

牛型結核菌 (Ravenel 株及び BCG 株) の PAS 耐性形式

東 村 道 雄・東 村 純 雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)
名古屋大学医学部内科第一講座 (主任 日比野進教授)

受付 昭和 40 年 3 月 17 日

PAS RESISTANCE PATTERN OF *MYCOBACTERIUM BOVIS*
(RAVENEL AND BCG)*

Michio TSUKAMURA and Sumio TSUKAMURA

(Received for publication March 17, 1965)

Previously the authors reported that the pattern of p-aminosalicylate (PAS) resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv and Aoyama-B) belong to the "Two resistant phenotypes" type according to the description proposed by Tsukamura (Jap. J. Tuberc., 9: 43, 1961) and belong to "Two-step pattern" or "Facultative single-step pattern" according to the description method of Demerec and Bryson & Szybalski. In this paper, the pattern of PAS resistance in *M. bovis*, Ravenel and BCG, has been described. *M. bovis* has shown a distinctly different pattern, *i. e.*, "One resistant phenotype" and "Single-step pattern".

Methods

M. bovis Ravenel and BCG were used throughout. The method for studying the resistance pattern was described previously (Tsukamura, M. et al., Jap. J. Genetics, 34: 43, 1959; Tsukamura, M., J. Gen. Microbiol., 23: 203, 1960; Tsukamura, M., Jap. J. Tuberc., 9: 43, 1961). The medium used was 1% Ogawa medium. The PAS concentration for growth inhibition was two times higher in this medium than was in Löwenstein-Jensen medium.

It was stated previously that "phenotypes" for drug resistance are expressed as survival curves of clones, which were derived from single colonies. The study was to test the survival curves of various clones. The parent clones were cultivated on drug-free medium and, from these cultures, cell suspensions were prepared. Samples of 1:1 to 1:10⁶ dilutions were inoculated on media containing graded concentrations of PAS and incubated at 37°C for four weeks. Single colonies growing on different PAS concentrations were isolated and cultivated on drug-free medium. These clones were named as, for example, "P 0.1 R", "P 1 R", "P 500 R", etc., which meant clones isolated on medium containing 0.1 γ /ml PAS, 1 γ /ml PAS, 500 γ /ml PAS, respectively. Survival curves of these clones were prepared in the same way and the same procedures were repeated.

Results

The results are shown in Fig. 1 and 2.

It was noteworthy that clones isolated on medium containing 0.5 γ /ml PAS (P 0.5 R) and those on medium containing 500 γ /ml PAS (P 500 R) showed the same survival curves. In other words, these clones showed the same degree of resistance irrespective of the PAS concentration on which they were isolated. Transfers of the clones on high concentrations resulted no more clones of high resistance. It was shown thus that *M. bovis* represents only one phenotype of PAS resistance. Differences between the PAS resistance patterns of *M. tuberculosis* and of *M.*

* From the Obuso National Sanatorium, Obu near Nagoya, Aichi-Pref., Japan.

bovis are summarized in Table 1.

Summary

M. bovis Ravenel and BCG showed only one phenotype of PAS resistance and its pattern resistance development belonged to the "Single-step pattern".

著者は前に人型結核菌 ($H_{37}Rv$ 株および青山B株) の PAS 耐性形式をしらべて、それが「2 耐性表現型」(耐性の段階が2段階)であり、かつ上昇形式は「2-step pattern」($H_{37}Rv$) または「facultative single-step pattern」(青山B) であると報告した^{1)~3)}。微生物の薬剤耐性上昇形式の記載には、「facultative single-step pattern」(または SM 型)^{4),5)} と「multi-step pattern」(または penicillin 型)^{4),5)} があることが広く知られているが、PAS の場合には、そのいずれでもない「2-step pattern」が認められた。この形式はのちに INH, 1314 TH でも認められた^{3),6)}。

人型結核菌の PAS 耐性上昇形式は、Bryson & Szybalski⁵⁾ の記載法にならうと、 $H_{37}Rv$ 株では「2-step pattern」、青山B株では「facultative single-step pattern」になるが、これは Demerec⁴⁾、Bryson & Szybalski⁵⁾ の記載法の欠点で、検査に使う菌量の多少によつて形式が変わってくる例がある⁶⁾。人型結核菌の場合、検査に供しうる菌量は、 10^8 生菌数くらいであるために上述の結果となるので、もし 10^6 程度の生菌数しか用いなければ両者とも「2-step pattern」となり、非常に大量の菌量を用いえたすれば、両者とも「facultative single-step pattern」となつたはずである⁶⁾。このような記載法の欠点を除くために東村^{3),6)} が提唱したのが「耐性表現型」の数(耐性度の数と考えてよい)による記載法である。これによれば、人型結核菌の PAS 耐性形式は両者とも「2 表現型」(低耐性と高耐性の2種の耐性度がある)と記載される。

