

## 薬剤耐性結核菌株の感受性復帰に関する研究

栗 村 武 敏

大阪大学医学部第三内科教室（主任 堂野前教授）

(昭和 31 年 9 月 10 日受付)

### I. 緒 言

肺結核に対する各種治療法の内で、化学療法が現在主導的な地位を占めている事は、何人も認める所である。しかし結核症は最も慢性的の経過をとる疾患であり、従つてその治療も長期間の継続を必要とする。殊に最近、肺結核に対する長期化学療法の効果は、X線像の改善、喀痰中の結核菌陰性化等において、極めて優秀であるばかりでなく、しばしば空洞の著明な縮少、閉鎖または消失を見ると多くの報告<sup>1~6)</sup>があり、何れも化学療法は可及的長期に行うべきである事を認めている。しかるに結核化学療法の長期間実施を阻むものが、結核菌の薬剤耐性獲得である事は、TEMPEL<sup>2)</sup>其他<sup>6,7)</sup>の報告以来、周知の通りである。かかる結核化学療法の現況より見て、この耐性結核菌の問題は、臨床上甚だ重要なものであることはいう迄もない。特に結核化学療法実施中に薬剤耐性を獲得した結核菌が、薬剤投与中止後に再び感受性に、復帰し得るか否かは、化学療法の効果持続を明らかにする上に重要な問題である。又 2 種以上の化学療法剤の併用投与によつて、各薬剤に対する耐性菌の出現を阻止又は遅延せしめ得る事実は TEMPEL<sup>1)</sup>の報告以来、経験的に知られている。しかしこの併用療法が、どの様な機転によつて、耐性菌の出現を阻止するかに就ては、数多くの報告<sup>8~12)</sup>を見るが、今尚必ずしも諸家の見解の一致を見ない現状である。

著者はこれ等の問題の解明に寄与する為に、臨床的に耐性結核菌証明例の経過を追及すると共に、試験管内実験によつて、不完全耐性菌株中の各耐性度個体分布が、継代によつて変動する状況を、追及したのでここに報告する。

### II. 実 験 方 法

#### 1. 臨 床 実 験

神戸市立玉津療養所に入所した肺結核患者の喀痰中の結核菌について、Streptomycin (SM),  $\mu$ -aminosalicylic acid (PAS), isonicotinic acid hydrazid (INAH) に対する耐性を検査した後、耐性菌を証明し得た症例について、検査実施後、他種抗結核剤の使用の有無により 2 群にわけ、2~3 カ月毎に、しかも 1~2 カ年間その耐性度の推移を検討した。尚耐性検査は種々の濃度の薬剤を含む 3% 小川培地を用いた直接法にて行つた。得られた成績は、培地上に对照と同程度に発育を示したもの

を完全耐性、部分的な発育を示したものを不完全耐性として示した。

#### 2. 試験管内実験

試験管内継代によつて、SM, PAS 又は INAH に対して、一部耐性を獲得せしめた結核菌 H<sub>37</sub>RV 株及び結核患者の喀痰より分離した耐性結核菌株を使用した。継代培地は他種抗結核剤の最小発育阻止濃度以下含有培地 (1% 小川培地又は DUBOS の Tween-Albumin 培地<sup>13)</sup>) を用いた。即ち、1% 小川培地の場合は、SM 耐性菌株用には PAS 0.1 mcg/cc, INAH 0.01 mcg/cc 或は 0.1 mcg/cc, Tibion (TB<sub>1</sub>) 0.5 mcg/cc 各含有培地を使用。PAS 耐性菌株用には SM 0.1 mcg/cc, INAH 0.01 mcg/cc, TB<sub>1</sub> 0.5 mcg/cc 各含有培地を用い、INAH 耐性菌株用には SM 0.1 mcg/cc, PAS 0.1 mcg/cc, TB<sub>1</sub> 0.5 mcg/cc 各含有培地を使用し、2 代継代毎に各濃度の薬剤を含む耐性分布検定用 1% 小川培地に  $10^{-8}$ ,  $10^{-4}$  或は  $10^{-5}$  mg の菌量を接種し、28 日間培養後、各培地上の集落を検すると同時に、対照として薬剤非含有培地に継代培養し、2 代継代毎に各濃度の薬剤を含む耐性分布検定用 1% 小川培地上の集落数を検した。次に、DUBOS の Tween-Albumin 培地の場合は、SM 耐性菌株には PAS 0.1 mcg/cc 及び INAH 0.01 mcg/cc 含有培地、PAS 耐性菌株には SM 0.5 mcg/cc 及び INAH 0.03 mcg/cc 含有培地、INAH 耐性菌株には SM 0.5 mcg/cc 及び PAS 0.5 mcg/cc 含有培地を用いた。各耐性菌株の 0.1 mg を、DUBOS 培地に接種し、14 日間毎日 1 回振盪し 37°C 孵卵器内にて均等培養後、その 0.1 cc を当該培地に接種し同様に均等培養を継代し、その都度その 0.1 cc を、10 倍稀釈系列耐性分布検定用 1% 小川培地に接種し集落数を検すると同時に、対照として薬剤非含有 DUBOS 培地に同様に均等培養を続け、継代毎に耐性分布検定用培地上の集落数を検した。尚集落数は各実験毎に 3 本づつ接種して得た平均値を示した。

