

# 細菌の薬剤耐性に関する研究

## 第 3 報

結核菌に対する各種抗結核剤の併用効果に関する研究

### 第 3 編 Isonicotinic acid hydrazide 耐性結核菌 を用いての実験

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

早 川 晋  
英 軒

（受付：昭和31年3月12日）

#### 緒 言

著者の一人早川は先に Streptomycin (SM) 又は p-Aminosalicylic acid (PAS) 耐性結核菌に対する各種抗結核剤の併用効果に関する比較検討を行い、その成績に就いて報告<sup>1)2)</sup>した。今回は Isonicotinic acid hydrazide (INAH) 耐性結核菌を用い、INAH+SM, INAH+PAS 及び INAH+OM (o-Aminophenol) の組合

せに就いて、管内に於て6代に亘り継代培養し前回同様各薬剤の発育阻止力の変動並びに耐性獲得の消長に就いて実験を行い、併せて定量培養に依り耐性分布の状態を観察し、些か成績を得たので此処に報告し、大方の御批判を仰ぎ度いと思う。

#### 実 験 方 法

1. 供試培地  
10%家兔血清加 Kirchner 培地 (pH 6.8)
2. 供試薬剤  
INAH, SM, PAS 及び OM を 前報<sup>1)</sup>と同様に稀釈調製した。
3. 供試菌株及び菌液  
英<sup>3)</sup>が4代に亘る INAH 単独管内継代培養に依り耐性 (100 r/ml) を獲得せしめた後、グリセリン・馬鈴薯培地に保管せる人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を硝子球手振法に依り 1mg/ml の均等浮游菌液とし、INAH+SM, INAH+PAS 及び INAH+OM 加培地稀釈系列並びに INAH 単独稀釈培地系列に夫々毛細管ピペットで 1 滴宛を移植した。  
2代目からは菌の INAH 及び併用薬剤の可及的高

濃度の箇処に発育せる試験管に滅菌硝子球数個を入れ前と同様浮游菌液を作つて継代培養した。

4. 薬剤併用効果の成績判定  
1 週間毎に Kirchner 培地に於ける発育状態を観察し、4 週目を以つて最終判定とした。
5. 薬剤耐性度の定量培養試験  
INAH 単独及び INAH と他薬剤併用の第 1, 3 及び 5 代の継代株を INAH (100, 10, 1.0, 0.1, 0.1 r/ml) 及び併用剤の種類に依り SM (100, 10, 3 r/ml), PAS (100, 10, 1.0 r/ml) 又は OM (100, 10, 1.0 r/ml) を含む 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に、小川<sup>4)</sup>の方法に依り夫々定量培養して、毎週集落の有無を検し、5 週後を最終判定とした。

## 実験成績

著者の一人英<sup>3)</sup>が管内継代に依り得た INAH 耐性株 (100  $\gamma$ /ml) はその後グリセリン・馬鈴薯培地の継代 (10代) に依り耐性はやゝ減弱して INAH 単独時第1代では 50 $\gamma$ /ml 耐性を示した。INAH 単独継代培養の成績は第1表に示す如く第4代目より INAH 100 $\gamma$ /ml 耐性となり僅かな耐性上昇を示した (第2図参照)。

INAH-SM 併用では INAH 単独継代の際と同様 INAH 耐性の進展を示すと同時に急速な SM 耐性獲得を示し、(第1図参照) SM 併用に依る発育阻止力の増強は第3,5及び6代に於て僅かに認められたに過ぎなかつた (第2表参照)。

INAH-PAS 併用では第3,4代に於ては INAH 耐性低下 (25  $\gamma$ /ml) を示したが第5代以後は INAH 50 $\gamma$ /ml 耐性を持続し、弱い PAS 耐性獲得を認めたが (第1図参照)、併用に依る発育阻止力の増強は各代に於て認められ、第2,4代に於て特に著明であつた (第3表参照)。

INAH-OM 併用では第2,3代に於て INAH 耐性低下 (25  $\gamma$ /ml) を示したが、第4代以後 50 $\gamma$ /ml を持続して第6代迄 OM 耐性獲得を認めなかつた。(第1図参照) 併用に依る発育阻止力の増強は第2代を除いて各代に認められ、第3,4代に於て特に著明であつた (第4表参照)。

