

# 細菌の薬剤耐性に関する研究

## 第 2 報

### 結核菌の INAH 耐性に就いて

#### 第 2 編 結核菌の INAH 耐性化とその復元についての試験管内実験

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

英

軒

（受付：昭和30年2月1日）

**Takashi HANABUSA** : STUDIES ON THE RESISTANCE OF MICROORGANISMS AGAINST VARIOUS KINDS OF CHEMICALS  
Part 2. Studies on the Resistance of Tubercle Bacilli against INAH  
No. 2. Development of the INAH-resistant Tubercle Bacilli and Restoration of the INAH-sensitivity in Vitro

*Department of Bacteriology and Immunology, Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa University.*

*(Director : Prof. Masamichi KAKISHITA)*

*(Received for publication : Feb. 1, 1955.)*

## 緒 言

私は先に結核患者に於いて、INAH 単独及び他抗結核剤との併用療法時に於ける喀痰結核菌の INAH 耐性獲得状態を比較検討し、又その感性復帰について観察し、薬剤使用法によつて耐性出現に遅速のあることを確認すると共に、一度出現した耐性菌もある期間の休薬によつて感性に復帰することを確認した<sup>(1)</sup>。患者を通して

行われるこれらの現象には生体反応としての各種の条件が加わるので、今回は INAH 耐性獲得、感性復帰の問題を試験管内に於いて菌と薬剤のみの関係から観察し、併せて INAH 耐性菌の他抗結核剤に対する感受性其の他 2~3 の生物学的性状について観察したので此処に報告、御批判を仰ぎ度いと思う。

### 1) 継代培養による耐性獲得試験

#### 実 験 方 法

##### 1) 使用基本培地

10%血清加 Kirchner 培地

##### 2) 使用菌株

人型結核菌 H<sub>2</sub>株

##### 3) 薬剤希釈液の調製法

INAH の各 10mg を 70% Alcohol 10ml に溶解して標準液 (1,000 倍希釈液, 1mg/ml) とし, OM, PAS も同様に調製した。

##### 4) 菌浮游液の調製法

1代目は Kirchner 培地に移植せし菌を、約 2 週間培養した後、之に 6~7 個の滅菌硝子球を入れ、充分振盪 (約 30 分) したる後そのまま約 2 時間垂直に静置しその上澄液を使用菌液とした。

2代目からは逐次的に抗結核剤を混入せし培地に 4 週間培養したる後充分菌の發育せる INAH 含有最大濃度の試験管 (發育限界濃度) に 3~2 個の滅菌硝子球を入れ前と同様にして菌浮游液を作つた。

##### 5) 術 式

単独継代培養には1本目には3.6ml, 2本目以下2 ml の Kirchner 培地を分注した小試験管の系列を作り, その1本目には INAH 規準液0.4ml を入れ之より順次倍々希釈を行ひ, 尚各列毎に INAH を含まぬ対照 Kirchner 培地を1本置いた。  
併用継代培養には OM128万, 256万512万倍, PAS 64万, 128万256万倍等発育限界附近の濃度を含有せしめた Kirchner 培地を基本にし単独培養と同様にして INAH 倍々希釈培地を作った。尚OM, PAS, INAH 含有のみの対照並びに薬剤の含まぬ対照を置いた。

継代は4週間後充分菌の発育せるとき, その発育限界濃度の試験管より次々移植した。

6) 成績判定

1週間毎に菌の発育状態を観察し, 4週目を以て最終判定とした。

実験成績

INAH 単独継代培養の成績は第1表の如く, 1代では256万倍迄発育し, 2代では8万倍, 3代では4万倍と急速に耐性は上昇し, 4代では1万倍迄発育するに至つた。

第 1 表 INAH 単独による継代培養成績

継代回数 稀釈培地	I				II				III				IV			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1: 10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1: 20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1: 40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	++
1: 80,000	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	++	++
1: 160,000	-	-	-	-	-	+	+	+	±	+	+	++	+	++	++	++
1: 320,000	-	-	-	-	+	+	+	++	+	+	++	++	+	++	++	++
1: 640,000	-	-	-	-	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
1: 1,280,000	-	-	-	-	+	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
1: 2,560,000	-	-	-	+	++	++	++	++								
1: 5,120,000	-	-	+	+	++	++	++	++								
1:10,240,000	-	+	+	++	++	++	++	++								
1:20,480,000	+	+	++	++	++	++	++	++								
対 照	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