著者は今回、牛型結核菌 Ravenel 株および BCG 株の PAS 耐性形式について検討したところ、耐性形式は「一表現型」、耐性上昇形式は「single-step pattern」で、人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株および青山B株のそれとは異なることが分かつた。

実験方法

牛型結核菌 Ravenel 株および BCG 日本株を用いた。これらの株はあらかじめ単個集落分離を3回以上行なつてあり、いわゆる clone に相当するものと思われた。実験方法は原理的には前報^{1)~3)} と同じであるが、培地の数は一濃度3本に減らした。まず親株の菌液を作つて、1:1 から 1:10⁶ 希釈液をつ

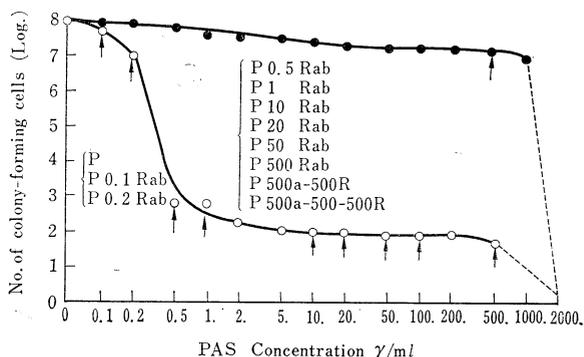
くる。その 0.02 ml を渦巻白金耳で、種々の濃度の PAS-Na を含む 1% 小川培地に塗抹し、37°C 4 週培養する。こうして親株の survival curve を作る。次に各 PAS 濃度に単個集落として発育した集落をとり、PAS を含まない培地に3週間培養して増菌する。このさい、PAS 0.1 γ/ml 培地に発育した集落に由来する株(clone) を P 0.1 R, PAS 1 γ/ml 培地の単個集落に由来する株(clone) を P 1 R というように命名する。こうして得られた種々の clones の survival curves を同様にして作る。このさいたとえば P 100 R の survival curve を作つて、PAS 500 γ/ml 培地に発育した集落があれば、P 100-500 R となずけて、再びその survival curve を作つていく。

実験結果

図1および2に Ravenel および BCG について得た結果をまとめた。

Ravenel の結果では、PAS 0.2 γ/ml 以下の濃度に発育した集落の survival curves は親株のそれ(P)と同

Fig. 1. Survival Curves for Various Clones Isolated from *M. bovis* Ravenel on Various PAS Concentrations.



"P" indicates the parent clone. "P 0.1 R", "P 0.2 R", "P 1 R", "P 10 R" et cetera indicate clones derived from colonies isolated on media containing 0.1 γ per ml., 0.2 γ per ml., 1 γ per ml., 10 γ per ml. et cetera. "P 500 a-500 R", for example, indicates a clone isolated from the clone "P 500 aR" by the second-step selection with 500 γ per ml. The end point of dotted lines mean that no surviving colonies were found at rates indicated by the point. Arrows indicate that single colonies were isolated at the concentrations indicated by the arrows, subcultured on drug-free media, and analyzed for their population structure (survival curve).

じであるが、PAS 0.5 γ /ml 以上 PAS 500 γ /ml の間に発育した集落の survival curves は前者とまったく異なる。注目されるのは PAS 0.5 γ /ml 培地からとつた clones (P 0.5 R) の survival curves と、その 100 倍の濃度の PAS 500 γ /ml 培地からとつた clones (P 500 R) の survival curves とが同型であることである (図 1)。さらに PAS 500 γ /ml 培地に継代して淘汰を重ねても、survival curves の型は変わらない。この結果は、Ravenel 株は PAS 耐性の「表現型」を一つしか持たないことを示している。すなわち Ravenel 株の菌は、PAS 感性 (PAS 0.2 γ /ml までしか発育しない) か、PAS 高耐性 (PAS 500 γ /ml で発育する) のいずれかで、その中間段階というものがない。

