菌の研究

第 2 報

結核菌の諸種抗結核剤接触時間と耐性獲得との関係

金沢大学結核研究所診療部 (主任: 鈴木茂一教授)

高 野 徹 雄

(受付: 昭和29年11月1日)

Tetsuo TAKANO: STUDIES ON THE RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI AGAINST VARIOUS TUBERCULOSTATIC AGENTS
Part 2. Studies on the correlation between the period of Exposure and the Acquisition of Resistance

Department of Clinical Research, Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa University.
(Director: Prof. Moichi SUZUKI)

(Received for publication: Nov. 1, 1954.)

緒 言

私は第1篇に於てSM並に其の他の抗結核剤投与が肺結核患者の喀痰菌中に耐性菌の発現をもたらし、更に耐性菌発現に伴い臨床症状の悪化する事を指摘したが、今回はSM或いはOM

含有 Kirchner 培地に浸漬せる人型結核菌“H₂”株の両薬剤に対する感受性が時間的に如何に変遷するやを追究したので、ここに其の成績を報告せんとするものである。

実 験 方 法

〔I〕 菌浮游液の調製

予め6~7個の小硝子玉を入れた滅菌試験管内にて10%家兎血清加 Kirchner 培地に人型結核菌“H₂”株を3週間浮游培養せる後充分振盪し、次で約30分間直立静置じ其の上澄液を使用した。

〔II〕 被検薬液の調製

- i) Streptomycin DH (SM) (Merck)
Dihydrostreptomycin Sulfate 32 mg
を70% Alcohol 20ml に溶解。
(1 ml 中 SM 1,000 γ 含有.)
- ii) o-Aminophenol(OM) (金大結研製) OM 20mg
に70% Alcohol 20ml を加え加温溶解す。
(1 ml 中 OM 1,000 γ 含有.)

〔III〕 実験術式

- i) 上記被検薬剤の「アルコール」溶液より2.5γ/ml になる如く10%家兎血清加 Kirchner 培地に添

加、各々其の2ml 宛を31本の小試験管に分注し、別に抗結核剤を含まぬ対照群を置き、其等に前述の菌液を一滴宛滴下し、封蠟後37°C に培養した

- ii) 之等試験管群より菌液滴下直後から48時間毎に両薬剤につき各一本宛取出し、3,000回10分間遠心、その沈渣を1白金耳宛、岡・片倉培地に移植し約4週間培養後、各培地に發育せる数集落を夫々 Kirchner 培地に移植し、發育せる菌液を用いて高森⁽¹⁾の方法に準拠し、家兎全血 S. C. C. 法を応用して両薬剤に対する各結核菌の發育阻止濃度を検した。

〔IV〕 成績の判定

薬剤加 Kirchner 培地より岡・片倉培地に移植せる結核菌の可視大集落発生時間を検すると共に高森⁽¹⁾の行つた方法に従つて SM 及び OM の静菌力価を検した。

実験成績

[A] 結核菌を SM 添加培地に浸漬せる場合
第1図は SM 2.5 γ /ml 含有 Kirchner 培地及び、対照 Kirchner 培地中に浸漬された人型結核菌“H₂”株の SM 及び OM に対する感受性を示したものである。

浸漬直後より12日迄に分離培養された菌株に対する SM 及び OM の静菌力価は何れも感受性菌の場合と同様 3.1~1.5 γ /ml で、耐性菌と想われる集落は認めなかつた。然し乍ら浸漬16日目に至つて SM 6.2 γ /ml にも發育せる集落が現れ、更に20日以後では SM 12.5 γ /ml に於ても發育阻止されない集落が認められた。尚38~40日目に分離した菌株中には25 γ /ml の高濃度中でも發育するものが存していた。一方逐時的に分離した上記結核菌に対する OM の静菌力価は 3.1~1.5 γ /ml と多少の変動はあつたが概ね正常値に留り、SM 25 γ /ml に發育した集落に対しても OM は 3.1~1.5 γ /ml で發育を阻止した。尚集落發生時間に就ては(第2図参照)浸漬時間に

略々比例して延長の傾向を見たが、浸漬20日以後では必ずしも此の關係は成立せず、順序不同となり或いは逆に次第に早く集落を認めるという成績を示した。

[B] OM 添加培地に浸漬せる場合

第3図はOMを2.5 γ /mlに添加した Kirchner 培地中に浸漬せる人型結核菌“H₂”株の SM 及び OM に対する感受性の変化を示したものであるが、浸漬40日目迄 SM, OM は共に 3.1~1.5 γ /ml にて其の發育を阻止し、感受性菌と異なる所がなかつた。然るに46日目は分離せる結核菌中に SM 含量 3.1 γ /ml にて發育せる集落群を認めた。然し OM に対しては終始 3.1~1.5 γ /ml で發育阻止され、SM に浸漬せる場合に於ける如き耐性獲得状況は認めなかつた。

集落發見に要する時間(第4図参照)に就ては漸次延長するが浸漬26日以後では SM に於けると同様に略々対照群に一致していた。

考 按

SM に対する自然耐性菌の存在は Yegian et al. (2), 柳沢等 (3) 及び Venesland et al. (4) により確認され、其の頻度は 10⁻⁸前後である事が明白にされている。今回の実験でも OM 加 Kirchner 培地に浸漬せる菌株中に SM 3.1 γ /ml でも發育阻止されないものが認められた事は自然耐性菌の混在とも推定される。耐性獲得現象の本態が適応或は変異と種々論争され、近時変異説 (5)(6) が有力視されているが未だ解明されていない。私は其の耐性獲得現象が薬剤の種類と接触時間とにより如何に変動されるやの実験的研究を試みたのであるが、SM に於ては今回の実験方法で容易に耐性集落の發現を惹起し、前述した如く、浸漬せる濃度以上の SM 含有培地に迄發育せる集落が準次多数を占めた事、及び集落形成日数の短縮に比例して耐性菌