INAH, OM 併用による継代培養は第2表の如く, 1代ではOM 512万倍の濃度では INAH 1,024 万倍で, OM 256 万倍以上では INAH 2,048 万倍でも 発育を見なかつたが, 4代では OM 512万倍では 8 万倍, 256万倍では32万倍で発育した。  
INAH, PAS併用は第3表の如く, 1代では PAS256万倍では INAH 512万倍に発育し, 256 万倍以上では INAH 2,048万倍でも発育が見ら

れなかつたが, 4代では PAS 256万倍で 8 万倍, 128万倍では64万倍で発育した。  
INAH, OM 併用を INAH 単独と比較するとOM 併用4代では, OM 512万倍ではINAH 単独の3代目と同様な成績を示し, 256万倍では2代目と同様な成績を示し, 相当の耐性獲得遅延を認めた。  
INAH, PAS も OM 併用と同じ様な成績を得た。

第 2 表 INAH, OM 併用による継代培養成績

OM 稀釈倍数	I					II					III					IV			
	1: 1,280,000	1: 2,560,000	1: 5,120,000	INAH 対照		1: 1,280,000	1: 2,560,000	1: 5,120,000	INAH 対照		1: 1,280,000	1: 2,560,000	1: 5,120,000	INAH 対照		1: 1,280,000	1: 2,560,000	1: 5,120,000	INAH 対照
INAH 稀釈倍数																			
1: 10,000	-	-	-	-		↓	-	-	-		↓	-	-	-		↓	-	-	+
1: 20,000	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	+
1: 40,000	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-		-	+	+	+
1: 80,000	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	+		-	+	+	+
1: 160,000	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	+		-	+	+	+
1: 320,000	-	-	-	-		-	-	-	+		-	-	+	++		++	++	++	++
1: 640,000	-	-	-	-		-	-	-	+		-	-	+	++		++	++	++	++
1: 1,280,000	-	-	-	-		-	-	-	+		-	-	+	++		++	++	++	++
1: 2,560,000	-	-	-	+		-	-	+	++		-	+	++	++		++	++	++	++
1: 5,120,000	-	-	-	+		-	-	+	++		-	+	++	++		++	++	++	++
1:10,240,000	-	-	+	++		-	-	+	++		-	+	++	++		-	++	++	++
1:20,480,000	-	-	+	++		-	+	++	++		-	++	++	++		-	++	++	++
OM 対照	-	++	++	++		-	++	++	++		-	++	++	++		-	++	++	++

第 3 表 INAH, PAS 併用による継代培養成績

継代回数		I				II				III				IV			
INAH 稀釈増数	PAS 稀釈増数	1: 640,000	1: 1,280,000	1: 2,560,000	INAH 対照	1: 640,000	1: 1,280,000	1: 2,560,000	INAH 対照	1: 640,000	1: 1,280,000	1: 2,560,000	INAH 対照	1: 640,000	1: 1,280,000	1: 2,560,000	INAH 対照
1: 10,000	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	+
1: 20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1: 40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1: 80,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
1: 160,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++
1: 320,000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++	-	+	++	++
1: 640,000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++	-	+	++	++
1: 1,280,000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	++	++	-	+	++	++
1: 2,560,000	-	-	-	+	+	-	-	+	++	-	+	++	++	-	+	++	++
1: 5,120,000	-	-	+	+	-	-	-	++	++	-	+	++	++	-	++	++	++
1:10,240,000	-	-	++	++	-	-	+	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++
1:20,480,000	-	-	++	++	-	-	+	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++
PAS 対照	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++

## 2) 試験管内に於ける INAH 耐性菌の感性復帰実験

### 実 験 方 法

#### 1) 使用耐性菌株

先に才1編に於いて得た結核患者より得た耐性菌13株と試験管内継代培養によるH<sub>2</sub>耐性株を使用した。

#### 2) 測定術式

上記耐性菌を Kirchner 培地に3週間毎に植え次ぎ、3代目毎に INAH を1γ, 10γ, 100γ/ml に含有する3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地に移植し耐性を測定した。