## 考 按

INAH 感性人型結核菌を用いての管内に於ける併用継代実験では、英<sup>3)</sup>は INAH に OM 又は PAS を併用し、宮本・上野<sup>9)</sup>は PAS を併用する事に依り INAH 耐性獲得を遅延せしむる顕著な協力作用を認め、小沢<sup>6)</sup>は PAS 併用に依り INAH 耐性獲得を僅かに抑制したと発表しているが、芦野<sup>7)</sup>は INAH のみ耐性化して PAS 耐性は出現しなかつたと云つている。上野<sup>9)</sup>は INAH-SM の併用は両者に対し共に耐性発現を阻止出来ると云つているが、小沢<sup>6)</sup>

次に定量培養に依り各種耐性培地の発育集落数を control の集落数に対する%を以て算出し、耐性分布状態の比較を試みた実験成績は第5表に示す如く、INAH 単独継代の場合 INAH 0.1  $\gamma$ /ml 耐性菌は継代に依り僅かに増加し、INAH 1.0 及び 10  $\gamma$ /ml 耐性菌は第3,5代ではむしろ僅か乍ら減少を認め、第5代に於て 100  $\gamma$ /ml 耐性菌の出現をみているが、SM, PAS 又は OM に対しては夫々感受性を示している。

SM 併用の場合 INAH 0.1 及び 1.0 $\gamma$ /ml 耐性菌は継代に依り僅かに増加し、10 $\gamma$ /ml では第5代迄同程度に持続し、第5代に於ては INAH 単独時に比し弱い 100 $\gamma$ /ml 耐性菌の出現をみた。又 SM 3 $\gamma$ /ml 耐性菌は併用第1代から、10 $\gamma$ /ml 耐性菌は第3代より出現共に急増し、第5代に於て 100 $\gamma$ /ml 耐性菌の出現をみた。

PAS 併用の場合 INAH 0.1, 1.0 及び 10 $\gamma$ /ml 耐性菌は併用継代に依り漸増し、第5代に於ては PAS 1.0 $\gamma$ /ml 耐性菌を認めているが、INAH 100 $\gamma$ /ml 耐性菌は発現しなかつた。

OM 併用では、INAH 0.1, 1.0 及び 10 $\gamma$ /ml 耐性菌は PAS 併用の場合の如く代を重ねる毎に僅か乍ら増加したが、INAH 100 $\gamma$ /ml 耐性菌及び OM 耐性菌の出現は認めなかつた。

は僅かに INAH 耐性獲得抑制作用を認めたが、宮本・上野<sup>9)</sup>、日比野<sup>8)</sup>は INAH に対する耐性獲得を認め、芦野<sup>7)</sup>は INAH 及び SM に対し共に耐性を獲得すると報告している。著者は前報<sup>2)</sup>の人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を用いた実験では SM-INAH 併用では SM 耐性獲得はやゝ遅延し、PAS-INAH 併用の際には PAS 及び INAH に対し共に耐性獲得を示した旨報告した。他方臨床実験で英<sup>10)</sup>は PAS 併用が最も INAH 耐性獲得を抑制し、OM 併用がこれに次ぐことを認

め、小酒井<sup>11)</sup>は SM 併用が INAH 耐性獲得を著しく遅延せしめ而も SM 耐性菌の発現を認めないが、PAS 併用では INAH 単独と大差なく耐性菌の発現を証明したと報告し、諸家の意見は区々として成績は必ずしも一致していない。

INAH 耐性菌を用いた実験は少く、君野<sup>12)</sup>は INAH 耐性鳥型菌の Sauton 培地に於ける継代培養実験で INAH 耐性菌は殆んどの場合 SM 耐性になりやすく、極く少数に SM 耐性上昇を認め、PAS 耐性化は他の菌株を用いた場合と比較して著差のない事を発表しているが、坂井<sup>13)</sup>は INAH に対し SM 又は PAS を併用して Kirchner 培地に継代した結果 INAH 100 $\gamma$ /ml 耐性菌の SM に対する耐性獲得は PAS のそれに較べて早かつた事を認めており本実験の成績と一致している。又 INAH 耐性菌の SM に対する耐性獲得の態度を H<sub>2</sub> 株 (前報<sup>1)</sup>第 1 図参照)と比較するとき、SM 単独継代の際と殆んど大差のない事を知つた。