### III. 実 験 成 績

#### 1. 臨 床 実 験

臨牞性に観察し得た症例、SM 耐性 44 例、INAH 耐性 31 例、PAS 耐性 32 例、計 107 例の成績は第 1 表に示す通りである。先ず SM 耐性に関しては、最初 SM 100 mcg/cc 完全耐性の結核菌喀出例中、以後他の抗結核剤の投与を受けなかつた 12 例は、凡て最初のままの

第1表 薬剤耐性結核菌喀出例の耐性度推移の追及

薬剤名	他種薬剤	耐性度 (mcg/cc)	例数	推 移				
				不变	一時 減弱	減弱	感性 復帰	
SM	非使用	完全	100 10	12 2	12 1	0 0	0 1	0 0
		不完全	10	4	0	0	1	3
		完全	100 10	12 6	4 0	3 2	4 1	1 3
	使用	不完全	100	8	1	1	4	2
		完全	10	3	3	0	0	0
		不完全	10	9	0	0	5	4
INAH	非使用	完全	100 10	3 4	0 0	0 0	3 2	0 2
		完全	100 10	1 11	0 0	0 0	1 5	0 6
		不完全	100 10	3 5	0 0	0 0	3 3	0 2
	使用	完全	100 10	1 6	0 0	0 0	1 3	0 3
		不完全	100 10	5 9	0 0	0 0	4 4	1 5
		完全	10	3	2	0	1	0
PAS	非使用	完全	100 10	3 5	0 0	0 0	3 3	0 2
		不完全	100 10	3 5	0 0	0 0	3 3	0 2
		完全	100 10	1 6	0 0	0 0	1 3	0 3
	使用	不完全	100 10	5 9	0 0	0 0	4 4	1 5
		完全	100 10	1 6	0 0	0 0	1 3	0 3
		不完全	100 10	5 9	0 0	0 0	4 4	1 5

耐性度、即ち 100 mcg/cc 完全耐性を維持していた。また 10 mcg/cc 完全耐性で他種薬剤非使用の 2 例では、1 例が不完全耐性に戻ったが、遂に完全な感受性には復帰する事は出来なかつた。しかし 10 mcg/cc 不完全耐性であつた 4 例は、その後他種薬剤を使用しなかつたにも拘らず、1 例は耐性度の減弱を認め、3 例は完全な感受性にまで復帰していた。これに対して、最初の耐性菌検出から後に、SM を投与せず、INAH、PAS 又は TB<sub>1</sub> 等の他種抗結核剤を使用した症例では、完全耐性の症例でもその一部に耐性度の減弱及び完全感受性復帰を来している事が知られた。即ち、100 mcg/cc 完全耐性の 12 例中 4 例は不变、又 3 例は一時ののみ多少の減弱を見たに過ぎなかつたが、他の 4 例は耐性度の低下減弱を認め、更に 1 例は完全な感受性復帰を認めた。尚 10 mcg/cc 完全耐性では 6 例中不变例なく、一時減弱 2 例、低下減弱 1 例、感受性復帰 3 例を認めた。100 mcg/cc 不完全耐性の 8 例では、不变 1 例、一時減弱 1 例、低下減弱 4 例、感受性復帰 2 例であつた。

次に INAH 耐性例について見ても略々同様な事が認められた。即ち、他種抗結核剤非使用例では、10 mcg/cc 完全耐性の 3 例は何れも同程度の耐性を持続しているに対し、10 mcg/cc 不完全耐性の 9 例は、耐性度の減弱を來したもの 5 例、完全な感受性復帰を來したもの 4 例を認めた。又他種抗結核剤を使用した症例では、100 mcg/

cc 完全耐性 3 例では凡て耐性度の減弱が見られ、10 mcg/cc 完全耐性 4 例では 2 例減弱を、他の 2 例は完全に感受性復帰を認めた。不完全耐性の 12 例では、減弱 6 例、感受性復帰 6 例であつた。

PAS 耐性についても、全く同じ傾向で、他種抗結核剤非使用例では 10 mcg/cc 完全耐性 3 例中 2 例は耐性度不变にて、1 例のみ僅かに耐性度の減弱を認めたにすぎなかつた。しかし 100 mcg/cc 不完全耐性 5 例では、何れも耐性度の減弱を認め、10 mcg/cc 不完全耐性 5 例では、減弱 3 例、完全に感受性復帰を認めたもの 2 例であつた。これに対し他種抗結核剤使用例では、完全耐性 7 例中減弱 4 例、感受性復帰 3 例で、不完全耐性 14 例中減弱 8 例、感受性復帰 6 例を認め、全例とも耐性度の低下減弱又は感受性復帰を認めた。

第2表 耐性減弱及び感性復帰発現時期

薬剤名	他種薬剤	耐性度 (mcg/cc)	耐性減弱		感性復帰	
			件数	時期	件数	時期
SM	非使用	完全	100 10	0 1	0 7	0 0
		不完全	10	1	5	3 (6)
	使用	完全	100 10	4 1	4~10 (6.5) 4	1 3
		不完全	100	4	3~8 (5)	2 5~9 (7)
	非使用	完全	10	0	0	0
		不完全	10	5	2~6 (3.8)	4 3~7 (4.8)
INAH	使用	完全	100 10	3 2	3~7 (5) 2~5 (3.5)	0 2
		不完全	100 10	1 5	3 2~5 (3.2)	0 6 2~7 (4.2)
	非使用	完全	10	1	8	0 0
		不完全	100	3	2~6 (4) 3~5 (3.7)	0 2 4~7 (5.5)
	使用	完全	100 10	1 3	3~7 (5) 2~5 (4.2)	0 2
		不完全	100 10	1 5	3 2~5 (3.2)	0 6 2~7 (4.2)
PAS	非使用	完全	100 10	1 3	2~6 (4) 3~5 (3.7)	0 0
		不完全	100 10	3 3	3~5 (3.7)	2 4~7 (5.5)
	使用	完全	100 10	1 3	6 3~6 (4.3)	0 3
		不完全	100 10	4 4	2~6 (4.2) 2~6 (4)	1 7 5 3~8 (5)

