人型結核菌に対する諸種抗結核剤の試験管内作用について

III. 単独薬剤との接触による耐性発現

上 野 高 正

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

〔受付: 4月22日 1954年〕

緒 言

結核菌に試験管内で抗結核剤に対して耐性を付与するには、次第に高い薬剤濃度を有する培地に植継ぐ方法が採られて居る。即ち SM に関し Feldman¹⁾ 等が, INAH に関し Karlson²⁾ 等や Steenken³⁾ 等が報告している。著者は之等の方法とは別に、菌を種々の濃度の抗結核剤に長期間接触させる方法により DHSM, INAH, PAS, TBI に対する耐性付与に関する若干の検討を、抗結核剤の濃度、薬剤との接触期間等を変えて稍々系統的に試みたのでその成績を報告する。

実験方法

A) 薬剤との接触を 37°C で行つた場合

a) 得た集落をかき集めて耐性検査をした場合。1% KH_2PO_4 培地に 1~3 週培養した H 37 Rv 株を湿菌のまま秤量し、磨碎コルベンを用い手振法で蒸留水に 2~10 mg/cc に浮遊させ、その 0.1 cc を 5 cc 宛分注した 10% 馬血清含有 Kirchner 培地に接種し、更に所定濃度の 50 倍の DHSM, INAH の水溶液或は TBI の N/2 KOH 溶解液を 0.1 cc 宛加えて抗結核剤を含有させ、封蠟し 37°C に置く。この様にして数本の培地中で 37°C において菌を DHSM, INAH, TBI に接触させて置き、1 週毎に取出し 2200 回転/分 10 分遠心沈澱し、茲に得た沈渣を 5 cc の蒸留水で 2 回洗滌し、0.5 cc の蒸留水に手でよく振つて浮遊させ、その 0.1 cc 宛を 2~3 本の 1% KH_2PO_4 培地に接種し、斜面を動揺させて接種液を斜面全体に平等に行渡らせ、斜面台上に 1 夜 37°C に置き、封蠟後 37°C に培養した。この培地上に発育した集落を接種後 3~4 週後にかきあつめて湿菌のまま秤量し前同様にして 5 mg/cc の菌浮遊液を作製し、5 cc 宛分注した 10% 馬血清含有 Kirchner 培地に 0.1 cc 宛接種する。此際用いる Kirchner 培地に薬剤と接触させる為に用いたと同様にして DHSM は 1000, 100, 10, 1 r/cc, TBI, INAH では 100, 10, 1, 0.1 r/cc に

含有させ別に抗結核剤を加えぬ培地を対照とした。抗結核剤の各稀釈段階共培地 2 本宛を用い、3 週培養後に菌が発育を示した最高濃度を以て耐性を観察した。

b) 得た集落中の個々について耐性検査をした場合。H 37 株を用い前項同様に操作して DHSM, PAS は 1000, 100 r/cc, TBI は 200, 100 r/cc の濃度において 0.5~1 mg の菌を 10% 馬血清含有 Kirchner 培地中で 37°C に於いて之等抗結核剤に接触させる。1 週毎に分離水洗して得た沈渣を 1 cc の蒸留水に手で振つて浮遊させ、更にその 1 部を 10 倍稀釈し、之等 2 段階の稀釈菌浮遊液の 0.1 cc 宛を 2~3 本の 1% KH_2PO_4 培地に接種培養し個々に各集落が分離して発育する様にする。この様にして得た集落中の数個を集落毎に釣菌して夫々別々に他の 1% KH_2PO_4 培地に接種し増菌した後前項同様に耐性を検査した。

B) 薬剤との接触を 5°C で行つた場合。

清 H₁ 株 1 mg を用い A) 項 a) に述べた方法により DHSM 50 r に Kirchner 培地中で接触させる。但しこの際は前と異り培地の温度を 5°C に保つ。接触期間 3, 4, 5, 6, 7 週後に前述同様に分離水洗 1% KH_2PO_4 培地に接種 37°C に培養し得た集落をかき集めて DHSM 耐性を検査した。又別に DHSM を含まぬ Kirchner 培地について同様操作して対照とした。

C) 薬剤との接触を 2 段階に行つた場合

B) に述べたと同様にして 5°C で清 H₁ 株 1 mg を DHSM 50 r に接触させ、1 部は DHSM とは接触させずに 5°C に置き、3~5 週後分離水洗し 1% KH_2PO_4

UENO Takamasa: On the effect of antituberculosis agents on tubercle bacilli of human type in vitro. III On the appearance of resistant strain due to the influence of Single agent. Research Institute of Tuberculosis, Japan Antituberculosis Association. — Jap. J. of Bact., 9(10), 785-795, 1954.

