

結核菌の Ethionamide 耐性と他薬剤耐性の安定性の  
差異について (5~9年間の *in vitro* 継代実験)

東 村 道 雄

国立療養所中部病院 (院長 勝沼六郎)

東 村 純 雄

名古屋大学医学部第一内科教室 (教授 日比野進)

受付 昭和 41 年 10 月 7 日

ON THE INSTABILITY OF ETHIONAMIDE RESISTANCE AND  
ON THE STABILITY OF OTHER DRUG RESISTANCES  
IN TUBERCLE BACILLI (FIVE TO NINE  
YEARS' *IN VITRO* OBSERVATIONS)\*

Michio TSUKAMURA and Sumio TSUKAMURA

(Received for publication October 7, 1966)

It is known that drug resistance in resistant strains of tubercle bacilli selected *in vitro* or *in vivo* is usually very stable. Up to date, several or more than ten transfer experiments have been reported with the results that the level of drug resistance does not change even after transfer on drug-free medium. We examined drug resistance of tubercle bacilli making transfers every month on drug-free medium for five to nine years.

### Methods

As the test strain, *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv was used throughout. Various drug-resistant mutant strains were isolated by one-step selection or two-step selection, and the resistant strains were isolated from single colonies. The strains were maintained on drug-free Ogawa egg medium by monthly subculture. Drug resistance level was tested by "actual count" method, in which resistance level was expressed as the highest concentration of drug on which small inocula consisting of 20 to 100 viable units could grow (3, 4).

### Results

The results are shown in Tables 1 and 2.

Streptomycin resistance, isoniazid resistance and PAS resistance were maintained stably even after more than 100 transfers on drug-free medium for nine years. Kanamycin resistance also proved to be very stable, as it was maintained after more than 90 transfers on drug-free medium for eight years.

On the other hand, ethionamide resistance was lost after 60 transfers on drug-free medium for five years, although it had been shown that the resistance was unchanged in the level after one year subculture.

In contrast to the instability of ethionamide resistance in the strains obtained by *in vitro* selection, ethionamide resistance in a naturally ethionamide-resistant strain (strain Yamada) was demonstrated to be more stable, though the level of resistance tended to decrease.

\* From National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-ken, Japan.

## Discussion

It was shown previously that 15 to 25 % of tuberculous patients, who had not have any chance for infection with ethionamide-or amithiozone-resistant tubercle bacilli, excreted tubercle bacilli resistant to ethionamide or amithiozone. To differentiate these types of resistant strains, which had occurred before appearance of drugs, from "primary drug resistance" strains, these were named as "natural-resistant strains". It was shown that natural ethionamide resistance was accompanied with amithiozone resistance only at an at random relationship, while acquired ethionamide resistance that was produced by exposure to ethionamide was accompanied with amithiozone resistance at a close relationship. Thus, it was suggested that there are two types of ethionamide resistance (5).

The results of the present study supported the previous observation as above, as they showed that natural ethionamide resistance was more stable than acquired ethionamide resistance, which is supposed to have been derived from mutation of sensitive cells, and it was suggested that different types of ethionamide resistance could occur.

## Conclusion

Streptomycin resistance, isoniazid resistance and PAS resistance in resistant strains of *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> were maintained stably even after more than 100 transfers on drug-free Ogawa egg medium for nine years, and kanamycin resistance also was maintained even after more than 90 transfers on drug-free medium for eight years. On the other hand, ethionamide resistance was lost after 60 transfers on drug-free medium for five years, although it had been maintained after one year-transfers.

Ethionamide resistance in a natural-ethionamide-resistant strain was maintained more stably, but showing some decrease in its resistance level, after the similar transfers for five years.

*In vitro* または *in vivo* で薬剤による選択で得られた耐性結核菌の耐性度は適当な培地に保存継代されれば安定であると一般に考えられている。たとえば君野<sup>2)</sup>は *M. smegmatis* (もと *M. avium* と同定されていた獣調株) で SM 耐性および INH 耐性が薬剤なし培地に 10 代継代した後も不変であったと報告している。人型結核菌に関するこの種の実験は多数の著者によつて報告されているが、継代数は通常数代に止まっている。われわれは *in vitro* で分離された人型結核菌 (H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> 株) の薬剤耐性の安定性を 5~9 年間継代して観察したので、その結果を報告する。