註：時期の欄の数字は薬剤投与中止後又は他種薬剤投与後の月数を示す。( ) 内の数字はその平均月数を示す。

なお耐性減弱又は感受性復帰の発現する時期は、第2表の通りで、SM耐性については耐性減弱の認められる時期は薬剤投与中止後又は他種薬剤投与後、大多数は5~6カ月位であり、感受性復帰の時期はやや遅れて6~7カ月位が多かつた。INAH耐性では、SM耐性の場合にくらべ早く、耐性減弱の時期は大体2~4カ月、感受性復帰の時期は3~5カ月位が多かつた。次にPAS耐性では、SM耐性の場合より早く、INAH耐性の場合よりやや遅い傾向を認めた。即ち、耐性減弱の時期は大体4~5カ月で、感受性復帰の時期は5~6カ月位に多く認め得た。

## 2. 試験管内実験

第3表 H<sub>37</sub>RV-SM耐性株（小川培地使用）

継代培地	継代数	SM濃度 (mcg/cc)				
		0	1	10	50	100
初代	115	70	86	92	20	
TB <sub>1</sub> 0.5 mcg/cc	2代	98	64	58	53	6
	4	103	83	70	17	0(0)
	6	72	41	8	0(22)	0(0)
	8	96	59	66	2	0(0)
INAH 0.01 mcg/cc	2代	80	56	43	39	3
	4	77	67	65	2	0(0)
	6	27	17	5	0(4)	0(0)
	8	46	40	34	0(9)	0(0)
非含有 対照	2代	110	113	70	75	22
	4	93	77	63	59	15
	6	80	55	52	56	22
	8	95	92	67	43	12

数字は 10<sup>-4</sup>mg 中の集落数

( ) 内の数字は 10<sup>-8</sup>mg 中の集落数

継代培地	継代数	SM濃度 (mcg/cc)				
		0	1	10	50	100
初代	93	77	63	59	15	
PAS 0.1 mcg/cc	2代	77	62	68	7	0(0)
	4	65	57	41	0(0)	0(0)

PAS含有培地、2代、4代継代の対照は上記対照の6代、8代に当る。

試験管内継代によつて、一部耐性を得しめた結核菌H<sub>37</sub>RV株使用の場合の成績は、先ずSM耐性株に就ては、第3表に示す通りで、初代、即ち他種抗結核剤含有培地継代前の菌株中のSM各種濃度耐性個体の分布を、湿菌量 10<sup>-4</sup>mg を小川培地に接種し培養して得た集落数から推定すると、50mcg/ccまでは殆んど完全耐性

で、100mcg/cc耐性個体は約20%であった。処がこれをTB<sub>1</sub> 0.5mcg/cc含有培地に継代すると、既に4代後には100mcg/cc耐性個体を 10<sup>-8</sup>mg 接種中にも証明し得ず、又50mcg/cc耐性個体も極めて少數に認めるのみとなつた。この傾向は継代数を増す毎に顕著となつた。又INAH 0.01mcg/cc含有培地継代でも同様の傾向が認められ、4代後にて100mcg/cc耐性個体を 10<sup>-8</sup>mg 中にも認め得ず、50mcg/cc耐性個体を 10<sup>-4</sup>mg 中に2集落を認めるのみであつた。更に6代後には50mcg/cc耐性個体は 10<sup>-8</sup>mg 中に数個を算え得るにすぎないが、10<sup>-4</sup>mg 中にては全然認め得なかつた。これに対しても、薬剤非含有対照培地継代では、6代後も初代と殆んど同様の耐性個体分布を示しており、8代後にも尚100mcg/cc耐性個体が証明された。又PAS 0.1mcg/cc含有培地に継代した場合にも、2代後既に 10<sup>-4</sup>mg 中に100mcg/cc耐性個体を証明し得ず、4代後には50mcg/cc耐性個体も証明し得ないが、薬剤非含有対照培地継代では4代後にも100mcg/cc耐性個体を 10<sup>-4</sup>mg 中に証明していた。即ち、4代後も初代と殆んど同様の耐性個体分布を示していた。

第4表 H<sub>37</sub>RV-PAS耐性株（小川培地使用）

継代培地	継代数	PAS濃度 (mcg/cc)				
		0	1	10	50	100
初代	190	131	106	80	26	
SM 0.1 mcg/cc	2代	47	25	26	11	0(16)
	4	90	47	8	0(0)	0(0)
	6	85	54	0(40)	0(0)	0(0)
	8	29	0(8)	0(0)	0(0)	0(0)
INAH 0.01 mcg/cc	2代	128	113	115	20	0(14)
	4	37	34	23	0(18)	0(0)
	6	44	55	0(56)	0(0)	0(0)
	8	65	33	0(0)	0(0)	0(0)
TB <sub>1</sub> 0.5 mcg/cc	2代	75	74	45	36	0(0)
	4	90	68	10	0(0)	0(0)
	6	42	13	0(0)	0(0)	0(0)
	8	55	24	0(0)	0(0)	0(0)
非含有 対照	2代	95	84	65	37	9
	4	60	56	44	23	0(0)
	6	111	65	51	0(17)	0(0)
	8	92	56	27	0(0)	0(0)