培地に接種 37°C に培養し、得た集落をかきあつめ前同様にして 5mg/cc の蒸溜水浮游液を作り、その 0.1cc 宛を予め DHSM を 1000, 100, 10, 0r/cc を含む Kirchner 培地に接種し、37°C において第2回目の DHSM との接触を行い後 A) a) に述べたと同様に耐性を検査した。尙用いた Kirchner 培地の pH は 6.7 であるが TBI を加えた場合には溶解剤として用いた N/2 KOH の為 pH は 7.2 であつた。又この場合には対照にも N/2 KOH 0.1cc を加えて pH を調整した。

実験成績

1) DHSM について

A) 薬剤との接触を 37°C で行つた場合

a) 得た集落をかき集めて耐性検査をした場合。実験方法 A) a) の項で述べた方法によつて得た成績は第1表の通りである。即ち H37Rv 株 1mg を 100r の DHSM に接触させると 2 週より耐性発現の傾向が認められ、3 週には急に上昇して 1000r 以上の耐性となる。然し 4 週では 100r の耐性となり、5 週では全く耐性を示さない。尙此際接触後に 1% KH_2PO_4 培地上に得た集落数は 1, 2, 3 週では多いが 4, 5 週では少なかつた。0.2mg の菌を 10r の DHSM に接触させると 1% KH_2PO_4 培地上に得る集落数は減り方が早く、3 週及び 8 週に得た集落について著しい耐性の発現を示さなかつたが、1mg の菌を 10r に接触させた場合には 2 週に 100r の耐性が発現し 1mg 100r 接触の場合と同傾向を示した。0.2mg 1r の場合は著しい耐性の発現は認められないが 6 週以上では僅乍ら耐性上昇が認められた。

b) 得た集落中の個々について耐性検査をした場合。H37 株 1mg を用い実験方法 A) b) に従い集落毎の耐性を検査して得た成績は第2, 第3表の通りである。即ち第2表では 1000r に接触させると 2 週より耐性集落が認められ、2, 3 週では低い耐性を獲得していると思われるが、4, 5 週では検査したすべての集落が 1000r 以上の耐性を示し急激に高い耐性を発現して居る。100r に接触させると 2 週より耐性集落が現れ、3 週で 1000r 以上の集落が現れている。即ち接触 DHSM の濃度が 1000r でも 100r でも耐性発現に差は認められずいずれも 3~4 週で 1000r 以上の耐性集落が発現した。

第3表に示す実験では耐性集落の発現を認めなかつた。第2表の実験では接種菌量が 1mg であつて 1000r 接触第3週の他はいずれも 1% KH_2PO_4 培地上に多数の発育集落を得ているが、第3表の実験では接種菌量が

0.5mg であつて 100r 接触第1週の他はいずれも、又第2表の実験で高耐性の発現を認めた第3週以後は特に、1% KH_2PO_4 培地に少数の集落しか得て居ない事が原因となつていと思われこれと同様の関係が第1表の DHSM 10r 接触の接種菌量 1mg と 0.2mg の場合に現われている。

青山B株を用いた同様の実験では第4表の通り、4 週に得た集落中検査した 4 集落について 1000r 以上の耐性を示したものの 3 集落他の 1 集落は 100r 耐性を示し、他の週には耐性集落を認めなかつたが、耐性の現れ方については第2表に示したと同傾向を示している。

B) 薬剤との接触を 5°C で行つた場合

清 H₁ 株の 1mg を接種し実験方法 B) に従い 5°C において DHSM との接触を行つた成績は第5表の通り 7 週迄耐性の発現を認めなかつた。

C) 薬剤との接触を 2 段階に行つた場合

清 H₁ 株を用い実験方法 C) に述べた方法で第1段目は 5°C で第2段目は 37°C で DHSM と接触させた成績は第6表の通り 5°C で 50r の DHSM に接触させた事の有無は第2段目に 1000r 又は 100r の DHSM に 3 週接触させた際の耐性発現に影響を与えて居ないし、第2段の接触濃度が 1000r 及 100r より 10r の方が高耐性を発現しているが、この耐性発現についても第1段の接触期間が 3 週と 5 週で差がない。