## 実験方法

被検株は *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>。他に ethionamide 自然耐性株である山田株も観察対象とした。streptomycin (SM=dihydrostreptomycin 使用), isoniazid (INH) および *p*-aminosalicylate (PAS) (Na 塩) 耐性株は、いずれも 1957 年に one-step selection によつて分離した。kanamycin (KM) 耐性株は 1958 年に one-step selection によつて分離した。ethionamide (TH) 耐性株

は 1961 年に two-step selection (1st step 32  $\gamma$ /ml, 2nd step 125  $\gamma$ /ml) によつて分離した。SM, INH, PAS, KM の耐性株は低耐性株, TH 耐性株は高耐性株であった。ここにいう「低耐性株」とは、耐性上限<sup>2)</sup>に達しない中間耐性度を示す耐性株の意で、「高耐性株」とは耐性上限の耐性度を示す耐性株をいう。

(注: 薬剤濃度だけをとつて、10  $\gamma$ /ml 耐性は低耐性、1,000  $\gamma$ /ml 耐性は高耐性と呼ぶのは不合理である。感性株の耐性度が 500  $\gamma$ /ml であれば、1,000  $\gamma$ /ml 耐性は耐性度の 2 倍の上昇にすぎないからである。)

分離培地および継代培地には、1% 小川培地を用い、薬剤濃度は添加濃度をそのまま示した。薬剤は滅菌前に培地に添加し、90°C 60 分滅菌後、斜面とした。培地は中試験管 (18×170 mm) に 8 ml ずつ分注した。

耐性度の測定は "actual count" 法<sup>3)</sup>によつた。すなわち生菌数 20~100 を各培地に接種したとき、37°C 4 週後に発育を示す最高濃度をもつて「耐性度」を表わした。

耐性度の測定は分離当時、薬剤なし培地に菌株を継代しつつ、少なくとも 3 回以上は測定した。その後毎月継代して、1960 年および 1962 年に耐性度を測定し、1966

Table 1. Stability of Drug Resistance in Various Resistant Strains of *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and in a Natural-ethionamide-resistant Strain of *M. tuberculosis*

Strain*	Resistance level at the time of isolation** ( $\gamma/ml$ )		Resistance level in 1962** ( $\gamma/ml$ )	Resistance level in 1966** ( $\gamma/ml$ )
Parent	#	(1957)		
SM-R-10	20	dihydrostreptomycin (1957)	20	20
SM-RI-10	20	dihydrostreptomycin (1957)	20	20
INH-R-0.1	0.1	isoniazid (1957)	0.1	0.1
PAS-R-1	2	Na-PAS (1957)	2	2
KM-R-30	30	kanamycin (1958)	30	30
KM-R-100	200	kanamycin (1958)	200	200
TH-Ra-32-125	125	ethionamide (1961)	100	<25
TH-Rb-32-125	125	ethionamide (1961)	100	<25
EB-R-5	5	ethambutol (1964)	5	5
Yamada	100	ethionamide (1961)	50	25

\* Strains other than Yamada are derivatives of strain H<sub>37</sub>Rv. Alphabetic numbers attached to the strain name are the concentrations of drug used for selection of the strain. One number indicates that the strain has been obtained by one-step selection, and two numbers indicate that the strain has been obtained by two-step selection. Strain Yamada is a natural-ethionamide-resistant strain.

\*\* Resistance levels were measured by the "actual count" method (3, 4).

‡ Resistance levels of the original H<sub>37</sub>Rv strain are as follows: 4  $\gamma/ml$ . dihydrostreptomycin (SM); 0.02  $\gamma/ml$ . isoniazid (INH); 0.05  $\gamma/ml$ . Na-PAS; 10  $\gamma/ml$ . kanamycin (KM); 8  $\gamma/ml$ . ethionamide (TH); 1 to 2  $\gamma/ml$ . ethambutol (EB).

Table 2. Stability of Ethionamide Resistance in *in vitro*-resistant Strains and in a Natural-resistant Strain

Strain	Resistance level in 1961*				Resistance level in 1966*			
	Ethionamide conc. ( $\gamma/ml$ )				Ethionamide conc. ( $\gamma/ml$ )			
	0	32	63	125	0	25	50	100
H <sub>37</sub> Rv parent	+	-	-	-	+	-	-	-
H <sub>37</sub> Rv ethionamide-resist. a	+	+	+	+	+	-	-	-
H <sub>37</sub> Rv ethionamide-resist. b	+	+	+	+	+	-	-	-
Yamada**	+	+	+	+	+	+	±	-

\* Determination of resistance levels was done by the "actual count" method (3, 4). Symbols + or - indicate that growth or no growth has occurred in all of three independent tests, and symbol ± indicates that growth has occurred in one of three tests. Growth means that any growth has occurred when each medium has been inoculated with an inoculum consisting of 20 to 100 viable numbers.

