人型結核菌 H 37 Rv 株の Streptomycin 及び Isoniazid に対する耐性獲得の機作について

第 7 報 Isoniazid 微量含有培地継代による耐性上昇について

田 中 完 巳

東京大学医学部細菌学教室 (指導 秋葉教授)

[受付: 3 月 3 日・1958 年]

著者は第 1 報¹⁾において、resting cell における Streptomycin (以下 SM と略す) および Isoniazid (以下 INAH と略す) に対する耐性菌の出現について検討し、SM においては耐性菌の増加を認めて、SM の inducing action が考えられることをのべ、INAH においては耐性菌の増加は認められず、INAH の inducing action は認められなかつたことを報告した。本報においては inducing effect の存在を検討するもう 1 つの方法と考えられる微量接触法により実験を行つた。此の方法を使用する SM に対する耐性上昇の機作についての報告は、割合に多数認められるのであるが、INAH を使用した報告は少く、特に国外には殆んどその例を見ないが、国内においては、君野²⁾、伊藤³⁾、牛場⁴⁾等の報告があり、君野は耐性上昇を認めなかつたとし、伊藤は人型菌 Frankfurt 株で発育阻止濃度以下の INAH 含有液体培地培養で高耐性菌の出現を認め、又牛場は M. 607 株で阻止濃度においてのみ高耐性菌の増殖を認め、感性菌は著減しているため、selection で説明出来るとしている。著者は液体培地における INAH の人型結核菌に対する最低発育阻止濃度の約 $\frac{1}{10}$ である 0.005 γ /cc に、H 37 Rv 株を長期間接触させる目的で、その間の条件の変化、特に薬剤濃度の変動を防ぐ為に、INAH 0.005 γ /cc 含有培地に長期間継代して、各代毎に耐性度を測定して、耐性上昇を検討した。

実験材料及び実験方法

INAH は Sumifon (住友化学工業 K.K.) をそのつど滅菌蒸留水に溶解して使用した。使用菌株は教室保存の人型結核菌 H 37 Rv 株で、培地は第 1 報¹⁾にのべた Tween 培地を主として使用し、耐性度測定および生菌単位計算には 1% 小川培地を使用した。又 Tween 培地に

$\frac{1}{10}$ 容の栄研 Albumin を加えて Tween Albumin 培地として使用し、Albumin 寒天培地としては Tween 80 を除いた Tween 培地原液に粉末寒天を 1% 栄研 Albumin を $\frac{1}{10}$ 容添加して斜面培地とし使用した。培地への薬剤添加は全て無菌的に記載量添加した。培養は液体培地では 37°C 2 週間を 1 代とし、固型培地では 37°C 4 週間を 1 代とし、耐性度測定および生菌単位測定は 4 週間培養の結果を参考として 8 週間培養の結果を最終結果とした。

実験 1

H 37 Rv 株の INAH に対する distribution の詳細は第 1 報¹⁾にのべた通りであるが、更に低濃度の場合について検討すると、第 1 図、第 1 表の如く、0.005 γ /cc では発生する集落数が、対照の 0 γ /cc の場合と殆んど同様で、0.01 γ /cc では若干減少し、0.1 γ /cc では著減して、1 γ /cc、10 γ /cc の場合に近い数値を示し、100 γ /cc では 1 以下で、1000 γ /cc では 0 である。従つて、INAH 0.005 γ /cc の小川培地中における存在は、被検菌の発育に無影響であると考えられる。尚、1000 γ /cc で 0 であつた点について、更に検討する為に、小川培地で増量継代して INAH に耐性を獲得せしめた 3 株を、東京女子医科大学の平野教授から分与を受け、又同時に INAH 100 γ /cc 含有培地に発生した集落 2 個を Tween 培地で増菌した 1 株、および INAH 1 γ /cc 含有小川培地

TANAKA Sadami: On the Mechanism of Acquisition of Streptomycin and Isoniazid-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* var *hominis*, Strain H 37 Rv. VII. The Development of Drug-resistance by Serial Subcultures in Media Containing Small and Fixed Amount of Isoniazid, Department of Bacteriology, School of Medicine Unevesity of Tokyo. — Jap. J. Bact. 13 (9), 781-786, 1952.