数字は 10<sup>-4</sup>mg 中の集落数

( ) 内の数字は 10<sup>-8</sup>mg 中の集落数

次に、PAS耐性株では第4表に示す通りで、薬剤非含有対照培地継代でも、高度耐性個体が漸次減少し、6

代後には 50 mcg/cc 耐性個体は  $10^{-4}$  mg 中には証明し得ず,  $10^{-3}$  mg 中に 17 集落のみ認め, 8 代後には  $10^{-3}$  mg 中にも全く集落の形成が見られていなかつたのであるが, SM 0.1 mcg/cc 含有培地継代では, 2 代後より 100 mcg/cc 耐性個体は  $10^{-4}$  mg 中に認めず,  $10^{-3}$  mg 中に 16 集落認めめたが, 4 代後には 100 mcg/cc 耐性個体は勿論 50 mcg/cc 耐性個体も認め得なかつた。INAH 0.01 mcg/cc 含有培地継代では 6 代後では 50 mcg/cc 耐性個体を, 8 代後では 10 mcg/cc 耐性個体まで認め得なかつた。又 TB<sub>1</sub> 0.5 mcg/cc 含有培地継代では 4 代後 50 mcg/cc 耐性個体を, 6 代後 10 mcg/cc 耐性個体を認め得なかつた。即ち, 他種薬剤含有培地継代による場合は, 薬剤非含有培地継代による場合より早期に高度耐性個体の減少消失を来し, 急速に感受性復帰を証明し得た。

第 5 表 H<sub>37</sub>RV-INAH 耐性株 (小川培地使用)

継代培地	継代数	INAH 濃度 (mcg/cc)					
		0	1	10	50	100	125
初代		132	130	124	118	117	120
SM	2 代	105	96	82	77	73	93
	4	97	64	44	43	41	83
	6	126	110	87	90	9	0(5)
	8	83	73	64	31	6	0(0)
PAS	2 代	138	127	90	98	111	110
	4	95	51	47	44	46	58
	6	117	57	59	65	50	0(30)
	8	66	40	41	30	0(12)	0(0)
TB <sub>1</sub>	2 代	51	37	40	40	37	8
	4	124	79	83	112	86	80
	6	143	110	113	59	0(51)	0(0)
	8	79	74	67	52	0(20)	0(0)
非含有	2	142	138	120	111	93	102
	4	121	105	94	79	83	80
	6	84	74	78	60	66	41
	8	98	97	69	70	62	37

数字は  $10^{-4}$  mg 中の集落数( ) 内の数字は  $10^{-1}$  mg 中の集落数

更に INAH 耐性株は第 5 表に示す通りで, 初代において 125 mcg/cc に殆んど完全耐性を示していた為に, 薬剤含有培地継代による耐性個体分布は著明な変化は見られなかつたが, 薬剤非含有対照培地継代の場合に比較すると, 早期に高度耐性個体が減少している事が認められた。

以上は結核菌 H<sub>37</sub>RV 株による成績であるが, 更に結

第 6 表 SM 耐性須原株 (小川培地使用)

継代培地	継代数	SM 濃度 (mcg/cc)				
		0	1	10	50	100
初代	代	88	78	75	52	38
INAH	3 代	78	72	60	66	31
	5	98	94	76	70	0(60)
	7	87	84	62	0(33)	0(0)
	9	65	58	12	0(16)	0(0)
PAS	3 代	87	75	70	50	37
	5	82	72	55	43	0(0)
	7	77	66	46	0(18)	0(0)
	9	70	53	0(40)	0(0)	0(0)
TB <sub>1</sub>	3 代	96	91	76	56	44
	5	83	70	63	42	30
	7	80	78	54	0(26)	0(22)
	9	68	65	0(38)	0(12)	0(0)
非含有	3 代	80	71	73	57	32
	5	69	70	64	44	29
	7	72	68	65	51	34
	9	59	56	50	40	22