すなわち Ravenel 株の PAS 耐性形式は、「一耐性表現型」であるといえる。すなわち PAS 耐性 clones は型は一つしかない。以上の結果を Bryson & Szybalski⁵⁾ の記載法によつて記すと、明らかに「single-step pattern」といえる。すなわち最高耐性度に達する step は one step である。また突然変異菌の発生する突然変異頻度は図 1 から約 10^{-6} である。

BCG 株に関する結果もほとんど同様である。突然変異頻度も 10^{-6} である。ただ Ravenel 株に比較すると PAS 感受性が低い。

考 察

牛型結核菌 Ravenel 株および BCG 株で得た結果を前に人型結核菌 H₃₇Rv 株および青山 B 株について得られた結果と比較すると、表 1 のごとくなる。

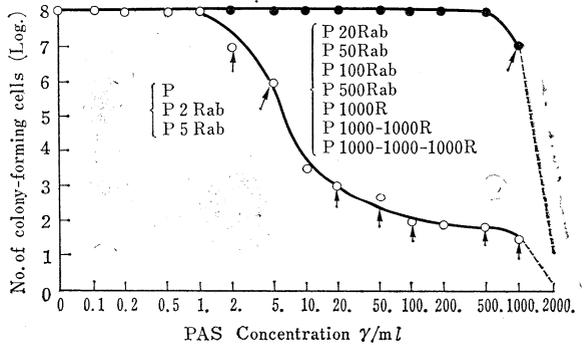
人型結核菌の耐性表現型は 2 種あり、低耐性と高耐性に分けられる。たとえば H₃₇Rv 株の親株の耐性度は PAS 0.05 γ /ml であるが、低耐性株の耐性度は 1~2 γ /ml、高耐性株の耐性度は 1,000 γ /ml である。一方牛型結核菌の耐性表現型は一種しかない。たとえば BCG 株は親株の耐性度は 2~5 γ /ml で、耐性株のそれは 1,000 γ /ml である。この中間型というものはない。

Table 1. Comparison of the PAS Resistance System between *Mycobacterium Tuberculosis* and *Mycobacterium Bovis*

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
No. of Resistant Phenotypes	Two Types	One Type
Pattern of Resistance Development	Two Step Pattern* or Facultative Single-Step Pattern**	Single-Step Pattern

M. tuberculosis, H₃₇Rv* and Aoyama-B** strains.
M. bovis, Ravenel and BCG strains.

Fig. 2. Survival Curves for Various Clones Isolated from *M. bovis* BCG on Various PAS Concentrations. (see figure 1)



耐性上昇形式でいうと、人型結核菌 H₃₇Rv 株では、最高耐性度の株を得るには 2 回の淘汰が必要で、「2-step pattern」となる³⁾。一方、青山 B 株は低耐性株も高耐性株も一回の淘汰で得られ、「facultative single-step pattern」である。これは現在われわれが用いる菌数の上限が $10^8 \sim 10^9$ であるためである。なんとすれば、低耐性菌の突然変異頻度は $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 、高耐性菌の突然変異頻度は 10^{-8} であるから、両者とも one-step で得られる。しかしもしわれわれが 10^6 程度の菌数を検査量として常用するなら、H₃₇Rv 株のごとく「2-step pattern」になるであろう。Bryson & Szybalski⁵⁾ の耐性上昇形式で耐性型を整理しようとする、接種菌量で型が変わるという困難がつきまとう。この点、東村³⁾ が提唱した「耐性表現型数」によると検査菌数に関係なく一定の型となる。要するに、両方の記載法を併用するのが合理的である。

結 論

牛型結核菌 Ravenel 株と BCG 株との PAS 耐性形式は「一耐性表現型」形式であり、耐性上昇形式は「single-step pattern」である。耐性菌を生じる突然変異頻度は約 10^{-6} である。

文 献

- 1) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M. & Hayashi, M.: Jap. J. Genetics (日本遺伝学雑誌, 英文), 34 : 43, 1959.
- 2) Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 23 : 203, 1960.
- 3) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 9 : 43, 1961.
- 4) Demerec, M.: J. Bacteriol., 56 : 63, 1948.
- 5) Bryson, V. & Szybalski, W.: Adv. Genetics, 7 : 1, 1955.
- 6) Tsukamura, M., Noda, Y., Hayashi, M. & Yamamoto, M.: Ann. Rep. Jap. Soc. Tuberc., 5 : 135, 1960.