第1図, 第1表 H 37 Rv 株の INAH に対する菌分布曲線

実数は菌液 0.1 cc 当りの発生集落数

に発生した多数の集落を混合して, 1 γ/cc の INAH 含有 Tween 培地および INAH を含まない Tween 培地で29代継代した株について耐性分布を測定すると, 6株共に 1000 γ/cc 含有小川培地上には1個の集落も発生せず, この点は, その distribution curve が途中 (0.1 γ/cc~10 γ/cc) で水平に近い部分を持っている点と共に, SMに対する distribution curve (第1¹⁾, 2報²⁾ 参

第3表 H 37 Rv 原株, INAH 微量接触耐性獲得 SM, INAH 二重耐性株の発育に及ぼす INAH 0.005 γ/cc の影響 (比濁計による Optical density)

菌 株	H 37 Rv		INAH-R		INAH. SM-R	
	0	0.005	0	0.005	0	0.005
培養	0	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
	1	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04
	2	0.12	0.13	0.11	0.14	0.11
	3	0.20	0.21	0.20	0.23	0.20
	5	0.37	0.39	0.37	0.42	0.37
	6	0.43	0.46	0.45	0.50	0.45
	7	0.47	0.51	0.50	0.56	0.53
	8	0.51	0.56	0.54	0.62	0.56
	9	0.55	0.61	0.58	0.67	0.62
	10日	0.59	0.65	0.63	0.69	0.64

INAH-R: INAH 0.005 γ/cc 含有 Tween 培地46代継代後, INAH なしの培地に29代継代した株。

INAH. SM-R: 二重耐性菌13代継代株(薬剤なし)

照)と明かに異なる点と考えられた。又 INAH 1 γ/cc 含有小川培地で分離した resistant cell の多数集落混合菌株は, 29代継代して, 継代培地中に INAH が存在しても, 存在しなくても耐性度の変化は認められなかった。

実験 2

第2表 Isoniazid 高度耐性株の耐性度

耐性株	Isoniazid conc. mcg/ml					
	0	1	10	100	500	1000
RvR-IN	9×10^4	4×10^4	15×10^4	$ca. 10^2 \times 10^2$	+※	0
小林 R-IN	17×10^4	18×10^4	15×10^4	$ca. 10^2 \times 10^2$	+※	0
三枝 R-IN	6×10^4	5×10^4	0×10^2	54	+※	0
RvIN 100	+	+	+	+	0	0
IN 1.1	25×10^6	/	27×10^6	$+ \times 10^2$	/	0
IN 1.0	10×10^6	/	34×10^6	$+ \times 10^2$	/	0

INI. 1 INI. 0: INAH 1 γ/cc resistant cell 混合株29代継代株。

RvR-IN: H 37 Rv を INAH を含む小川培地で増量継代した株。

小林 R-IN
三枝 R-IN: 患者よりの分離株について INAH 含有小川培地で増量継代した株

RvIN 100: INAH 0.005 mcg 含有 Tween 培地で13代継代し INAH 100 mcg 含有小川培地に6w.以降発生した2個の集落

※ 非常に小さい多数の colonie で 10^{-2} に希釈して接種した場合には colonie 発生せず

実験1において、小川培地による生菌単位測定の結果から、INAH 0.005 γ /cc は被検菌の発育に影響を与えないと考えられたが、その影響を更に検討する為に、比濁計を使用して H 37 Rv 株、微量接触による耐性上昇株 (INAH-R) および INAH SM 二重耐性株 (INAH SM-R) の発育に対する INAH 0.005 γ /cc の影響を Tween 培地中で検討した結果、第3表に示す如く、一般に INAH 0.005 γ /cc の存在は、被検菌の発育を少しく促進するとき結果を得た。しかし、各菌株間の比較では、本実験においては原株の H 37 Rv より二重耐性菌の方が、INAH が存在しない場合には発育が早いように認められるが、後報の実験に示す如く、実際に混合した場合には原株の方が早いのであつて、又 H 37 Rv と INAH-R を混合すると、第3表の結果と同様に INAH-R の方が発育が早いようである。このように、各菌株を別個に比濁計で発育を比較した場合と、実際に各菌株を混合した場合では異なるものと考えられるが、一応、INAH 0.005 γ /cc 存在の際には3株とも殆んど同様な発育速度を示し、INAH 0.005 γ /cc 存在が、耐性菌の発育を撰択的に促進したり、又は感性菌の発育のみを抑制するといふ。積極的な証拠は認められなかつた。

