

# 細菌の薬剤耐性に関する研究

## 第 10 報

### 結核菌の二重耐性に関する研究

#### 第 1 篇

#### SM耐性菌および INAH 耐性菌の二重耐性獲得について

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任: 柿下正道教授)

寺 崎 隆

(受付: 昭和33年7月25日)

#### 緒 言

抗結核剤の発見以来、結核菌の薬剤耐性問題は临床上、細菌学上あるいは遺伝学的に重要かつ興味ある事として注目され、これに関しては既に幾多の業績が報告されている。しかしてその中で興味ある問題の一つは結核菌の SM に対する耐性と INAH に対する耐性とでは若干趣を異にする事である。そこで私は菌の SM、

INAH およびその他薬剤に対する耐性化の状態、SM 耐性菌および INAH 耐性菌の各抗結核剤に対する耐性獲得推移および二重耐性菌の他剤に対する交差耐性について観察し菌のこれら薬剤に対する耐性獲得機序解明の一端に資せんとした。以下はその成績の概要である。

#### 実 験 材 料

##### 1) 供試薬剤

Dihydrostreptomycin (SM)  
p-Aminosalicylic acid (PAS)  
4-acetylaminobenzaldehyde thiosemicarbazone (TbI)  
Isonicotinic acid hydrazide (INAH)  
Sodium isonicotinic acid hydrazide methanesulfonate (IHMS)  
o-Aminophenol (OM)

Viomycin (VM)

##### 2) 供試菌株

ヒト型結核菌 H<sub>2</sub> 株 (H<sub>2</sub>-S)  
SM 耐性株 (H<sub>2</sub> 株より分離した教室保存株)  
10,000 $\gamma$ /ml 耐性菌 (SM-R)  
INAH 耐性株 (H<sub>2</sub> 株より分離した教室保存株)  
100 $\gamma$ /ml 耐性菌 (INH-R)

##### 3) 培 地

1%小川培地

#### 実験 I 耐性獲得推移の観察

##### 実 験 方 法

1%小川培地で各薬剤の適宜稀釈系列を作り (SMは加熱による抗菌力の低下を考慮して予定濃度の2倍量を添加) これに手振法により作成した均等菌浮遊液

(約0.1mg/ml) を毛細管ピペットにて一滴ずつ滴下し、4週間37°C (PAS含有培地のみは発育遅延のため5週培養) に培養後判定を行い、各薬剤の最高濃度

の試験管に発育した菌を同様操作により順次10代継代し耐性上昇推移を観察し、同時に SM-R および

INH-R についてはそれぞれの耐性度の変化をも調べた。

## 実 験 成 績

### イ) 耐性上昇推移について

#### i) SMに対する耐性 (第1図)

INH-R は初代より既に SM に対し10r 耐性 (不完全耐性) を示し第3代に至り 200r 耐性, その後も急激に上昇し7代で既に10,000r 耐性となった。H<sub>2</sub>-S は5代で 10r 耐性, 6代で 100r 耐性7代で 1,000r 耐性と上昇早く, その後はやや緩慢であった。SM-R は初代より10代まで常に SM 20,000r/ml 含有培地まで発育したが表1に示すごとく高濃度含有培地での発育はやや遅延を見た。

#### ii) PAS に対する耐性 (第2図)

SM-R および H<sub>2</sub>-S 共同様な経過をとり5代で 5r 耐性, 9~10代で100r耐性となつたに過ぎない。INH-R は初代より前二者に比べ感受性やや低く耐性上昇も急激で, 6代で100r耐性, 7代で 200r 耐性になつたがその後は耐性上昇をみなかつた。すなわち SM-R, H<sub>2</sub>-S および INH-R 共 PAS に対しては 100~200r 耐性にとどまつた。

#### iii) Tbl に対する耐性 (第3図)

3株共初代の発育可能最高濃度は 5r/ml であつたが SM-R は6代, INH-R は3代, H<sub>2</sub>-S は4代で 100r 耐性となつた。しかしその後10代に至るもそれ以上耐性上昇を見なかつた。