2) PAS について

H37 株を用い実験方法 A) b) に述べた方法を用い発育した集落中の 1~9 集落をとり 2 代培養をした菌につき耐性を検査すると、第7表の通りである。即ち接触濃度が 1000, 100r いずれの場合も共に 7 週迄多くの発育集落を得たが、高耐性集落の発現は認められず、僅に 100r 接触 1, 2 週に 1r に発育する集落 3 個を見出したに過ぎぬ。

3) TBI について

a) 得た集落をかき集めて耐性検査をした場合。実験方法 A) a) に述べた方法により H37Rv 株を用いて得た成績は第8表の通りである。即ち 100r 及び 50r 接触では既に 1 週より 10r の耐性を示し、10r 接触では 3 週で 1r, 4 週で 10r の耐性を、1r 接触では 3 週で 1r, 5 週で 10r の耐性を示した。100r の耐性は 100r 接触 4 週に、50r, 10r 接触 5 週に認められたが、DHSM の場合の様に著明になることはなく 100r に漸く発育する程度以上のものは得られなかつた。尙 TBI については DHSM の場合の様に接触期間が長びくと共に耐性が現れ難くなる傾向は著明でない。即ち TBI に

第1表 H37 RV 株の DHSM との接触による耐性発現

(得た集落をかき集めて耐性検査をした成績)

接種菌量 mg	接触濃度 r/cc	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)										
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	0
1	100	1%培地上 の発育	冊	冊	冊	+ ₂₃	+ ₂₃		—		—		冊
		1000	—	—	冊	—	—						—
		100	—	—	冊	冊	—						—
		10	—	+ ₂	冊	冊	—						—
		1	—	+ ₁₀	冊	冊	—						+
		0	冊	冊	冊	冊	冊						冊
2	10	1%培地上 の発育			冊	冊	冊						冊
		1000			—	—	—						—
		100			—	—	—						—
		10			+	+	冊						—
		1			冊	冊	冊						+
		0			冊	冊	冊						冊
1	10	1%培地上 の発育	冊	+ ₁₈	+ ₁₁	—	—	—	—				冊
		1000	—	—	—								—
		100	—	+	—								—
		10	—	冊	—								—
		1	冊	冊	+								+
		0	冊	冊	冊								冊
0.2	10	1%培地上 の発育	+ ₄₉	+ ₁	+ _{7.5}	—	—		—	+ ₄	—		冊
		1000	—		—					—			—
		100	—		—					—			—
		10	—		—					+ ₁			—
		1	冊		冊					冊			+
		0	冊		冊					冊			冊
	1	1%培地上 の発育					冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
		1000					—	—	—	—	—	—	—
		100					—	—	—	—	—	—	—
		10					—	+	—	+	—	+	—
		1					+	+	冊	+	冊	冊	+
		0					冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

註 Kirchner 培地の発育

+ 管底に発育を認む (大なる集落数を附記す)

冊 液面に菌膜を認む

冊 菌膜液面の半ばを覆う

冊 菌膜液面を覆う

冊 菌膜管壁にのぼる

+ 発育集落数 50 以下 (集落数を附記す)

冊 " 50~100

冊 " 100~200

冊 " 200 以上

1%培地上の発育
(1% KH₂PO₄ 鶏卵培地上の発育)

第2表 H 37 株の DHSM との接触による耐性発現

(集落個々について耐性検査をした成績)

接 種 菌 量 1 mg

接触濃度 r/cc	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)				
		I	II	III	IV	V
1000	1% KH ₂ PO ₄ 培地上の発育	冊	冊	+ _{3,4}	冊	冊
	検 査 集 落 数	3	3	3	3	2
	1000				3	2
	333					
	111					
	37					
100	12.7					
	4.1		1			
	1.4	3	2	2		
	0.5			1		
	1% KH ₂ PO ₄ 培地上の発育	冊	+ ₄₂	冊	—	—
	検 査 集 落 数	3	5	3		
100	1000			2		
	333					
	111					
	37					
	12.7		1			
	4.1		2			
100	1.4	3	2			
	0.5			1		

註 欄中の数字は当該濃度の耐性を示す集落数を示す。

第3表 H 37 株と DHSM との接触による耐性発現

(集落個々について耐性検査した成績)