実験 3

実験1および2によつて被検菌の発育に阻止的な影響を与えないのみならず、むしろ発育促進的な濃度と考え

第2図 INAH 0.005 γ /cc 含有 Tween 培地継代による耐性上昇

られる INAH 0.005 γ /cc を含有する2本の試験管の Tween 培地に、2週間毎に継代し (接種菌量は培地 5 cc に対して 0.1 cc), 任意の1本から次代に継代した。耐性分布の推移は第4表および第2図の如く。対照原株の distribution は第1報にのべた平均値を示した。継代

第4表 INAH 0.005 mcg/ml 含有 Tween 培地継代による耐性上昇の経過

継代数	Isoniazid conc. mcg/ml				
	0	1	10	100	1000
原株	46.7×10^6	82.5	46.8	0.33	0
12	38×10^6	49	21	0	0
20	83×10^6	42×10^2	61×10^2	0	0
23	17×10^6	7×10^2	7×10^2	0	0
27	45×10^6	0×10^2	155	33	0
31	53×10^6	43	18	1	0
36	80×10^6	$ca. 10^3 \times 10^2$	$ca. 10^2 \times 10^2$	$ca. 10^3$	0
39	26×10^6	$ca. 10^2 \times 10^4$	$ca. 10^2 \times 10^4$	9×10^2	0
40	10×10^6	8×10^6	11×10^6	30×10^2	0
43	57×10^6	4×10^6	1×10^6	14×10^2	0
47	15×10^6	0×10^6	0×10^6	33×10^2	0
49	50×10^6	4×10^6	0×10^6	136×10^2	0
56	52×10^6	—	0×10^6	9×10^2	0
63	88×10^6	3×10^6	0×10^6	0×10^2	0
65	24×10^6	43×10^4	0×10^4	0×10^2	0
73	41×10^6	6×10^6	6×10^2	0	0

実数は菌液 0.1 cc 接種による発生集落数

第3図 INAH 微量接触による耐性上昇後の耐性下降

毎の耐性度は、17代目にやゝ耐性の上昇を認め、20代目には中等度の耐性上昇を認めたのであるが、24代目に孵卵器の故障の為に死滅したので、23代目から薬剤無添加小川培地に4週間培養した菌をINAH 0.005 γ/cc含有する Tween 培地で再び継代して23代目とし、以後同様に継代を続けたが、81代目まで耐性度の下降が認めら

第6表 INAH 0.005 γ/cc 含有培地継代による影響

菌株	INAH conc. γ/cc				
	0	1	10	100	1000
AK 41	1×10^6	3	3	0	0
AIN 41	1×10^6	3	0	0	0
寒天 12	45×10^6	0	0	0	0
小川 12	18×10^6	0	0	0	0
寒天 12	24×10^6	0	0	1	0
小川 12	16×10^6	0	0	0	0

AK: Albumin 加 Tween 培地 41 代継代
 AIN: INAH 0.005 γ/cc 含有 Tween Albumin 培地 41 代継代
 寒天: Albumin 加寒天斜面 12 代継代
 小川: 1% 小川培地 12 代継代
 □: INAH 0.005 γ/cc 含有寒天斜面又は小川培地 12 代継代

れ、原株の distribution と殆んど一致した。その後耐性分布は再び上昇を始め、39~40 代には殆んど 10 γ/cc 完全耐性を示した。

しかるに、更に継代が進むと、耐性分布は下降し、73 代目には第5表、第3図の如く、10 γ/cc および 100 γ/cc 含有小川培地に発育する耐性菌の数が著明に減少し、1 γ/cc 耐性菌の減少は著明でなく、0.1 γ/cc 耐性菌の数は対照の生菌単位数と同じで、0.1 γ/cc 完全耐性の di-