#### iv) INAH と IHMS に対する耐性 (第4,5図)

INAH と IHMS に対しては SM-R, H<sub>2</sub>-S とも急激な耐性上昇を示しほとんど同様な推移を

見た。ただ INAH に対する SM-R の耐性上昇は H<sub>2</sub>-S のそれよりやや遅れるようである。また INH-R を10代継代したが INAH には 200r 耐性 (不完全) IHMS には 500r 耐性 (不完全) 以上にはならなかつた。

#### v) VM に対する耐性 (第6図)

SM-R は4代まで上昇せずそれより段階的に上昇, 7代で 200r 耐性となり以後上昇早く10代で5,000rに達した。INH-R は5代まであまり耐性上昇はないが, 以後かなり急激に上昇し9代で 5,000r 耐性となつた。H<sub>2</sub>-S は5代で 100r 耐性となる程度であつたが以後前二株より早く耐性上昇を見た。本実験では 5,000r 以上の高濃度の培地に継代を行なわなかつたがその後更に高濃度培地で3代継代後測定した結果では3菌株共 20,000r の耐性となり VM に対しても SM に対すると同様高度耐性化することがわかつた。

#### vi) OM に対する耐性 (第7図)

3株共初代の発育可能最高濃度は 3r/ml であつたが10代に至るも耐性化はみられなかつた。

#### ロ) 感性復帰について

以上の実験において SM-R および INH-R をそれぞれ SM および INAH (または IHMS) 以外の薬剤含有培地で継代したすべての場合それぞれの耐性度の低下は認められなかつた。

## 実験 II 交差耐性に関する実験

### 実 験 方 法

教室保存の3菌株 H<sub>2</sub>-S, SM-R および INH-R と実験 I で分離した21株の24株について供試7薬剤に

Pyrazinamide (PZA) を追加し型のごとく他剤に対する交差耐性の有無を調べた。

## 実験成績

表4に示すごとく INAH と IHMS との間に、INAH (IHMS) 耐性菌は PZA に、VM-

INAH 二重耐性菌は SM に対しそれぞれ交差耐性を有することを認めたに過ぎない。

## 考 按

抗結核剤に対する感性菌の耐性獲得推移を Demerec<sup>1)</sup>のいう Sm 型と Pn 型に分類して小酒井<sup>2)</sup>は PAS を Pn 型, SM, Tbl および INAH を Sm 型に, 君野<sup>3)</sup>は PAS および Tbl を Pn 型 SM および INAH を Sm 型に, 中山<sup>4)</sup>は SM および Tbl を Sm 型, INAH および PAS を Pn 型に入れている。私は菌の各薬剤に対する耐性獲得状況を容易, 比較的容易, 難の3つの型として第2表に総括した。中山は SM および INAH 耐性菌を他の抗結核剤を含有する培地に継代して, 他抗結核剤に対する耐性を観察した結果, 菌のはじめに有する他結核剤に対する感受性の高低は以後の耐性推移に関与しないとし, 君野<sup>3)</sup>はトリ型菌(獣調株)を使用しての実験で INH-R には SM 耐性になり難い I 型となりやすい II 型とがあり, また SM 耐性菌は Tbl 耐性になりやすいと述べている。また斉藤<sup>5)</sup>は INH-R は SM 耐性になり難く 8代で 50r 耐性になったに過ぎないといひ, 宮本<sup>7)</sup>は PAS-INAH の二重耐性菌はできやすいと述べている。私の H<sub>2</sub>S 株を用いての実験でも大体同様な結果が得られたが二三異なつたところがあつたのでこの点を中心に討議を加えることとする。第1図よりわかるごとく INH-R が感性菌よりも SM に対して早期に高度耐性となつたことは君野のいう II 型に属するが私の場合は INH-R が最初より SM に対し 10r 程度の低度ながら交差耐性を有しておることが異なつており, このような報告は見当たらない。教室保存の INH-R でなく H<sub>2</sub>-S から新たに分離した INAH 耐性菌 [INAH(H<sub>2</sub>-S)] も第4表に示すごとく, また教室保存の竹尾株 INH-R も最初より SM 10r 耐性を有していた(第3表)。このように私の実験では INAH 耐性菌は最初より SM に対し軽度の