接 種 菌 量 0.5 mg

接触濃度 r/cc	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
1000	1%培地上の発育	+ ₄₀	+ ₂₂	+ ₂	+ _{0.3}	—	—	+ _{0.3}
	検 査 集 落 数	5	5	4	2			1
	1000							
	100							
	10							
	1	5	2	4	2			1
100	1>		3					
	1%培地上の発育	冊	+ ₃₅	+ ₁₀	+ ₅	+ _{0.3}	—	+ ₄
	検 査 集 落 数	4	2	5	5	1		4
	1000							
	100							
	10							
100	1	4	1	5	5	1		4
	1>		1					

第4表 青山B株とDHSMとの接触による耐性発現
(集落個々について耐性検査した成績)

接種菌量 1 mg

接触濃度 r/cc	耐性 r/cc	接 触 期 間 (週)						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
1000	1%培地上の発育	卅	+ _{26.5}	+ _{5.3}	+ ₇	+ _{0.5}	0	+ _{0.5}
	検査集落数	4	5	4	4	4	0	2
	1000 100 10 1	4	5	4	3 1	4		2

第5表 5°Cにおいて清H₁株とDHSMとの接触による耐性発現
(得た集落をかき集めて耐性検査をした成績)

接種菌量 1 mg

接触濃度 r/cc	耐性 r/cc	接 触 期 間 (週)					
		0	III	IV	V	VI	VII
50	生菌単位	185×10 ⁴	53×10 ⁴	72×10 ⁴	37×10 ⁴	46×10 ⁴	40×10 ⁴
	1000	—	—	—	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	+ ₃	—	—
	1	—	+	+ ₁	+	++	+
	0	卅	卅	卅	卅	卅	卅
0	生菌単位	185×10 ⁴	158×10 ⁴		65×10 ⁴	49×10 ⁴	110×10 ⁴
	1000	—	—		—	—	—
	100	—	—		—	—	—
	10	—	—		—	—	—
	1	+	+		+	—	+
	0	卅	卅		卅	—	卅

生菌単位は接種菌 1 mg より由来する発育集落数である

第6表 清H₁株とDHSMとの接触を5°C及び37°Cにおいて
2段階に行つた場合の耐性発現

接種菌量 mg	接 触 段階別	接 触 条 件							
1	第一段	接 触 温 度	5 °C						
		接 触 期 間 (週)	V		III	V		0	
		接 触 濃 度 r/cc	50			0		0	
		1%培地上の発育	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
0.5	第二段	接 触 温 度	37 °C						
		接 触 期 間 (週)	III		IV		III		0
		接 触 濃 度 r/cc	1000	100	10		1000	100	0
		1%培地上の発育	+ ₂₅	+ ₃₀	++	卅	卅	+ ₁₂	++
耐 性 r/cc		1000	—	—	+	+	++	—	—
		100	—	—	卅	卅	++	—	—
		10	—	—	卅	卅	卅	+	—
		1	++	++	卅	卅	卅	+	—
		0	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

第7表 H 37 株と PAS との接触による耐性発現

(集落個々について耐性検査した成績)

接 種 菌 量 0.5 mg

接触濃度 r/cc	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)					
		I	II	III	IV	V	VI
1000	1%培地上の発育		冊	冊	冊	冊	冊
	検 査 集 落 数		5	5	5	5	5
	100						
	10 1 1>		5	5	5	5	5
100	1%培地上の発育	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	検 査 集 落 数	9	5	8	1	3	5
	100						
	10 1 1>	2 7	1 4	8	1	3	5

第8表 H 37 RV 株と TBI との接触による耐性発現

(得た集落をかき集めて耐性検査した成績)

接種菌量 mg	接触濃度 r/cc	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)										
			I	II	III	IV	V	VI	VII	IIIX	IX	0	
1	100	1%培地上の発育	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊		冊	
		100	—			+7			—		—		
		10	冊			+			冊		—		
		1	冊			冊			冊		—		
		0.1	冊			冊			冊		冊		
		0	冊			冊			冊		冊		
0.2	50	1%培地上の発育	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊		冊	
		100	—	—	—	—	+10	—	—	—		—	
		10	+	+	+	+	冊	冊	+	冊		—	
		1	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	—	
		0.1	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
		0	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
0.2	10	1%培地上の発育	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊		冊	冊	
		100	—	—	—	—	+	—	—		—	—	
		10	—	—	—	冊	冊	冊	冊		+	—	
		1	—	冊	+	冊	冊	冊	冊	冊	冊	—	
		0.1	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
		0	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
0.2	1	1%培地上の発育	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
		100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		10	—	—	—	—	冊	冊	冊	冊	+	—	
		1	—	—	+	冊	冊	冊	冊	冊	冊	—	
		0.1	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
		0	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	