第5表 INAH 微量接触による耐性上昇後の耐性下降

総代 継数	I 含継 N 有代 A 増数 H 地	I 非継 N 含継 A 有代 H 増数	INAH conc γ/cc				
			0	0.1	1	10	100
49	49	／	50×10^6	／	4×10^6	0×10^6	136×10^2
	46	3	52×10^6	／	24×10^6	1×10^6	127×10^2
56	56	／	52×10^6	／	／	0×10^6	9×10^2
	46	10	53×10^6	／	／	0×10^6	5×10^2
73	73	／	41×10^6	53×10^6	6×10^6	6×10^2	0
	46	27	72×10^6	59×10^6	2×10^2	17×10^2	1
74	74	／	41×10^6	53×10^6	130×10^4	2×10^2	18
	46	28	72×10^6	59×10^6	3×10^6	0×10^4	1×10^2
77	77	／	87×10^6	79×10^6	5×10^6	6×10^2	7
	46	31	121×10^6	119×10^6	4×10^6	20×10^2	1
81	81	／	71×10^6	83×10^6	26×10^6	6×10^2	4
	46	35	107×10^6	108×10^6	30×10^6	1×10^2	3

実数は 0.1 cc 接種による発生集落数

strubution となった。そしてこの distribution は以後81代目まで変化なく、安定した状態と認められた。又継代途中、完全に耐性を獲得したと思われる46代目の菌を I NAH を含まない Tween 培地で同様に継代していつても、第5表の如く、INAH 0.005 γ /cc 含有 Tween 培地で継代した場合と同様に耐性度の下降が認められた。

実験 4

実験 3 においては、Tween 培地に I NAH 0.005 γ /cc 添加した培地で 40代前後継代して 10 γ /cc 完全耐性を獲得したことを認めたので、本実験においては、培地を変えて、実験材料の項にのべた Tween Albumin 培地、Albumin 寒天斜面および小川培地に I NAH を 0.005 γ /cc 添加して継代し、耐性分布の変動を検討した結果、第6表に示す如く、Tween Albumin 培地では41代目、Albumin 寒天斜面および小川培地では12代目(4週間1代)で夫々耐性分布の変動を認めなかつた。この培地の差による耐性上昇の差は、Tween Albumin 培地では、第1報にのべた如く、Tween 培地に比して生菌単位で約1桁低く、又それだけ菌の培地中均等度が悪い為と考えられ、固型培地でも菌と薬剤との接触条件の差、或は活性薬剤濃度の減少が大きい原因と考えられるが、寒天培地でも小川培地と同様に耐性上昇を示さなかつたことは、それが単純に加熱による I NAH 濃度の低下のみではないことも暗示していると考えられる。

考 察

I NAH に対する結核菌の耐性獲得の機作についての報告は国外には殆んど見当らず、国内においても少く、人型菌を使用して行つた実験は更に少い。そしてこれ等の報告の中で、恒量接触又は微量接触法で耐性上昇を認めた報告も、その機作についての更に詳しい検討は行つていず、発育阻止濃度以下の低濃度の接触で耐性が上昇したから、又恒量接触で耐性が上昇したから I NAH に inducing action があると報告し、又更に、selection の働く濃度で接触して耐性が上昇したのであるから induction ではないと単純に結論している。更には又、増量継代法で耐性獲得が急速に起る点のみから、induction が考えられるとしている。著者は、小川培地による生菌単位測定又は、比濁計による発育速度の検討から、発育阻害作用が認められないのみでなく、若干発育促進作用を示した I NAH の微量、0.005 γ /cc 含有培地に、長期間継代して I NAH に対する耐性上昇を認めたが、同じ条件で更に継代を続けると、1度獲得した耐性度が再び下降する事実を認めた。この事実が直ちに何を意味する

のかは不明であるが、発育阻害作用が認められない微量の I NAH の長期間接触によつて、耐性が上昇した事実を、直ちに I NAH の inducing action によると解釈するものではなく、その機作は、第2報⁹⁾以下第6報⁶⁾に到る SM についての報告の如く、更に検討を要する問題であつて、I NAH については後報に検討する。