耐性を有し, かつ 10r 程度の耐性菌は以後急激に高度耐性菌となる事が観察されたが, もしこれが事実とすれば臨床的に INAH 耐性となつた場合の SM の使用に注意を要するところである。しかし上述した反対成績もありかつ束村<sup>8)</sup>は INH-R の SM に対する変異率と感性菌の SM に対する変異率とは全く同じだとしその上実際には併用療法がかなり良好な成績を収めている現況であつて, *in vivo* での抗結核剤の作用は *in vitro* におけるものと異なるところがあるろうし, その解決は今後の研究に待つところである。また INAH と IHMS に対する H<sub>2</sub>-S および SM-R の耐性獲得状況は, ほとんど同様な態度を示した。また VM に対しては H<sub>2</sub>-S および INH-R は比較的早く SM-R ははじめはむしろ Pn 型形式でその後急激に高度耐性菌となつた。VM には耐性となり難く耐性獲得も Pn 型であるとの報告<sup>9)</sup>とは三株とも相反する結果となつた。なお検討を要するところである。

さて生化学的立場から田中<sup>10)</sup>および庄司<sup>11)</sup>らが論じているごとく薬剤耐性菌では明らかに原株と異なつた代謝を営むゆえ一剤に耐性である菌が他剤にも耐性となつた場合, もとの耐性になんらかの変化が招来されないか, また更に他の薬剤にも耐性とならないか(交差耐性)等のことについて実験を試みた。その結果, SM-R および INH-R を他の抗結核剤を含有する培地に継代して他抗結核剤に耐性としても, 大藤<sup>12)</sup>同様もとの SM および INAH 耐性度には変化が認められず, かつ交差耐性についても先に教室の松田<sup>13)</sup>が INAH と IHMS の間に交差耐性の認められることを報告したが私の二重耐性株に関する実験でも同様な成績が得られた。その他 INAH (または IHMS) と PZA の間にも交差

耐性が見られるようである。ただこの場合 PZA の抗菌力は pH に左右されるので判定の困難な事が多いが第 4 表に示した成績からは明らかに交差耐性の存在が推定される。その他の二重

耐性菌では VM-INAH 耐性菌〔第 4 表の VM (INH-R) の項〕が SM に 100r 程度の交差耐性を示した。

## 結

ヒト型結核菌 H<sub>2</sub> 株およびその SM 耐性株 (SM-R) と INAH 耐性株 (INH-R) の三株を各種抗結核剤含有 1% 小川培地に継代し、それら薬剤に対する耐性上昇推移およびもとの耐性度の変化とともに、一重および二重耐性菌の他剤に対する感受性について観察し次のような結論を得た。

- 1) SM あるいは INAH 耐性菌は他抗結核剤に対し二重耐性菌になり得る。
- 2) PAS, TbI, INAH および IHMS 等の合成抗結核剤に対する高度耐性菌は得られない (100~500r 耐性まで) が SM および VM 等の抗生物質に対する高度耐性菌 (2,000r 耐性

## 論

以上) の出現は容易に認められる。

- 3) OM に対しては三株共耐性化しない。
- 4) INAH と IHMS は菌の耐性化において全く同様な態度を示す。
- 5) INAH 耐性菌は SM に対し感受性が低い。
- 6) SM-R および INH-R を他の抗結核剤を含有する培地に継代しても SM および INAH に対する耐性度の低下は見られない。
- 7) INAH あるいは IHMS 耐性菌は PZA に交差耐性を示すようである。
- 8) VM-INAH 二重耐性菌は SM に 100r 程度の交差耐性を示す。

## 文

- 1) Demerec, M.: J. Bact., 56, 63, 1948.
- 2) 小酒井望: 日結, 11, 56, 1952.
- 3) 君野徹三: J. Antibiotics Ser. B, 7, 62, 1954.
- 4) 中山瑛一: 九州大学結核研究所紀要, 2, 1, 1955.
- 5) 君野徹三: 最新医学, 9(2), 21, 1954.
- 6) 斉藤利夫, 他: 結核, 第32回総会演説特集, 173, 1957.
- 7) 宮本 泰: 結核, 第32回総会演説特集, 175, 1957.