第9表 H 37 株と TBI との接触による耐性発現

(集落個々について耐性検査した成績)

接触濃度 r/cc	接種菌量 mg	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)					
			I	II	III	IV	V	VI
200	0.5	1%培地上の発育	+++	++	+0.3	—	—	—
		検 査 集 落 数	7	4	1			
		100		1				
		10	1					
		1	3	3				
100	0.5	0.1	3		1			
		1%培地上の発育	+++	+++	+++	+++	+++	
		検 査 集 落 数	5	4	5	5	5	
		100	2	1	3			
		10		1	1	1		
	1	1	2	1				
		0.1	1	1	1	4	5	
		1%培地上の発育	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		検 査 集 落 数	5	5	5	5	5	5
		100			4	1		
		10	2	1				
		1		3				1
		0.1	3	1	1	4	5	4

ついてはかなり早く耐性が発現するが、又接触濃度が高いと多少耐性発現が早くなる傾向が認められる。

b) 得た集落中の個々について耐性検査をした場合。実験方法 A) b) により述べた方法により得た成績は第9表の通りである。即ち接種菌量 0.5 mg 200 r 接触では1週より既に耐性集落が現れ始め、2週で100 r 以上耐性の集落が認められる。接触後に得られた集落の数が3週では培地3本に1個しか得られずその後は皆無のため耐性の現れ方についても詳しくは判らないが、2週で最高の耐性が現れ3週に得た1集落は感性であつた。接触濃度が100 r の場合には1週より耐性が発現し3週で高耐性を示す集落が最も多い。4, 5週では発育集落の減少が認められていないに拘らず耐性の低い集落のみが認められ、5週では検査した5集落共に感性であつた。接種菌量 1 mg 100 r 接触の場合も大体同様の傾向を示している。此の実験では接触濃度が200 r の方が100 r よりも耐性の出方が低いが、之は発育集落数に現れている様に TBI 濃度の高い為菌が殺菌作用を受け、特に耐性発現に最適な2~3週に於て既にかなり集落発育数が

減じた為と思われる。即ち此の実験でも最高の耐性を示した週は接触濃度200 r の場合2週、100 r で1~3週であつて、耐性出現の仕方は接触濃度や菌量によつても左右されるが、接触期間が長びくと耐性が現れ難くなる傾向がある。

以上 TBI について総合すると、接触濃度が200~1 r でも発現する耐性の高さは大部分10 r 極少数が100 r であつて接触濃度による差を認め難いが、試みた範囲では接触濃度が高い程最高耐性を認める迄の接触期間は早い傾向があり、集落毎についての実験では DHSM の場合程ではないが長期間の接触で耐性の出方が少くなる事が認められる。

4) INAH について

H 37 RV 株を用い、実験方法 A) a) に従い得た集落をかき集めて耐性検査した成績は第10表の通りである。接種菌量 2 mg 10 r 或は 5 r 接触では3週で10 r の耐性を、4, 5週では1 r の耐性を発現しているが、菌量 0.2 mg の場合には10 r に接触させて得た集落の発育

第10表 H 37 RV 株と INAH との接觸による耐性発現

(得た集落をかき集めて耐性検査をした成績)