### 実 験 成 績

感性復帰の成績は第4表に於ける如く、3代では耐性に变化を示したものはなく、6代目では1γ耐性6例、10γ耐性7例、100γ耐性1例、9代目では感性に復帰した菌株は6例、1γ耐性7例、10γ耐性1例、12代では全部が感性となつた。

第 4 表 INAH 耐性菌の管内に於ける感性復帰試験成績

	3 代				6 代				9 代				12 代			
	0	1γ	10γ	100γ	0	1γ	10γ	100γ	0	1γ	10γ	100γ	0	1γ	10γ	100γ
H <sub>2</sub> 耐 性 菌	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	-	-	-
高 山	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	++	-	-	+++	-	-	-
土 井	+++	+++	+++	-	+++	++	-	-	+++	++	-	-	+++	-	-	-
尾 沢	+++	+++	+++	-	+++	++	-	-	+++	-	-	-				
木 下	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	-				
伊 藤	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	-
川 島	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	-
鞍 田	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	++	-	-	-				
保 科	+++	++	++	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	-				
早 瀬	+++	++	++	-	+++	++	++	-	+++	++	-	-	+++	-	-	-
大 田	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	-	+++	++	-	-	++	-	-	-
中 野	+++	+++	++	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	-				
村 本	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	-	-	-				
桜 町	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++	++	-	-	+++	-	-	-

## 3) INAH 耐性菌と感性菌の生物学的性状の比較実験

### 実 験 方 法

Kirchner 培地に发育せる4週間培養の INAH 耐性菌及び感性菌の塗沫標本各5枚を作り、Eiel-Helsen 染色法により菌長、ムツブ顆粒数を各100個宛数へ、Reis 法により抗煮沸性を検した。

### 実 験 成 績

成績は菌長の平均は耐性菌では、2.35μ, 感

性菌は2.72μで感性菌に比較して短かくなつてゐるが、中には特に長い長桿菌(3~4μ)の存在を認めた。

顆粒数の平均は耐性菌2.87個、感性菌は2.74個で差はなかつた。顆粒の大きさは耐性菌に於ては感性菌に比較してやや大きかつた。

煮沸試験では耐性菌は14', 感性菌は15'30"で感性菌より1'30"の短縮をみた。

## 4) INAH 耐性菌の各種抗結核剤に対する感受性

### 実 験 方 法

INAH 耐性菌 H<sub>2</sub>株に対する各種抗結核剤の发育阻

止力を才1項の方法により比較実験した。

### 実 験 成 績

OM に対する INAH 耐性菌の感受性は第5表に示す如く、感性菌と同様 128 万倍で発育阻止せられた。

第5表 INAH 耐性菌の OM に対する感受性の成績

週 稀釈倍数	I	II	III	IV
1: 10,000	-	-	-	-
1: 20,000	-	-	-	-
1: 40,000	-	-	-	-
1: 80,000	-	-	-	-
1: 160,000	-	-	-	-
1: 320,000	-	-	-	-
1: 640,000	-	-	-	-
1: 1,280,000	-	-	-	-
1: 2,560,000	+	+	++	++
1: 5,120,000	+	+	++	++
1:10,240,000	++	++	+++	+++
対 照	++	++	+++	+++

PAS に対する感受性も 128 万倍で発育阻止せられた。

第6表 INAH 耐性菌の PAS に対する感受性の成績

週 稀釈倍数	I	II	III	IV
1: 10,000	-	-	-	-
1: 20,000	-	-	-	-
1: 40,000	-	-	-	-
1: 80,000	-	-	-	-
1: 160,000	-	-	-	-
1: 320,000	-	-	-	-
1: 640,000	-	-	-	-
1: 1,280,000	-	-	-	-
1: 2,560,000	±	±	+	++
1: 5,120,000	+	+	++	+++
1:10,240,000	++	++	+++	+++
対 照	++	+++	+++	+++

## 総

## 括

1) 試験管内実験に依り抗結核剤の併用による耐性出現の有無並に遅速に関しては比較的その報告は少いが、Middlebrook<sup>(2)</sup> は SM, INAH の混合液は牛型菌の耐性出現を防止するものらしいといい、又 Rist et Grumbach<sup>(3)</sup> は Dubos 培地で人型菌に就て PAS, SM は INAH 耐性菌の出現を抑え又逆に PAS, SM 耐性菌の出現をも抑制されると云っている。