## 献

- 8) 東村道雄: J. Antibiotics Ser. A, 9, 19, 1956.
- 9) 松田健吉: 原著広医, 5, 276, 1957.
- 10) 田中伸一: 結核, 第32回総会演説特集, 76, 1957.
- 11) 庄司 宏: 結核, 第32回総会演説特集, 95, 1957.
- 12) 大藤 真: 結核, 第32回総会演説特集, 177, 1957.
- 13) 松田知夫: 金大結研年報, 14 (上), 71, 1956.

第 1 表 SM-RのSM 含有培地における発育状態

週	SM <sub>T</sub> /ml	20,000	10,000	5,000	2,000	cont.
	2	-	7	8	5	10
3	22	+	+	+	卅	
4	+	卅	卅	卅	卅	
5	卅	卅	卅	卅	卅	

第 一 代

週	SM <sub>T</sub> /ml	20,000	10,000	5,000	2,000	cont.
	2	16	+	+	+	+
3	+	卅	卅	卅	卅	
4	卅	卅	卅	卅	卅	
5	卅	卅	卅	卅	卅	

第 十 代

第 2 表 三株の薬剤耐性獲得の難易

菌 株 薬 剤	H <sub>2</sub> -S	SM-R	INH-R
S M	容 易	•	容 易
PAS	難	難	比較的容易
TbI	容 易	容 易	容 易
INAH	容 易	容 易	•
IHMS	容 易	容 易	•
V M	比較的容易	難	比較的容易
O M	不 能	不 能	不 能

第 3 表 トリ型結核菌(竹尾株)の SM および INAH に対する感受性  
感 性 菌 (竹尾株)

濃度(r/ml)	10,000	1,000	500	100	10	1	0.5	cont.
SM	-	-	-	-	-	-	卅	卅
INAH	-	-	-	-	-	+	卅	卅

SM-R (竹尾株)

濃度(r/ml)	10,000	1,000	500	100	10	1	0.5	cont.
SM	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
INAH	-	-	-	-	-	+	卅	卅

INH-R (竹尾株)

濃度(r/ml)	10,000	1,000	500	100	10	1	0.5	cont.
SM	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅
INAH	-	-	+	卅	卅	卅	卅	卅

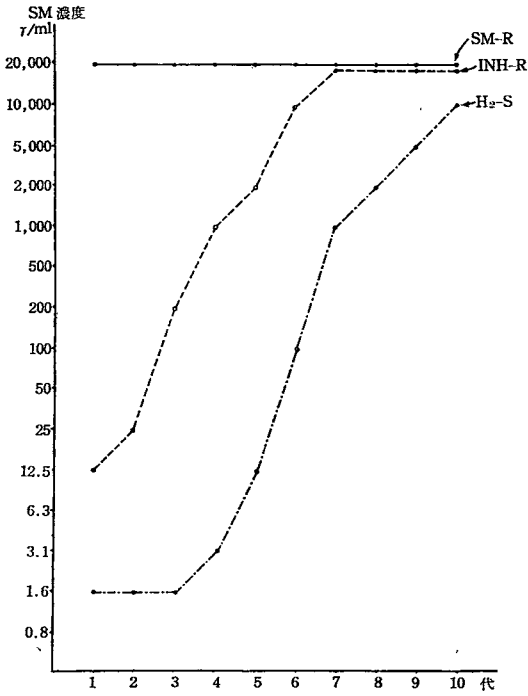
小川培地 判定 5 日

第 4 表 各種抗結核剤に対する感受性 (数字 r/ml 最高発育濃度)