接種菌量 mg	接触濃度 r/cc	耐 性 r/cc	接 触 期 間 (週)											
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	0	
2.0	10	1%培地上の発育			++	+++	+++							+++
		100			—	—	—						—	
		10			++	—	—						—	
		1			+++	+	++						—	
		0.1			+++	+	+++						—	
		0			+++	+	+++						+++	
0.2	10	1%培地上の発育	+1.5	+0.5	+1	—	—	—	—	—	—	+++	+++	
		100	—	—	—						+	—		
		10	—	—	—						+++	—		
		1	—	—	—						+++	—		
		0.1	—	—	—						+++	—		
		0	+++	+++	+++						+++	+++		
2.0	5	1%培地上の発育			++	+++	+++						+++	
		100			—	—	—						—	
		10			+	+	—						—	
		1			+++	+	+						—	
		0.1			+++	+	+++						—	
		0			+++	+++	+++						+++	
1	8	1%培地上の発育	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		100	—	—		—	—	—	++	—		—	—	
		10	—	—		+++	+++	+++	+++	+		++	—	
		1	—	—		+++	+++	+++	+++	+++		+++	—	
		0.1	++	+		+++	+++	+++	+++	+++		+++	—	
		0	+++	+++		+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++	
0.2	1	1%培地上の発育	+1.5			++	+13	+++	+++		++	+0.5	+++	
		100	—			—	—	—	—		—	—	—	
		10	—			—	—	—	—		—	—	—	
		1	+			—	—	+	—		—	—	+1	
		0.1	++			+	—	+	—		—	—	+9	
		0	+++			+++	+++	+++	+++		+++	+++	+++	
	0.1	1%培地上の発育	+7		+1		+++	++	++	++	++	+++	+++	
		100	—		—		—	—	—	—	—	—	—	
		10	—		—		—	—	—	—	—	+	—	
		1	—		—		+	—	—	—	—	+	+1	
		0.1	—		+		+	—	—	—	—	+++	+9	
		0	+++		++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

数が僅かであつて 4~8 週では全く発育集落を認めず、茲に得た集落については耐性の発現を認めなかつた。然し 0.2mg 10r 接触 9 週にとびはなれて多数の集落を得、之は分散不十分な菌塊があつた為と思われるが、この集落については 100r の耐性を認めた。菌量 1mg 8r 接触では 4 週で 10r 7 週で 100r の耐性が発現したがその後は再び 10r の耐性を示した。菌量 0.2mg 1r 及び 0.1r 接触では、0.1r 接触 10 週に軽度の 10r 耐性を認めた他は耐性の発現を認めなかつた。

即ち INAH については接種菌量が少く発育集落数の少かつた場合には耐性発現を認めない事もあるが、接触濃度が 10~8r の場合には著明な耐性の発現が認められ、それより低い 1r 0.1r の接触濃度においては発育集落数の多い場合でも耐性発現は認め難い。又 10~8r 接触の際には始め接触期間の長くなると共に次第に高い耐性が発現するが、更に接触期間が長くなるとかえつて多少耐性が低くなることが認められ、DHSM や TBI について一部に認められたのと同様の傾向がある。

総括及び考察

抗結核剤を発育阻止濃度以上に含有する Kirchner 培地に人型結核菌を接種し 37°C に培養し観察すると、集落は全然発育していない。又沈渣をとつて染色鏡検すると、時に或は顆粒状として或は INAH 接触の場合に多くみる如く抗酸性を失つて発見されることもあるが、増殖した様相は認め難い。然し之等の菌を薬剤を含めぬ 1% KH₂PO₄ 培地に培養すると初めに用いた接種菌量、接触薬剤の濃度、接触期間によつて差はあるが一定の条件範囲内で集落の発育を認めることは前第 1 及び第 2 報に報告した。茲に得た集落について先に接触させた薬剤に対する耐性を検査すると、その中のあるものに耐性集落の発現が認められる。

こうして認められる耐性の発現については DHSM について検討した様に、薬剤と接触して居る時の温度が 5°C であつた場合には耐性集落の発現を認めず、37°C で接触した場合には発現を認めて居る。又 5°C における接触は、その後の 37°C における接触による耐性の発現に影響を与えて居ない。これらの事実は後に耐性を発現する要因が、薬剤に接触する事の外に、接触時の温度が 37°C である時に始めて生起したことを示して居ると思われる。第 1 報において薬剤と接触後の集落発育数が、接触の温度が 5°C の場合には 7 週接触後も、薬剤と接触させない対照と差がないに拘り、37°C において接触させた場合には接触 3 週には全く集落の発育を見ず、殺菌作用が 5°C においては発揮され

ず 37°C において発揮された事を報告しておいたが、殺菌作用をうけて菌数が少くなり従つて耐性発現の可能性が薄くなるにも拘り、37°C において接触した時に耐性発現の要因が生起することは、一般に認められている様に菌の代謝が 37°C においては 5°C においてよりも遙に盛であること、DHSM が菌に対し作用を及ぼす事と、菌の耐性発現との間に関連のあることを想像させる。この実験においては PAS の耐性菌を作ることには成功しなかつたが、DHSM, TBI, INAH においては夫々耐性菌を証明した。DHSM についての実験を基礎にして考えると、分離して菌株の個々の集落の耐性を検査しても、集落をかき集めて耐性を検査しても、接触期間 1, 2 週においては耐性菌の出現をみないが、3, 4, 5 週においては急に 1000r の様な高い耐性菌が出現している。然し耐性が最高を示した後接触期間が長びくと共に耐性が低くなり、ある場合には全く耐性を示さなくなる。此の傾向は TBI においても又多少乍ら INAH においても認められる。然し乍ら耐性が再び低下する度合は薬剤の種類によつて異り、DHSM では第 1 表に示した様に急激に低下するが、TBI, INAH では第 8 表及び第 10 表に示した様に緩徐である。