SM 耐性の場合と異り INAH 耐性菌では比較的容易に感受性復帰を認める事が論議されてお

り、英<sup>10)</sup>も臨床実験で INAH 耐性菌の感性復帰を相当数に観察しているが、本実験の範囲では INAH 単独及び INAH と各種薬剤併用の場合共に感性復帰を認める事は出来ず、又試験管内増殖能力も低下を示していない。INAH-PAS 及び INAH-OM 併用では第 6 代迄協力作用を認め、INAH 耐性の進展をも阻止した事は特長ある事と考える。

定量培養に依る耐性分布を考察するに、宮本・上野<sup>9)</sup>は 3 種併用、2 種併用、単独使用のうち INAH が関与するいずれの場合でもそのような薬剤含有培地環境において継代された結核菌の INAH 耐性の読みは KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地と Kirchner 培地とで異なる事を発表しているが、本実験では両者の読みは大体並行している様に思う。SM 併用の場合 SM 耐性菌の出現、増加は極めて著明であり、PAS 又は OM 併用では共に INAH 弱耐性菌 (0.1 及び 1.0  $\gamma$ /ml)、中等度耐性菌 (10 $\gamma$ /ml) は継代に依り夫々その出現率 (%) が増加しているが、高度耐性菌 (100  $\gamma$ /ml) の出現を見ていない事に特長があると思う。

## 結 論

INAH 耐性人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を INAH 単独及び INAH と SM, PAS 又は OM 併用加 Kirchner 培地に継代培養 (6 代) して各薬剤の併用効果を検討し、併せて 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地を用い継代株の耐性分布を比較した結果、次の結論を得た。

1. INAH 単独継代では INAH 耐性の上昇を認めた。
2. 併用に依る発育阻止力の増強は INAH-OM, INAH-PAS 併用の際に著明で INAH-SM 併用では前 2 者に比し乏しかつた。

## 文 献

- 1) 早川晋：金大結研年報，13 (中)，123，1955。
- 2) 早川晋：金大結研年報，13 (中)，131，1955。

3. INAH-SM 併用では僅か乍ら INAH 耐性の上昇を示し、又 SM に対する耐性獲得は著明で、SM 弱耐性菌 (3 及び 10 $\gamma$ /ml) は第 3 代迄に出現、その後著増し、第 5 代では SM 100 $\gamma$ /ml 耐性菌の出現を見た。INAH-PAS 又は INAH-OM 併用に依り INAH 耐性の進展を阻止し、INAH 0.1 及び 1.0 $\gamma$ /ml 耐性菌は継代に依り増加するが、INAH 100  $\gamma$ /ml 耐性菌の出現を見なかつた。又 PAS に対する耐性獲得は弱く、OM に対しては耐性獲得を認めなかつた。

- 3) 英 軒：金大結研年報，13 (上)，57，1955。
- 4) 小川辰次：結核菌検索の基礎と応用，223。

1953. 5) 宮本泰, 上野一恵: 結核, 30 (11), 659, 1955. 6) 小沢敦: 日本細菌学雑誌, 10 (1), 73, 1955. 7) 芦野芳久: 抗酸菌病研究雑誌, 8 (4), 238, 1953. 8) 上野高正: 日本細菌学雑誌, 9 (11), 909, 1954. 9) 日比野進, 他: 日本臨床結核, 12 (2), 96, 1953.

10) 英軒: 金大結研年報, 12 (下), 27, 1954. 11) 小酒井望, 他: 結核, 29 (1), 6, 1954. 12) 君野徹三: 最新医学, 9 (2), 21, 1954. 13) 坂井俊道: 十全医学会雑誌, 56 (1), 23, 1954.

第1表 INAH 単独継代に依る INAH 耐性の推移 (INAH 耐性 H<sub>2</sub> 株)

代	INAH r/ml									
	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	Cont.
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

註 { ○: 継代株  
●: 定量培養株

第2表 INAH-SM 併用実験

代	※ INAH ※	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	125	Cont.
1	1.56	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2	3.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	3.125	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	1.56	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	6.25	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	3.125	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	1.56	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5	25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3.125	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	100	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	50	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

註 ※薬剤の種類と培地中の含量 r/ml を示す  
□ は併用効果を示す

第3表 INAH-PAS 併用実験

代	※ INAH		400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	Cont.
	※ PAS										
1	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
	0.39	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
2	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	0.09	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	+	+	+	+	⊕	⊕
3	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	0.39	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	-	+	+	+	+	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	+	+	+	+	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	+	+	+	+	⊕	⊕
4	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
5	3.125	-	-	-	-	⊕	+	+	+	+	+
	1.56	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	-	+	±	+	+	+	+
	0.39	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
6	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.125	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	1.56	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Cont.	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