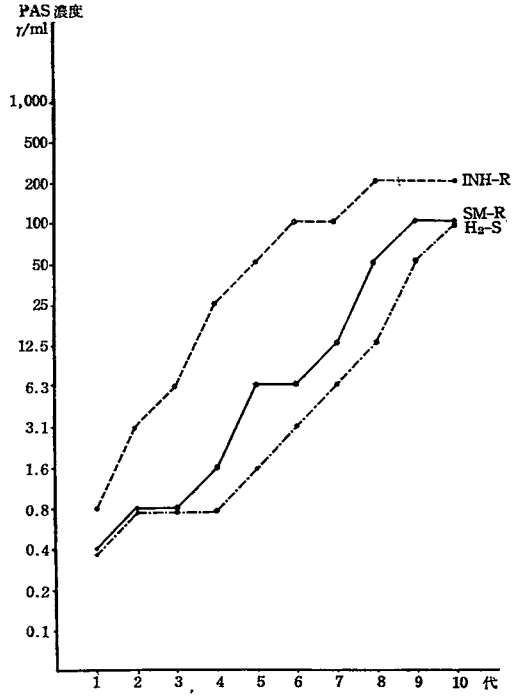
菌 株	SM	PAS	TbI	INAH	IHMS	VM	OM	PZA
SM-R	10,000	0.5	5	0.05	0.05	50	5	50
SM (SM-R)	10,000	0.5	5	0.05	0.05	50	5	50
PAS ( / )	10,000	100	5	0.05	0.05	50	5	50
TbI ( / )	10,000	0.5	100	0.05	0.05	50	5	50
INAH ( / )	10,000	0.5	5	200	500	50	5	1,000
IHMS ( / )	10,000	0.5	5	200	500	50	5	1,000
VM ( / )	10,000	0.5	5	0.05	0.05	2,000	5	50
OM ( / )	10,000	0.5	5	0.05	0.05	50	5	50
INH-R	10	0.5	5	200	500	50	5	1,000
SM (INH-R)	10,000	0.5	5	100	200	50	5	1,000
PAS ( / )	10	100	5	100	200	50	5	1,000
TbI ( / )	10	0.5	100	100	200	50	5	1,000
INAH ( / )	10	0.5	5	200	500	50	5	1,000
IHMS ( / )	10	0.5	5	200	500	50	5	1,000
VM ( / )	100	0.5	5	100	200	2,000	5	1,000
OM ( / )	10	0.5	5	100	200	50	5	1,000
H <sub>2</sub> -S	1	0.5	5	0.05	0.05	50	5	50
SM (H <sub>2</sub> -S)	10,000	0.5	5	0.05	0.05	50	5	50
PAS ( / )	1	100	5	0.05	0.05	50	5	50
TbI ( / )	1	0.5	100	0.05	0.05	50	5	50
INAH ( / )	5	0.5	5	200	200	50	5	1,000
IHMS ( / )	5	0.5	5	500	500	50	5	1,000
VM ( / )	1	0.5	10	0.05	0.05	2,000	5	50
OM ( / )	1	0.5	5	0.05	0.05	50	5	50

( / ) 内は原株で、左側の抗結核剤含有培地で継代、耐性化したもの。  
たとえば SM (INH-R) は INH-R を SM 培地で継代した SM と INAH の二重耐性菌の意  
VM (H<sub>2</sub>-S) は、感性菌 H<sub>2</sub> 株を VM 耐性とした VM 一重耐性菌