私の実験に於ても INAH + OM, INAH + PAS 等が、INAH 耐性獲得遅延に相当の効果を及ぼすのを知る事が出来た。

2) INAH 耐性菌の感性復帰に関して管内試験に於いて Knox<sup>(4)</sup> は 2 週間培養で数代継代しても感性にならなかつたといっている。小川<sup>(5)</sup> は管内、体内何れに於いても現在のところ耐性の減弱はみとめられず PAS より耐性が減弱しにくい事は確実であろうと云つて居る。

一方 Magarett Barnett ら<sup>(6)</sup> は患者から得た 20 株について間接法に於て、初代と 3 代

について耐性を選べたが、耐性菌 16 株のうち 6 株がかなり耐性低下し、耐性軽度なるもの程耐性が安定している様であると云い、又菊地等<sup>(7)</sup> は INAH 耐性獲得した肺結核患者 29 例について INAH 投薬中止後 6 ヶ月迄に 22 例 75.9% が耐性消失したと云っている。

この様にその結果は必ずしも一致せず感性復帰を可能とするもの、又困難と云うもの等区々である。

私の研究に於いては 9 代で 6 例、12 代で 8 例全部が感性に帰つたことは結核菌の INAH に対する興味ある特性と云う事が出来る。

3) INAH 耐性菌の生物学的変化については、馬場<sup>(8)</sup> は H<sub>37</sub>RV を使用した試験管内実験では、INAH 濃度の増加につれて菌長の短縮、顆粒数の増加、抗煮沸性の減弱を示したといっている。

私の実験に於いても INAH 耐性菌の菌長は短縮し、抗煮沸性は減弱したが、顆粒数はあま

り増加して居なかつた。

4) INAH 耐性菌の他抗結核剤に対する感受

性は SM, PAS 耐性菌に於ける如く感受性に変化はなかつた。

## 結

## 論

1) 管内実験によると, INAH と OM 又は PAS との併用による結核菌の INAH 耐性獲得は, 単独作用時よりも相当遅延した。

2) INAH 耐性菌 14 株の管内継代培養に於て, 9 代目には 6 例, 12 代目迄には全部感性に復帰した。

3) 耐性菌の生物学的変化をみると菌長は短縮し, 抗煮沸性が減弱したが, 顆粒数の増加は著明でなかつた。

4) INAH 耐性菌の PAS 並びに OM に対する感受性には変化を認めなかつた。

## 文

## 献

1) 英軒 : 金大結核年報, 12(下), 27, 1954. 2) Middlebrook, G. : Am. Rev. tuberc., 65(6), 754, 1952. 3) Rest, N. and Grunbach, F. : Rev. tuberc., Tome 16, 665, 1952. 4) Knox, R., et al. : Lancet, 6740, 854, 1952. 5) 小川政敏, 他:

日本医事新報, 1509, 9, 1953. 6) Barnett, M., et al. ; Lancet, 6755, 314, 1953. 7) 菊地一郎, 他 : 結核の臨床, 2 (9), 53, 1954. 8) 馬場真 : 医療, 8 (3), 19, 1954.

## Summary

Using the laboratory stock strain "H<sub>2</sub>" of human type tubercle bacilli, the following four series of experiments were carried out in vitro to investigate changes in INAH-sensitivity of bacilli.

- I. Successive exposure of the bacilli to INAH and PAS
- II. Successive exposure of the bacilli to INAH and o-aminophenol (OM)
- III. Successive exposure of the bacilli to INAH alone
- IV. Successive culture of the INAH-resistant bacilli in culture media containing no drug

It was observed:

- 1) INAH-resistant bacilli appeared in Experiment III in definitely earlier stages of successive exposure cultures than in Experiments I and II. On the other hand, all these INAH-resistant bacilli were proved to be highly sensitive to both agents, PAS and OM.
- 2) In Experiment IV, among the 14 strains which acquired INAH-resistance during successive exposure cultures 3 became sensitive to INAH in the 9th successive culture in drug-free media and the rest restored INAH-sensitivity not later than the 12th successive culture.
- 3) As to the biological properties of INAH-resistant bacilli, shortness of the bacillary body and lowered acid-fastness were observed.