数字は  $10^{-5}$  mg 中の集落数( ) 内の数字は  $10^{-4}$  mg 中の集落数

核患者喀痰中より分離した耐性結核菌株を用い, 1% 小川培地継代にて同様の方法で行なつた実験成績を表示すると次の通りである。第 6 表は, SM 100 mcg/cc 耐性須原株で, INAH 0.1 mcg/cc 含有培地継代では, 5 代後 100 mcg/cc 耐性個体は  $10^{-4}$  mg 接種中に証明し得ず,  $10^{-3}$  mg 中にて 60 集落を認め, 7 代後には  $10^{-3}$  mg 中にても全然認め得なかつた。又 50 mcg/cc 耐性個体は 7 代後より減少の傾向を示した。PAS 0.1 mcg/cc 含有培地継代では, 5 代後より 100 mcg/cc 耐性個体は  $10^{-3}$  mg 中にても認め得なかつた。TB<sub>1</sub> 0.5 mcg/cc 含有培地継代にては, 100 mcg/cc 耐性個体は 7 代後より減少し, 9 代後は  $10^{-3}$  mg 中にても認め得なかつた。しかし薬剤非含有対照培地継代では 9 代後にも, 100 mcg/cc 耐性個体を  $10^{-4}$  mg 中にても認め, 初代と殆んど同様の耐性個体分布を示している。第 7 表は, PAS 50 mcg/cc 耐性松田株で, 薬剤非含有対照培地継代では, 6 代後に 50 mcg/cc 耐性個体は  $10^{-3}$  mg 中に認め得ず, 8 代後に  $10^{-4}$  mg 中にて認める事が出来なかつたが, 薬剤含有培地継代にてはより速やかに 50 mcg/cc 耐性個体及び 10 mcg/cc 耐性個体の減弱又は消失を認めることが出来た。第 8 表は, INAH 50 mcg/cc 耐性中村株で, SM 0.1 mcg/cc 含有培地, PAS 0.1 mcg/cc 含有

第7表 PAS 耐性松田株 (小川培地使用)

継代培地	継代数	PAS 濃度 (mcg/cc)				
		0	1	5	10	50
初代		130	84	68	50	33
SM 0.1 mcg/cc	2代	105	76	50	44	26
	4	111	65	42	30	0(18)
	6	102	70	31	0(35)	0(0)
	8	97	35	0(12)	0(0)	0(0)
INAH 0.1 mcg/cc	2代	110	90	72	60	13
	4	95	68	42	25	0(11)
	6	98	50	0(37)	0(5)	0(0)
	8	88	0(42)	0(0)	0(0)	0(0)
TB <sub>1</sub> 0.5 mcg/cc	2代	115	107	80	61	22
	4	120	84	60	52	9
	6	110	67	20	0(28)	0(0)
	8	105	82	3	0(0)	0(0)
非含有 対照	2代	112	87	68	50	20
	4	110	75	51	36	14
	6	95	58	44	23	0(13)
	8	92	60	49	0(22)	0(0)

数字は  $10^{-5}$  mg 中の集落数( ) 内の数字は  $10^{-4}$  mg 中の集落数

第8表 INAH 耐性中村株 (小川培地使用)

継代培地	継代数	INAH 濃度 (mcg/cc)				
		0	1	5	10	50
初代		97	79	59	52	30
SM 0.1 mcg/cc	3代	82	77	56	44	23
	5	52	39	32	20	0(11)
	7	55	47	30	0(0)	0(0)
	9	46	23	0(15)	0(0)	0(0)
PAS 0.1 mcg/cc	3代	75	53	34	30	0(0)
	5	92	70	46	33	0(0)
	7	65	37	0(20)	0(0)	0(0)
	9	60	16	0(0)	0(0)	0(0)
TB <sub>1</sub> 0.5 mcg/cc	3代	105	90	70	62	42
	5	92	72	53	50	40
	7	103	87	54	37	0(17)
	9	98	63	36	0(6)	0(10)
非含有 対照	3代	88	81	62	55	35
	5	86	80	64	48	38
	7	78	64	44	38	21
	9	79	63	50	42	30

数字は  $10^{-5}$  mg 中の集落数( ) 内の数字は  $10^{-4}$  mg 中の集落数

第9表 SM 耐性井場株 (DUBOS 培地使用)

他種薬剤含有 培地継代：前	稀釈				
	0mcg/cc	1	10	50	100
	200				
$10^2$	#	#	#	#	#
$10^3$	#	#	#	#	#
$10^4$	112	103	97	88	92

継代培地 種類	PAS 0.1 mcg/cc					INAH 0.01 mcg/cc					非含有 対照				
	稀釈	0mcg/cc	1	10	50	100	200	稀釈	0mcg/cc	1	10	50	100	200	
1代	$10^2$	#	#	#	#	#	#	$10^2$	#	#	#	#	#	#	
	$10^3$	#	#	#	#	#	#	$10^3$	#	#	#	#	#	#	
	$10^4$	43	35	33	23	27	0	$10^4$	75	66	50	36	42	33	
2代	$10^2$	#	#	#	#	#	#	$10^2$	#	#	#	#	#	#	
	$10^3$	107	105	100	118	2	2	$10^3$	#	#	#	#	#	#	
	$10^4$	20	22	13	19	5	0	$10^4$	60	45	44	30	59	40	
3代	$10^2$	#	#	#	#	#	#	$10^2$	#	#	#	#	#	#	
	$10^3$	85	80	78	80	0	0	$10^3$	#	#	#	#	#	#	
	$10^4$	12	10	8	9	0	0	$10^4$	75	49	37	36	17	0	
4代	$10^2$	#	#	#	#	#	#	$10^2$	#	#	#	#	#	#	
	$10^3$	175	163	141	153	0	0	$10^3$	#	#	#	#	#	#	
	$10^4$	18	13	11	5	0	0	$10^4$	39	21	24	20	0	0	

培地及び TB<sub>1</sub> 0.5 mcg/cc 含有培地継代では、継代毎に高度耐性個体が漸次減少しているのを認め、特に SM, PAS 含有培地継代では著明であった。しかし薬剤非含有対照培地継代では 9 代後にも、尚初代の耐性個体分布と殆んど同じ傾向であつた。以上、結核患者喀痰より分離した耐性結核菌株を用いた実験成績も、結核菌 H<sub>37</sub>RV 耐性株の場合と同様の傾向を認め得た。