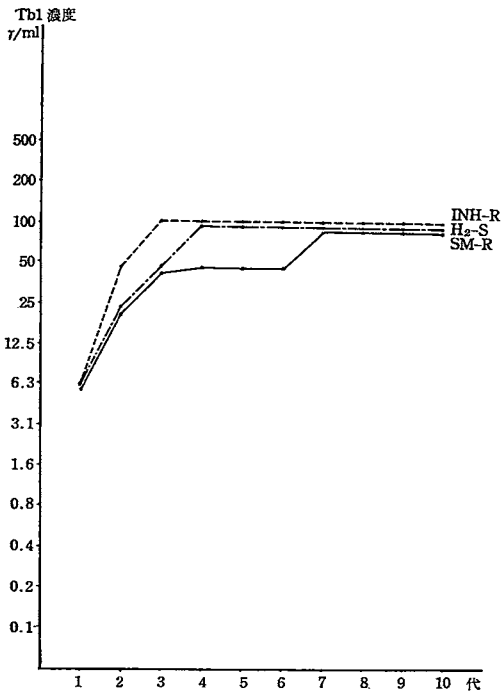
第1図 SMに対する三株の耐性推移



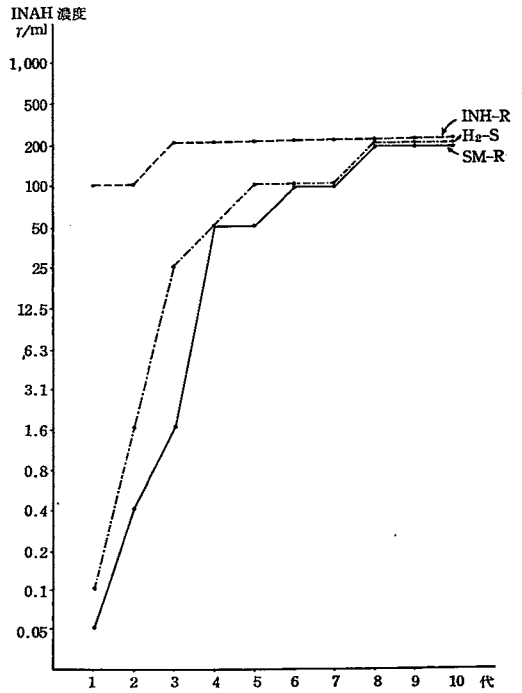
第2図 PASに対する三株の耐性推移



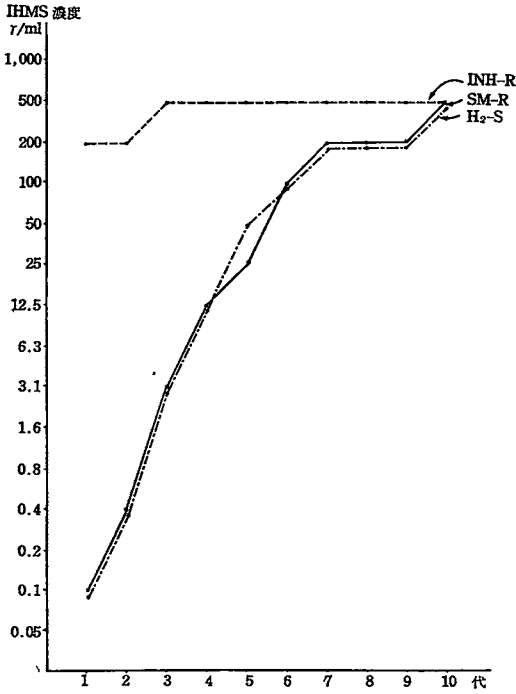
第3図 TbIに対する三株の耐性推移



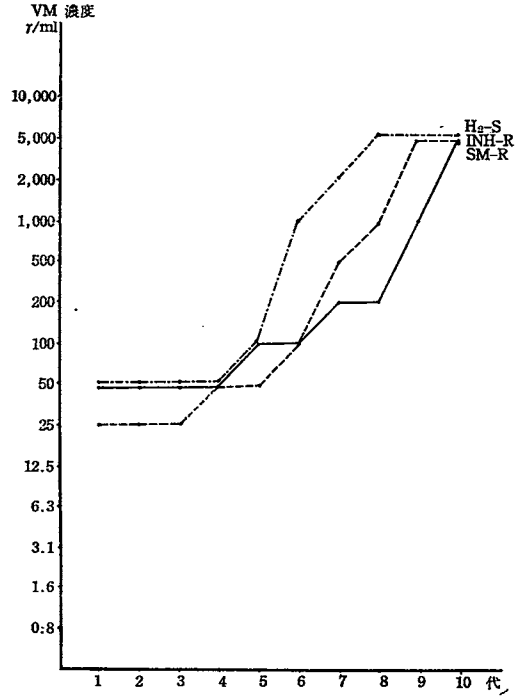
第4図 INAHに対する三株の耐性推移



第5図 IHMSに対する三株の耐性推移



第6図 VMに対する三株の耐性推移



第7図 OMに対する三株の耐性推移