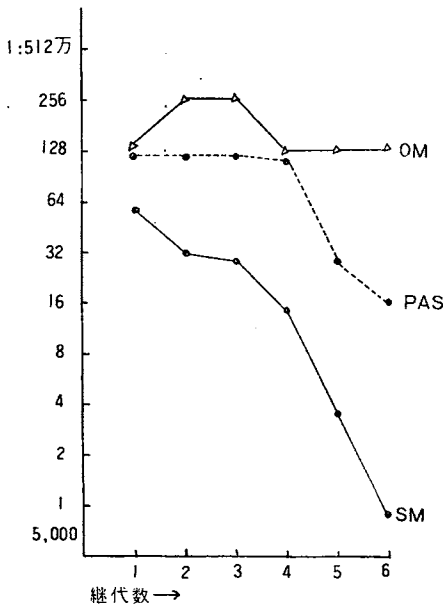
第4表 INAH-OM 併用実験

代	※ INAH		400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	Cont.
	※ OM										
1	0.78	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	0.19	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
2	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.19	-	-	-	-	-	+	+	+	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
3	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.09	-	-	-	-	-	-	+	+	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕
4	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0.19	-	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	-	+	+	+	+	⊕
	Cont.	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
5	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.19	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
6	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕
	0.09	-	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕
	Cont.	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

第5表 各種継代株の耐性培地に於ける発生集落数

培養条件	薬剤含有量 (r/ml)	継代数			
		1	3	5	
INAH 単独 継代	INAH {	1000	0	0	0
		100	0	0	14(29.1)
		10	65(74.7)*	38(77.5)	37(75.4)
		1.0	80(90.6)	44(89.7)	41(85.4)
		0.1	82(93.1)	47(95.9)	47(97.9)
	SM {	100	0	0	0
		10	0	0	0
		3	0	0	0
	PAS {	100	0	0	0
		10	0	0	0
		1.0	0	0	0
	OM {	100	0	0	0
		10	0	0	0
		1.0	0	0	0
	Cont.		87	49	48

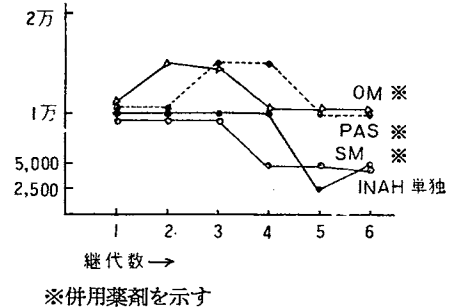
第1図 INAH-SM, INAH-PAS及びINAH-OM併用継代時のSM, PAS又はOMの最少発育阻止濃度  
SM, PAS, OM 稀釈倍数



INAH-SM 併用 継代	INAH {	1000	0	0	0
		100	0	0	12(9.6)
		10	65(74.7)	89(73.5)	93(75.0)
		1.0	80(91.9)	118(97.5)	120(97.5)
		0.1	81(93.1)	118(97.5)	121(97.5)
	SM {	100	0	0	36(29.0)
		10	0	29(23.9)	91(73.3)
		3	32(36.7)	68(56.7)	96(77.4)
	Cont.		87	121	124
	INAH-PAS 併用 継代	INAH {	1000	0	0
100			0	0	0
10			36(66.6)	74(76.2)	69(78.4)
1.0			47(87.0)	90(92.7)	84(95.5)
0.1			50(92.5)	94(96.9)	84(95.5)
PAS {		100	0	0	0
		10	0	0	0
		1.0	0	0	39(44.3)
Cont.		54	97	88	
INAH-OM 併用 継代		INAH {	1000	0	0
	100		0	0	0
	10		62(66.6)	81(71.0)	94(74.0)
	1.0		74(79.5)	95(83.3)	113(88.9)
	0.1		81(87.0)	99(86.8)	117(92.1)
	OM {	100	0	0	0
		10	0	0	0
		1.0	0	0	0
	Cont.		93	114	127

\* ( )内は対照の集落数に対する%を表わす。

第2図 各種併用継代時のINAH耐性の推移  
INAH 稀釈倍数



\*併用薬剤を示す