次に培地の種類を変えて、患者喀痰より分離した耐性結核菌株の DUBOS の Tween-Albumin 液体培地継代による実験成績は次の通りである。第 9 表は SM 200mcg/cc 耐性井場株の成績である。他種薬剤含有培地継代前の耐性個体分布は、10<sup>4</sup> 倍稀釈にて、0, 1, 10,

第 11 表 INAH 耐性谷口株 (DUBOS 培地使用)

	稀釈 0mcg/cc 1 5 10 50				
他種薬剤含有 培地継代：前	10	#	94	85	88
	10 <sup>2</sup>	#	6	4	4
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	54	0	0	0

継代培地 種類	SM 0.3 mcg/cc					PAS 0.3 mcg/cc					非含有対照				
	稀釈	mcg/cc	1	5	10	稀釈	mcg/cc	1	5	10	稀釈	mcg/cc	1	5	10
1 代	10	#	81	60	69	10	#	60	53	50	10	#	80	83	77
	10 <sup>2</sup>	#	2	1	0	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	3	1	1
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	40	0	0	0	10 <sup>4</sup>	17	0	0	0	10 <sup>4</sup>	87	0	0	0
2 代	10	#	30	39	17	10	#	15	13	10	10	#	75	70	52
	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	2	2	0
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>4</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	44	0	0	0	10 <sup>4</sup>	22	0	0	0	10 <sup>4</sup>	58	0	0	0
3 代	10	#	0	0	0	10	#	0	0	0	10	#	59	54	43
	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	1	1	0
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	35	0	0	0	10 <sup>4</sup>	12	0	0	0	10 <sup>4</sup>	77	0	0	0
4 代	10	#	0	0	0	10	#	0	0	0	10	#	4	3	0
	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	36	0	0	0	10 <sup>4</sup>	15	0	0	0	10 <sup>4</sup>	48	0	0	0

第 10 表 PAS 耐性青木株 (DUBOS 培地使用)

	稀釈 0mcg/cc 1 5 10 50					
他種薬剤含有	10 <sup>2</sup>	#	+	+	72	0
培地継代 前	10 <sup>3</sup>	#	98	81	0	0
	10 <sup>4</sup>	93	23	10	0	0

継代培地 種類	SM 0.3 mcg/cc					INAH 0.03 mcg/cc					非含有対照				
	稀釈	0mcg/cc	1	5	10	稀釈	0mcg/cc	1	5	10	稀釈	0mcg/cc	1	5	10
1 代	10 <sup>2</sup>	#	+	23	0	10 <sup>2</sup>	#	+	15	0	10 <sup>2</sup>	#	+	+	55
	10 <sup>3</sup>	#	20	0	0	10 <sup>3</sup>	#	22	0	0	10 <sup>3</sup>	#	44	9	0
	10 <sup>4</sup>	90	0	0	0	10 <sup>4</sup>	61	0	0	0	10 <sup>4</sup>	71	2	0	0
2 代	10 <sup>2</sup>	#	+	0	0	10 <sup>2</sup>	#	42	0	0	10 <sup>2</sup>	#	+	12	0
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	91	1	0
	10 <sup>4</sup>	66	0	0	0	10 <sup>4</sup>	57	0	0	0	10 <sup>4</sup>	87	0	0	0
3 代	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	0	0	0	10 <sup>2</sup>	#	+	0	0
	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	0	0	0	10 <sup>3</sup>	#	5	0	0
	10 <sup>4</sup>	42	0	0	0	10 <sup>4</sup>	36	0	0	0	10 <sup>4</sup>	48	0	0	0

50, 100 及び 200 mcg/cc の各濃度耐性個体の集落数は 112, 103, 97, 88, 92 及び 81 コであり、薬剤含有培地継代後では発生集落数は全般に継代前に比し少くなっているが、PAS 0.1 mcg/cc 含有培地継代にて、1 代後は 10<sup>4</sup> 倍稀釈にて 200 mcg/cc 耐性個体を認め得ず、3 代後には 103 mcg/cc 耐性個体も認め得なかつた。INAH 0.01 mcg/cc 含有培地継代にて、3 代後に 10<sup>4</sup> 倍稀釈にて 200 mcg/cc 耐性個体を認め得ず、4 代後には 200 mcg/cc 耐性個

体は勿論 100 mcg/cc 耐性個体も認め得なかつたが、薬剤非含有対照培地継代にては、4代後も初代と殆んど同じ耐性個体分布を示していた。次に第 10 表、第 11 表は、PAS 10 mcg/cc 耐性青木株及び INAH 10 mcg/cc 耐性谷口株を用いて、同様の実験を行なつた成績であるが、何れも薬剤含有培地継代の方が、薬剤非含有対照培地継代の場合より、速やかに感受性復帰の傾向を認め得た。

#### IV. 総括並に考按

薬剤耐性結核菌の感受性復帰の問題を論ずるには、2通りの解釈がある。即ち、一旦薬剤耐性を獲得した結核菌の個体が変異によりその耐性を失う場合と、耐性個体を含んだ結核菌株が再び感受性個体のみの菌株に復帰する場合とがある。しかしこの 2 つは本質的に全く異なる現象である事は言うまでもない。前者は所謂逆変異の 1 つとして、細菌の遺伝学的方面より多くの検討<sup>14~18)</sup>が行われている問題であるが、著者が臨床的に見ている事実は、むしろ後者、即ち菌株としての感受性復帰、更に換言すれば菌株内の感受性個体と耐性個体の分布の変化を観察しているのであると思う。