\*\* Ethionamide concentrations used for test of strain Yamada in 1961 were not the above but 0, 30, 50 and 100  $\gamma/ml$ .

年に再び測定を行なつた。

耐性株はいずれも単一集落に由来するもので、1%小川培地(薬剤を含まず)に毎月継代保存された。

山田株は1961年にはじめてTH<sub>1</sub>を入手して患者に実験的投与を行なう前に108名の患者株について"actual count"法でTH耐性検査を行なつたさいに発見された「TH自然耐性株」の1株で、1961年に分離した後、1966年まで上記のH<sub>37</sub>Rv由来株と同じく毎月1%小川培地に継代保存した。「自然耐性株」<sup>9)</sup>とは、薬剤の出現前から存在する耐性の意である。「primary drug resistance」は薬剤未使用患者における耐性であるが、この耐性は耐性菌感染によつて起こつた耐性と一般に了解されているが、「natural resistance (自然耐性)」は、薬剤の出現前、菌の本来の性質として存在する耐性の意である。

(注: "primary drug resistance" は、その定義を上述べるとく解すれば、耐性機構としては、感性菌の突然

変異によつて生じた突然変異耐性菌が薬剤によつて選択されたものと考えられる。一方「自然耐性菌」は薬剤の選択を受けていない菌と考える。

検査に用いた薬剤濃度は; SM 0, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 40, 100, 200, 1,000, 2,000, 10,000  $\gamma/ml$ ; INH 0, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 100, 200, 500, 1,000, 2,000  $\gamma/ml$ ; PAS 0, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 4,000  $\gamma/ml$ ; KM 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 10,000  $\gamma/ml$ ; TH 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500  $\gamma/ml$  (1961年) および TH 0, 25, 50, 100  $\gamma/ml$  (1962年) および 1966年) また TH 自然耐性株の分離当時の耐性検査は当時臨床検査に用いた濃度で、TH 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200  $\gamma/ml$ ; EB 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20  $\gamma/ml$ 。

H<sub>37</sub>Rv株(感性株)の示す耐性度は、SM 4~6  $\gamma/ml$ , INH 0.02  $\gamma/ml$ , PAS 0.05  $\gamma/ml$ , KM 10  $\gamma/ml$ , TH 8

7/ml, EB 17/ml (いずれも“actual count”法)であった。

### 実験成績

SM, PAS, INH 耐性株は、いずれも 1957 年に one-step selection で得られたもので、分離後 9 年間に、薬剤なし培地に 100 代以上継代されたが、耐性度は分離当時と変わらなかつた。(表 1)

KM 耐性株も 1958 年に one-step selection で分離されて以来、8 年間に 90 代以上薬剤なし培地に継代されたにもかかわらず、耐性度は分離当時と変わらなかつた。(表 1)

TH 耐性株は上記の耐性株より 3, 4 年遅く、1961 年に two-step selection によつて分離されたものであるが、分離後 5 年間に 60 代継代する間にその耐性を消失した。ただし 12 代継代後(分離 1 年後)に検したときには、その耐性度は保存されていた。この 5 年間の継代による耐性消失は、別々に分離した 2 株の TH 耐性株とともに起こつた。(表 1, 2)

自然耐性株の山田株も 5 年間 60 代にわたる薬剤なし培地継代の結果、その耐性度の低下を起こしたが、*in vitro* 耐性株ほどの著明な低下ではなく、1966 年の現在もなお耐性株の範ちゆうに入る耐性度が保たれている。(表 1, 2)

### 考 察

薬剤耐性の性質は遺伝因子(染色体上の遺伝因子あるいは episome のごとき細胞質内の遺伝因子)の突然変異によるものと考えられ、その性質は安定なものと考えられている<sup>6)7)</sup>。従来薬剤耐性の安定性について述べた文献は多いが、その継代数はせいぜい 10 代どまり、期間も 1 年以内で、今回われわれが行なつたとき 8~9 年 90~100 代以上の継代実験を行なつた文献はない。