DHSM について第 2, 3, 4 表で、TBI について第 9 表で示した様に、上述の耐性の発現仕方の高低は耐性を示す集落の消長によることが判る。菌株耐性度の安定性については Middlebrook⁶⁾, Karlson⁷⁾, Pansy⁸⁾, King⁹⁾, 勝沼¹⁰⁾等の報告があり、又本実験中でも 1% KH₂PO₄ 培地に培養し 37°C に 5 ヶ月放置すると INAH 100r 耐性 H 37 RV 株は感性感化し、INAH 10r 耐性株及び TBI 100r 耐性株は変化しなかつた事を経験しているが、耐性復帰が DHSM について容易でないことが一般的に認められているし、TBI, INAH についても急激な復帰は認められておらず、前記の耐性低下が耐性復帰によることは考えられない。

小川¹¹⁾は感性菌と耐性菌の比率と Kirchner 培地を用いる耐性検査法の観察値を SM について検討し、耐性値は耐性菌の混入比率と判定期間により異なる事を報告している。Wolinsky¹²⁾等は Dubos 培地を用い 3 週判定の場合 1000r SM 耐性菌と感性菌の比が 1:10⁴ 以上の時に 1000r 耐性として認められると報告している。又 Colwell¹³⁾等は臨床材料について接種量を減ずると耐性値が低くなる場合と、減じても同じ場合とあることを認め、それは耐性菌の混入比率によるものとしている。本実験に用いた耐性検査法によれば小川¹¹⁾, Wolinsky¹²⁾の結果にみる様に、不完全耐性を、それとかなり耐性菌

が低率な場合まで耐性として見出している事となるが、而も尙耐性が低下するのは耐性菌の比率がかなり激しく変化していることを示すと思われる。

尙接触する薬剤の分解についても種々報告されているが、著者の行った実験によつても 37°C のKirchner培地中におけるDHSM, PASのH37RV株に対する阻止力は10週以内に $1/10$ 以上に低下することはなくINAHは3週TBIは7週で約 $1/10$ となるが、DHSMについて検討すれば之が耐性低下の原因になるとは考えられない。

以上の如く耐性低下の原因は不明であり今後更に検討を要すると思われるが、然し乍ら長期間薬剤との接触に耐えた菌が尙耐性を示していないことは注目を要しよう。

DHSMの実験においては青山B株、H37株、清H₁株等の人型菌について耐性発現の態度は同じであるが、尙詳細にみるとかなり動揺がある。即ち最高耐性の現れる期間が3~4週であつたり、第2表の実験では耐性発現が高率であるのに第3表の実験では耐性集落が認められず、発現していたとしても低率であると思われること等があるが、これは我々が耐性に関して多くの未知の点を残していることを暗示している。

本実験による耐性発現がKirchner培地内で薬剤と接触して淘汰をうけた結果おこるとすれば、より長期間接触した後には得られる集落程耐性集落が多くなつてはならぬが、それらは本実験のいづれにも認められる様に、かえつて耐性の低い或は全く感性の集落である事実と一致しない。

即ち本実験による耐性の発現は、菌が 37°C で代謝を営むと共に接触する薬剤によつてある種の影響をうけ、その為に後に薬剤との接触を絶たれて培地上で増殖する時に耐性菌に変異することによると考えられる。又菌が 37°C で薬剤接触して、後に耐性を発現するに至る影響をうける迄の期間が、薬剤の種類によつて異なる為に、薬剤によつて耐性発現迄の期間が異なる。又耐性を発現するに至る程の影響をうける菌は或一定の比率で他のこの様な影響を受けない菌に混じており、且この比率が接触期間と共に変わる。この様に考えると一応の説明がつくが、決定的には尙多くの検討を要すると思う。