次に実験 2 において、中等度耐性を獲得した23代目の株が、小川培地に4週間薬剤なしで培養した後は耐性分布の下降を示し、又、耐性上昇の経過が、第2図に示した如く、原株の distribution curve と殆んど平行して上昇および下降を示した事は興味ある事実で、この様な事が、一般の患者分離菌についても認められるならば、I NAH に対する耐性度は Meisoner⁷⁾、佐藤⁸⁾等^{9,10)}の報告のように、接種菌量を変えて耐性度を測定し、総生菌単位数に対する耐性菌の割合から耐性度を決定すべきものと考えられ、測定する薬剤の濃度は、0.1 γ /cc 又は1 γ /cc でも、10 γ /cc でも大差がないことが考えられる。被検菌の I NAH に対する distribution は、実験1又は第1報¹⁾にのべた如くであるが、1000 γ /cc の濃度に発育する集落は1個も認めることが出来なかつた。この点が SM に対する distribution と明かに異なることについては、第2報、第4報にのべたが、東村等¹¹⁾は cycloserine について同様のことを報告している。I NAH に inducing effect があるとする他の報告の中には、I NAH に対しての耐性獲得の速度の速い点をあげているものがある。然し、結核菌用液体培地は、一般細菌の液体培地と異り、一定以上の生菌数を接種して初めて発育を示すのが普通である(第1報参照)この事を考慮に入れて第2図の耐性上昇をみると、液体培地で耐性上昇を検討する場合には、一挙に10 γ /cc の耐性を獲得した如く認められても、それは徐々に増加した耐性菌の量が、一定以上に達して初めて発育を示したと考えられる可能性がある。原株の distribution にみる如く、0.1 γ /cc の resistant cell 数と、1, 10 γ /cc の resistant cell 数は接近してをり、一挙に高耐性を獲得した如く認められる恐れが充分考えられるから、急速的耐性上昇の故を以て、直ちに、inducing effect の存在を想像することは無理であると考えられる。次に I NAH 耐性菌は合成培地には発育しないか、又は発育し難いという Fisher¹²⁾等¹³⁾の報告があるが、著者は Albumin なしの Tween 培地継代で耐性上昇を認め、又 I NAH 高耐性菌の継代を支障なく行つた。此に反して Albumin 寒天培地、小川培地、および Albumin Tween 培地では、同様に実験しても耐性上昇の促進は勿論、耐性上昇の傾向も認められなかつた。

INH耐性菌の全てが Albumin その他を必要とするのではなく、Mitchison¹⁴⁾ の報告の如く、特に必要なものではないか、又は一部のINH耐性菌の中に、Albumin その他を必要とする株があるのであろう。

結 論

生菌単位測定および比濁計による発育の検討から、発育阻害が認められないのみでなく、若干発育促進作用を示したINHの微量 (0.005 γ /cc) を含む Tween 培地で、人型結核菌 H 37 Rv 株を長期間継代して、耐性分布上昇を認め、更に継代を続けると、INHを含む Tween 培地で継代しても、INHを含まない Tween 培地で継代しても、高耐性菌の減少すなわち、耐性の下降が認められた。しかし同様に Tween Albumin 培地、Albumin 寒天培地および小川培地で継代した場合には耐性上昇の傾向が認められなかった。なお H 37 Rv 株のINHに対する distribution と耐性上昇の経過から、INH耐性度の測定法について若干考察した。

INH耐性菌の分与を頂いた東京女子医科大学平野教授に深謝する。

なお本研究は文部省科学研究費の補助を得ておこなわれたものである。

文 献

- 1) 田中完已：日本細菌学雑誌，12-8，1957，675.
- 2) 君野徹三，他：J. Antibiotics Ser. B. 7-3，89-92. 1954.
- 3) 伊藤俊吉郎：京大結研紀要，3-2，120~130, 1955.
- 4) 牛場大蔵，他：結核，30-11，648-653，1955.
- 5) 田中完已：日本細菌学雑誌
- 6) 田中完已：第3報 日本細菌学雑誌，13，467，1958.
第4報 日本細菌学雑誌，13，687，1958.
第5報 日本細菌学雑誌，13，770-774，1958.
第6報 日本細菌学雑誌，13，775-780，1958.
- 7) G. Meissner： Beitr. Klin. Tub. 113-1，62-74，1955.
- 8) 佐藤直行：結核，30-3，119-122，1955.
- 9) Correspondence： Technique of drug resistance tests Am. Rev. Tuberc. 70-5，922-925，1954.
- 10) 小酒井望：結核，25-8，317，1950.
- 11) 束村道雄：Vito Nitti： 医学と生物学，43-3，79，1957，
- 12) Fisher, M. W.： Am. Rev. Tuberc. 66，626，1952.
- 13) Barnett, M., Bushby, S. R. & Mitchison, D. A.： Lancet, i, 314，1953.
- 14) Mitchison D. A.： Tubercle 35-7，170-172，