さて結核化学療法の進歩にともない、すでにこれ等薬剤耐性結核菌の耐性推移の問題は種々論ぜられている。SM 耐性の推移について、CANADA<sup>19)</sup>、小酒井<sup>20)</sup>等は SM 耐性患者は長く耐性菌を喀出するといい、一般に臨床的には SM 治療中止後、結核菌の SM 耐性は感受性に復帰しにくいといわれている。しかし WOLINSKY<sup>21)</sup> 等は SM 治療中止後 4 カ月目から SM 耐性の感受性復帰例のあることを報告している。PAS 耐性については、TEMPEL<sup>1)</sup>、伊藤<sup>22)</sup>、及び英國での共同研究<sup>23)</sup> 等何れも PAS 耐性の感受性復帰を報告している。又 INAH 耐性では、臨床的には堂前野<sup>24)</sup>、熊谷<sup>25)</sup>、等により感受性復帰のあることが報告され、一方 INAH 耐性結核菌の試験管内における耐性度の推移については、PANSY<sup>26)</sup>、SZYBALSKI<sup>27)</sup>、等は感受性復帰するとし、他方 FISHER<sup>28)</sup> は耐性度の消失低下は見ないといい、尙佐藤<sup>29)30)</sup> は H<sub>37</sub>RV 株では耐性度の消失低下を見ないが、患者喀痰より分離した INAH 耐性菌の場合は試験管内実験にも感受性復帰のある場合も認めている。これ等の実験結果は必ずしも相一致を見ていないのである。著者の臨床実験成績からみると、SM 耐性例であつても、不完全耐性例では耐性の減弱を見る例が多く、しかも長期間の後には完全な感受性に復帰する事を認めたが、完全耐性例では、殆んど不变であつた。一方 SM 投与中止後に他種抗結核剤を用いたものでは、完全耐性例からも感受性の復帰を見たものもあつた。PAS 耐性及び INAH 耐性例での感受性復帰は一般に相当高率に認められたが、

特に他種抗結核剤使用例では全例において耐性減弱又は感受性復帰を示した。但し PAS 及び INAH 耐性であつても完全耐性でしかもその後に他種抗結核剤を用いなかつた症例では感受性復帰の傾向の認められないもの多かつた。以上の如く、臨床的には耐性菌を一旦証明し得た患者が、再び感受性菌のみを喀出する状態にまで戻る場合の相当ある事が明かである。又かような所謂感受性復帰の頻度は、当初の薬剤耐性の程度及びその後の薬剤使用の有無と密接な関連のある事が知られる。

ただしこの臨床観察だけからでは、直ちに各種耐性結核菌株が容易に感受性に復帰するとは結論し得ないであろう。何となれば結核菌を排出している病巣が 2 個以上存在する場合、夫々の病巣中には異つた耐性度を有する菌が証明されることもあり、特に空洞に高度な耐性菌のあることは既に知られており<sup>31~33)</sup>、耐性菌排出病巣が何等かの理由で閉鎖を来せば、喀痰中には感受性菌のみ残る事も有り得るからである。しかし著者の実験症例は何れも相当、陳旧性の所謂硬化萎縮型病巣を有しているので、大部分の症例において少くも病巣の治癒、空洞の閉鎖等を想像し得る如き改善は見られていない。一方 FISHER<sup>28), 34)</sup> は H<sub>37</sub>RV 株を用いて INAH 感受性株が発育可能な培地にも耐性株は発育を来さず、血清の添加によつてはじめて感受性株と同様の増殖を認め得る事を知り、更に INAH 耐性菌の発育のヘミン添加によつて促進される事を認めた。又最近 PATNODE<sup>35)</sup> 等も 6 カ月以上 INAH を投与した患者から分離した耐性結核菌株は血清又は臓器エキス添加培地にのみ発育が可能であると述べている。この様な事実は現在の處、SM 又は PAS 耐性菌については報告されていないが、試験管内実験では証明困難な程度の栄養要求性の僅少な差異が SM 耐性菌、PAS 耐性菌と夫々の感受性菌の間に存在すると仮定すると、上述の INAH 耐性菌の場合も含めて生体内で長期間に徐々に淘汰が行われてもよいと考えるのである。又柳田等<sup>36)</sup>は黄色葡萄球菌のペニシリン耐性株と感性株とをほぼ同量ペニシリンの入らない培地に累代接種して、耐性株は完全に消失して感性株のみとなることから、ペニシリン耐性株は感性株より発育速度が遅く、耐性復帰の機転はこの発育速度の差によると述べている。著者の実験においても、不完全耐性の時期、即ち喀痰中に耐性菌と感受性菌の混在が認められる時期から観察を始めた場合は、他種抗結核剤を用いなくても比較的高率に感受性復帰が見られる事実が明かであるので、この場合にも感受性菌と共存している間に耐性菌だけが漸次淘汰されて行くと言う機転がやはり考え得るのである。かかる条件に着目して次に試験管内実験を行なつたが、各種薬剤不完全耐性結核菌株を他種薬剤の最小