本実験に用いた方法については、耐性発現は接種菌量の多い程容易でありMurray¹⁴⁾が耐性発現の遅速が接種菌量によると云つてゐるのと一致する。又同一薬剤では、茲に用いた範囲内では接触濃度の高い程最高耐性が現れる迄の期間が短いことがDHSMについて第1表

TBIについて第8表に認められる。接触薬剤の濃度は、DHSMについて第2表の1000rと100r接触の場合にTBIについて第9表の200rと100rの場合に認められる通り、発現する耐性の高さに対してかなり広い濃度範囲内で影響に差がないが、DHSMについて第1表に、又INAHについて第10表に特に明瞭な様に、接触濃度の低い程耐性の現れ方は遅く且低い。

薬剤各個について本法による耐性発現の難易を比較するとTBI > INAH > DHSM > PASの順であろう。Middlebrook¹⁵⁾もINAH > SMと報告している。然し茲に得た成績が必ずしも臨床成績と一致しないのは、薬用量、排泄速度等が異り、菌が生体内で接触する濃度が異なる等諸多の要因の爲であろう。

結 論

Kirchner培地中に人型結核菌を 5°C 及び 37°C で培養し、之に種々のDHSM, PAS, TBI, INAHを加えて菌を之等薬剤と接触させ、後分離培養し、発育した集落について耐性を検査し、次の知見を得た。

1) 37°C における接触によつて耐性の発現を認めるのはDHSM, TBI, INAHであるが、茲に検討した条件ではTBIが最も容易、次いでINAH, DHSMであり、PASは耐性が出現しなかつた。

2) 耐性の発現しかたは、DHSMでは3, 4, 5週接触の際に1000rの高耐性を示すが、INAHでは徐々に上昇し、TBIでは1週接触より既に或程度の耐性を示すがその高さはDHSMに比べて低い。

3) DHSMについての耐性発現態度は、人型の青山B株、H37株、H37RV株、清H₁株の各株について大体同様である。

4) 一般に適当な薬剤との接触期間及び濃度において耐性が発現するが、その条件は薬剤によつて異なる。同一薬剤については接種菌量の多い程耐性の発現は容易であり、耐性が最高となる迄の接触期間は接触濃度の低い程長く且接触濃度の低い場合には耐性の高さも低い。薬剤濃度があまりに低い場合には耐性は発現しないし、濃度の高い場合には適当な接触期間で一度高く現れた耐性も接触期間がそれより長すぎでは耐性が低く現れ遂には全く耐性の発現を認めない。

5) 5°C においてDHSMに接触させても耐性は発現しない。

本研究の要旨は昭和26年11月15日第5回及び昭和27年11月14日第7回日本細菌学会関東支部総回並に昭和26年11月及び昭和27年10月の文部省科学研究費結核研究班細菌科会において発表した。

本研究に対し終始御指導を賜った小川辰次博士及御校
 閤を賜った 東大石館守三教授に 深謝する。(この研究費
 の一部は文部省科学研究費によった。厚く感謝の意を表
 する。小川辰次)

文 献

- 1) Feldman, W. H., Karlson, A. G. & Hinshaw, H. C.: Am. Rev. Tbc., 57, 162, 1948.
- 2) Karlson, A. G., Ikemi, K.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic 27-12, 239, 1952.
- 3) Steenken, W., Jr., Wolinsky, E.: Streptomycin, Waksman, S. A., Williams & Wilkins, Baltimore, 1949.
- 4) 上野高正: 第7回日本薬学大会発表.
- 5) 上野高正: 薬誌 73, 4, 407, 1953.
- 6) Middlebrook, G. & Yegian, D.: Am. Rev. Tbc., 54, 553, 1946.
- 7) Karlson, A. G. & Needham, G. M.: Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic, 23, 401, 1948.
- 8) Pansy, F., Stander, H. & Donovan, R.: Am. Rev. Tbc., 65, 761, 1952.
- 9) King, M. B. et al: Lancet CCLXIII-6740, 854, 1952.
- 10) 勝沼六郎: 結核研究の進歩, 1, 51, 1953.
- 11) 小川辰次: 昭和26年11月総合研究結核研究班化学療法研究科会報告, 1951.
- 12) Wolinsky, E., Reginster, A. & Steenken, W., Jr.: Am. Rev. Tbc., 58, 338, 1948.
- 13) Colwell, C. A., Pitner, G., Moravec, M.: Am. Rev. Tbc., 63, 679, 1951.
- 14) Murray, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 63, 470, 1946.
- 15) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc. 65, 6, 765. 1952.