が発生した事を知り得た。OM に就ては SM に於ける如き關係を認める事が出来なかつた。扱 2.5 γ /ml は SM 0.5g 筋注時の 2~5 時間目 (7) 或は OM 1.0g 内服後 1~3 時間目の血中濃度 (8) であるが、SM に於ては 14 日目以後は此濃度以上に發育可能となつた事より、斯る傾向の存しなかつた OM に比し、結核の如き慢性疾患の治療に対する SM の投与方法に関しては充分考慮すべき問題が存すると推定されるのである。

更に SM 2.5 γ /ml を含有せる Kirchner 培地より岡・片倉培地に移植せる結核菌の可視大集落形成に要する期間が一度延長し、耐性菌發現期と相前後して再び正常發育期間に近接した事は臨床上の咯痰定量培養と耐性菌發現との關係と併せ考え耐性獲得現象には結核菌の増殖乃

至発育状態が関係するものと推察し得るのである。

小 括

以上を要約すれば、

1. SM を 2.5 γ /ml に含有せる Kirchner 培地より時間的に分離した人型結核菌“H₂”株から浸漬14日目より耐性菌が発現し、且其の集落発生期間は耐性菌発現迄は少々延長し、耐性菌の発現後は対照と同程度になつた。一

方 OM の SM 耐性株に対する静菌力は不変であつた。

2. OM 含有培地に浸漬せる場合は OM に対する感受性には全く変化無く、SM に対しては46日目に分離せるものの中に耐性株が認められた。

文 献

- 1) 高森正章：金大結研年報，6，137，1948。
 2) Yegian, D. et al. : Am. Rev. Tuberc., 61(4), 483, 1950. 3) 柳沢謙：日本医事新報，1487, 1952. 4) Venesland, K. E. et al. : Science, 106, 476, 1947. 5) Demerec, D. : J. Bact., 56

- (1), 63, 1948. 6) 秋葉朝一郎：医学のあゆみ，13 (5), 250, 1952. 7) 日比野進：結核研究の進歩，1, 158, 1953. 8) 毛笠昇：金大結研年報，12 (下), 59, 1954.

Summary

(1) Samples picked up at various intervals from a culture of human type “H₂” tubercle bacilli in Kirchner’s medium containing 2.5 γ /ml of streptomycin (SM) began to show presence of drug resistant strains 14 days after the exposure of the bacilli to the tuberculostatic agent.

The period of colony formation was seen to be a little prolonged prior to the emergence of resistant strains, but after that the colonies developed as fast as in the control culture.

The tuberculostatic power of o-aminophenol (OM) was found to be as strong toward SM-resistant strains as toward the normal strain.

(2) On the other hand, the bacilli soaked in a liquid medium containing OM showed no change of sensitivity at all toward OM, but some of them fished on the 46th day after soaking were found to contain some SM-resistant strains.

Figure 1. The fluctuation of sensitivity of tubercle bacilli that were fished from the Kirchner's liquid medium that contains 2.5 γ /ml of SM to either OM or SM

Strain : Human tubercle bacilli "strain H₂"
 Experimental method : S. C. C.

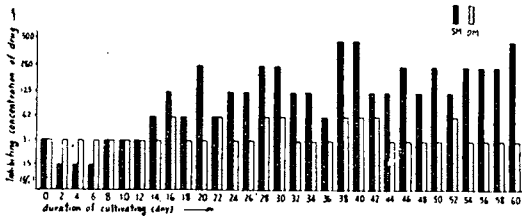


Figure 2. The incubation to colony formation of tubercle bacilli that were fished from the Kirchner's liquid medium that contains 2.5 μ g/ml of SM

Strain : Human tubercle bacilli "strain H₂"
 Oka-Katakura's solid media

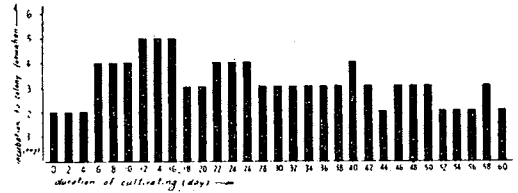


Figure 3. The fluctuation of sensitivity of tubercle bacilli that were fished from the Kirchner's liquid medium that contains 2.5 γ /ml of OM to either OM or SM

Strain : Human tubercle bacilli "strain H₂"
 Experimental method : S. C. C.

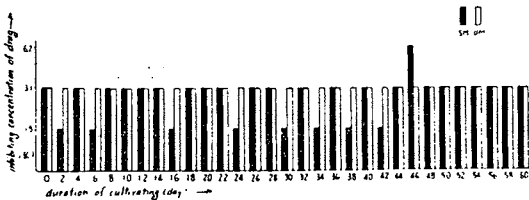


Figure 4. The incubation to colony formation of tubercle bacilli that were fished from the Kirchner's liquid medium that contains 2.5 γ /ml of OM

Strain : Human tubercle bacilli "strain H₂"
 Oka-Katakura's solid media