われわれは H<sub>37</sub>Rv 株由来の SM, INH, PAS, KM の中間耐性株(低耐性株)を薬剤なし培地に 8~9 年間 90~100 代以上継代したが、これら耐性株の耐性度は全く安定して分離当時と変りなかつた。EB 耐性株は観察期間 2 年で短い、2 年間は安定に耐性度が維持されている。

唯一つの例外は TH 耐性株であつて、分離後 1 年はその耐性度が保持されたが、上記の SM, INH, PAS, KM 耐性株より短い 5 年間の継代の間に感性に復帰していた。人体内の TH 投与によつて生じた TH 耐性株の *in vivo* における安定性については、東村<sup>8)</sup>は TH 中止後 8 カ月は安定であることを 4 例の患者の毎月検診によつて観察し、ついで東村(純)<sup>9)</sup>は TH 中止後 5~17 カ月にわたつての 9 例の患者についての観察で、7 例では TH 耐性が維持されたのをみた。*in vivo* についての 17

カ月以上の長期観察はないが、われわれの今回の *in vitro* 観察の結果からすると、*in vivo* でも長期間 TH の投与を中止すれば、あるいは TH 耐性の消失がみられるかもしれない。( *in vivo* での感性復帰の証明には、接種生菌数による耐性検査の変動をさける方法—たとえば“actual count”法—で、できれば 1 日痰を集め、かなり長期間の観察を行なうことが必要である。短期間の routine 法検査で簡単に復帰を結論すべきではない。)

ここに興味があるのは、TH 自然耐性菌と TH 投与による選択耐性菌の差で、さきに東村<sup>8)</sup>は前者では TH 耐性と amithiozone (Tb) 耐性の関係が at random であるが、後者では TH 耐性は大概 Tb 耐性を伴っていることを観察した。すなわち自然耐性と選択耐性の間に耐性機構の差があることが示唆されたが、今回の実験でもそれを裏書きする結果が得られた。*in vitro* の選択耐性菌は、上記の TH 投与による選択耐性菌に匹敵するものと考えられるが、この種の耐性株では TH 耐性は比較的不安定で 5 年間の継代中に消失したのに対し、自然耐性株の山田株の TH 耐性は、耐性度の低下を起こしたとはいへ、前者よりは安定であるごとく思われた。

耐性株の耐性復帰の機作としては、種々の要素が考えられるが<sup>7)10)</sup>、ここにはふれない。本報の観察は現象の観察に止まるので、機作にふれる材料もない。またわれわれの実験は被検株が比較的少ない。とくに TH 選択耐性株と TH 自然耐性株の差が普遍的現象かどうかは、もつと多くの菌株で実験することが望ましいのはもちろんである。しかしここに示したとき 5~9 年にわたる継代実験を簡単に繰り返すわけにもゆかないので、ここに現在の成績を報告する次第である。

### 結 論

人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株の SM, INH, PAS 耐性株は、低耐性株であつても、その耐性は 9 年間に 100 代以上薬剤なし培地に継代した後も不変に保持された。KM 低耐性株の耐性も 8 年間に 90 代以上薬剤なし培地に継代した後も不変であつた。

以上のごとく SM, INH, PAS, KM 耐性が安定に保持されたのにひきかえ、TH 耐性株は 5 年間 60 代薬剤なし培地に継代する間に耐性度が低下した。TH 自然耐性株である山田株の TH 耐性は、5 年間 60 代の継代により耐性度の低下は起こつたが、なお低耐性が維持されていた。

### 文 献

- 1) 君野徹三: J. Antibiotics, 7: 89, 1954.
- 2) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 9: 43, 1961.
- 3) 東村道雄: 医学と生物学, 49: 87, 1958.
- 4) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 12: 46,

1964.

- 5) 東村道雄：結核，37：103，1962.
- 6) Demerec, M. : J. Bact., 56：63, 1948.
- 7) Watanabe, T. : Bact. Revs., 27：87, 1963.
- 8) 東村道雄，安保孝，河西栄文：結核，37：141，

1962.

- 9) 東村純雄：結核，38：172，1963.
- 10) Bryson, V. & Szybalski, W. : Advances in Genetics, 7：1, 1955. (Academic Press, N. Y.)