発育阻止濃度以下に含有する培地にて継代した場合は、薬剤非含有培地継代の場合より速かに耐性個体の比率が減少する傾向を認め得たのである。

以上の事実を総合して著者は耐性結核菌株の感受性復帰の機転は、或る薬剤に対する感受性個体と耐性個体との混在下における耐性個体の自然淘汰、殊に他種薬剤の存在下においては、これに対する両者の感受性の僅少な差異による増殖遲延に基くものと考えるものである。

又薬剤併用療法の薬剤耐性出現阻止又は遅延の機転についても、2種薬剤の併用を行なつた場合、何れか一方に対して耐性個体の出現を見ても、他の薬剤がある程度選択的にこの菌株個体の中から耐性個体のみを淘汰する事によつて菌株の耐性化、殊に高度耐性化を防止することによつて説明し得ると考えるである。

勿論著者は以上の理由のみを以て、耐性菌の感受性復帰のすべてを解明し得たと考えているのではなく、この問題については更に、生体の防御作用、病巣の組織化学的な性状及び細菌の毒力等の面より究明を要する点が甚だ多いであろう。

しかし何れにせよ、臨床的には、長期化学療法の経過中に、耐性菌の出現を可及的早期に発見し、その不完全耐性の時期において当該薬剤の投与を中止するか、又は他種の薬剤に代える事こそ、治療効果の向上並びにその持続を計る上に重要な手段であるといい得る。

## V. 結 語

結核化学療法剤耐性結核菌喀出例に就いて、化学療法中止後の耐性推移を観察すると共に、試験管内実験において、その機構を追及し、次の事実を認め得た。

1) 臨床的には不完全耐性菌株よりの感受性復帰、殊に他種化学療法剤使用例からの感受性復帰が比較的高率である事を認め得た。

2) 試験管内実験にて各種薬剤不完全耐性結核菌株を他種薬剤の最小発育阻止濃度以下に含有する培地にて継代した場合は、薬剤非含有培地継代の場合より、高度耐性個体の比率がより速かに低下し、菌株として感受性に復帰する場合の多い事を認め得た。

本論文の要旨は昭和 29 年 11 月第 10 回日本結核病学会近畿地方会、昭和 30 年 10 月第 12 回同会及び昭和 31 年 5 月第 31 回日本結核病学会総会において発表した。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた堂野前教授、並びに河盛助教授に深く感謝する。

## 文 献

- 1) TEMPEL, C. W., et al. : Am. Rev. Tuberc., 63, 295, 1951

- 2) TEMPEL, C. W., et al. : Ann. Ind. Med., 39, 61, 9151
- 3) 堂野前維麻郷、他：結核、29、増刊号、282、昭 29
- 4) 堂野前維麻郷、他：日本臨床、12、907、昭 29
- 5) 岩崎竜郎：結核、30、増刊号、1、昭 30
- 6) 厚生省結核療法研究協議会：日本医事新報、1607、719、昭 30
- 7) U.S. Public Health Service : Am. Rev. Tuberc., 67, 553, 1953
- 8) JAWETZ, E. : Arch. Ind. Med., 90, 301, 1951.
- 9) GRAESSLE, R. O., et al. : J. Bact. 57, 459, 1949
- 10) 秋葉朝一郎：Chemotherapy, 1, 1, 1953
- 11) 小酒井望：最新医学、9, 158, 昭 29
- 12) 海老名敏明、他：結核研究の進歩、1, 119, 昭 28
- 13) DUBOS, R. J. & MIDDLEBROOK, G. : Am. Rev. Tuberc., 56, 334, 1947
- 14) LEDERBERG, J. : J. Bact., 61, 549, 1951
- 15) VOUREKA, A. Lancet, (1) 62, 1948
- 16) GEORGE M. & PANDALAI, K. M. Lancet, (1) 955, 1949
- 17) 秋葉朝一郎 医学のあゆみ、13, 250, 昭 27
- 18) 秋葉朝一郎：医学と生物学、24, 55, 昭 27
- 19) CANADA, R. O., et al. : Am. Rev. Tuberc., 62, 563, 1950
- 20) 小酒井望：総合医学、7, 1154, 昭 25
- 21) WOLINSKY, F., et al. : Am. Rev. Tuberc., 58, 335, 1948.
- 22) 伊藤善朗、他：結核、30, 643, 昭 30
- 23) A Medical Research Council Investigation : Brit. Med. J. (1) 1157, 1952
- 24) 堂野前維麻郷、他：最新医学、8, 976, 昭 28
- 25) 熊谷岱藏、他：日本臨床結核、12, 609, 昭 28
- 26) PANSY, F., et al. : Am. Rev. Tuberc., 65, 761, 1952
- 27) SZYBALSKI, W., et al. : Am. Rev. Tuberc., 65, 768, 1952
- 28) FISHER, M. W. : Am. Rev. Tuberc., 66, 626, 1952
- 29) 佐藤直行：医学と生物学、31, 250, 昭 29
- 30) 佐藤直行：結核、29, 393, 昭 29
- 31) McDERMOTT, W., et al. : Ann. Int. Med., 27, 769, 1947
- 32) 小酒井望：結核、26, 279, 昭 26
- 33) TURNBULL, F. W. A., et al. : Am. Rev. Tuberc., 73, 406, 1956
- 34) FISHER, M. W. : Am. Rev. Tuberc., 69, 797, 1954
- 35) PATNODE, R. A., et al. : Am. J. Publ. Health., 45, 451, 1955
- 36) 柳田友道、他：生物の変異性、89、昭 28、岩波書店