

Mycobacterium tuberculosis の Capreomycin 耐性形式

東村道雄・外山春雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 43 年 1 月 30 日

PATTERN OF CAPREOMYCIN RESISTANCE IN
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Michio TSUKAMURA and Haruo TOYAMA

(Received for publication January 30, 1968)

Though, by use of capreomycin, capreomycin resistant tubercle bacilli are not rarely observed in clinical specimens, there is no basic study on the resistance pattern to this antibiotic. The present study is concerned the pattern of capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Methods

Strain. The strains used were *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and Aoyama-B.

Method. The method used was described previously (Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 9: 43~64, 1961). It consists of preparing successively the survival curve of clones obtained by different drug concentrations. The medium used was the Ogawa egg medium (pH 6.8) (Basic solution (1% KH₂PO₄ and 1% sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% malachite green solution, 6 ml). Growth of colonies was counted after incubation at 37°C for 4 weeks.

Results

Number of resistance-phenotypes

Number of resistance-phenotypes equals the number of the type of survival curves. As seen in Fig. 1 and 2, this appeared to be only one, supposing that variations in the curve are variations (at a little degree) probably due to some conditional factors in the presence of one resistance-regulating gene, but the figures might be interpreted to be multiple phenotypes with minor variation. The former possibility was suggested, for example, from a fact that the property of the Aoyama-B strain to grow on 500 mcg/ml capreomycin was unstable and was not maintained persistently after three transfers on drug-free media. We have described the number of phenotypes as one phenotype (or multiple phenotypes with minor variation).

Type of resistance development

Type of resistance development was an obligatory single-step pattern (or facultative single-step pattern with a wide first step). This pattern is correlated to the number of phenotypes. If we consider the number of resistance phenotypes as one, the pattern of resistance development is an obligatory single-step pattern, and if we consider the number of resistance phenotypes as pleural, it is a facultative single-step pattern with a wide first step.

Upper limit of resistance (The highest level of resistance development)

The upper limit of resistance was a 10- to 20-fold increase from the resistance level of

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Chita-gun, Aichi-ken, Japan.

the parent strain in the H₃₇Rv strain and a 20- to 50-fold increase in the Aoyama-B strain.

Conclusion

The conclusion obtained and the comparison between the pattern of capreomycin resistance and the patterns of streptomycin resistance, kanamycin resistance and viomycin resistance are shown in Table 1. The pattern of capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv and Aoyama-B strains) resembled greatly the pattern of viomycin resistance.

capreomycin (CPM) が臨床に使用されてからすでに1年あまりになり、CPM 耐性結核菌を臨床材料から分離することもまれではなくなつた。しかるに結核菌の CPM 耐性の基礎的研究はいまだ行なわれておらず、耐性形式も未知のままである。著者¹⁾は前に結核菌の耐性形式について基礎的研究を行なつたが、本報では CPM 耐性を取り扱つて、耐性形式の研究を補うとともに、streptomycin (SM), kanamycin (KM) および viomycin (VM) 耐性形式と比較することとした。

実験方法

菌株. *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv 株および青山B株を使用した。両株とも当研究室保存株で、1% 小川培地に培養後、-20°C に保存されていた。

研究方法は既報¹⁾の方法によつた。親株 (single colony 由来の clone) から 10 倍希釈列で 20 mg/ml ないし 10⁻⁶ × 20 mg/ml の菌液を作り、種々の濃度の CPM を含む 1% 小川培地に 0.02 ml ずつ渦巻白金耳で接種し、37°C 4 週培養後に集落数を数え、親株の生残曲線を作つた。こうして得られた集落を拾つて、CPM なしの 1% 小川培地で増菌し、再び同じ方法で生残曲線を作つた。これらの生残曲線は "10 Ra", "10 Rb", "20 Ra" のごとく名づけた。10 R は 10 mcg/ml CPM に発育した集落に由来する clone の意である。以下同じ方法で次々と CPM による selection を重ねて集落を分離し、その生残曲線を作つた。

使用した CPM は capreomycin sulfate (Eli Lilly and Co., Ltd, Basingstoke, England) (Capastat sulphate) である。表示濃度は添加濃度 (滅菌前に 1% 小川培地に添加, 90°C 60 分滅菌) のままとした。

実験成績

耐性表現型の数

耐性表現型の数は耐性形式を示す重要な指標の一つで、生残曲線 (survival curve) の型の数に一致する¹⁾。

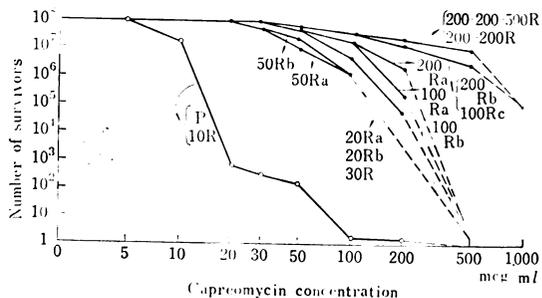
CPM 耐性の場合、この型の数は明確には結論できない。図1に示すごとく青山B株の場合、100 mcg/ml 耐性、200 mcg/ml 耐性、500 mcg/ml 耐性の種々の段階があるように見える。しかし 500 mcg/ml 耐性株を CPM

を含め培地に3代継代すると、耐性度は 200 mcg/ml 程度に低下するので、500 mcg/ml 耐性は安定な耐性度とはいえない。したがつてこれを簡単に表現型——一つの遺伝子型に対応する表現型——と考えるわけにはいかない。

図1の結果の解釈として次が考えられる。CPM 耐性に関与する主要因子 (main factor) は1つで、これによつて CPM 耐性が成立する。しかしその耐性の表現にはある条件因子が関与し、その条件因子によつて耐性度の表現に多少の差が出てくるのではないかということである。この場合、耐性表現型は主要因子の変化によつて成立したと考えて、one phenotype (1 表現型) と考えてもよいし、また僅少差のある multiple phenotypes (多表現型) と考えてもよいと思われる。またこのように考える以前の問題、すなわち図1にみられる耐性株の生残曲線の差が実験誤差によることも否定してしまうわけにはゆかない (図1の生残曲線の「ふれ」が実験誤差によるのであれば、1 表現型となる)。

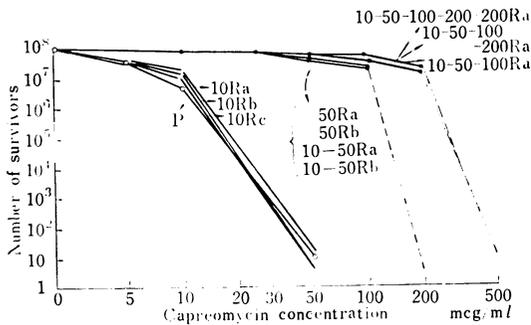
図2の H₃₇Rv 株の結果は、おそらく1 表現型と考えてよいように思われる。したがつてこの結果からみると、青山B株の場合も、1 表現型と考えたほうが考えやすい。

Fig. 1. Survival Curves for Clones of *M. tuberculosis* Aoyama-B Obtained by Different Capreomycin Concentrations



P is survival curve for the parent strain. "20 R", "50 R", "200 R", etc., are survival curves for clones derived from single colony obtained on 20 mcg/ml, 50 mcg/ml, and 200 mcg/ml, respectively, by the first step. "200-200 R" is a survival curve for a clone obtained by successive selections with 200 mcg/ml, first step, and then with 200 mcg/ml, second step. The end of dotted lines indicates that no surviving colony is found at this ratio.

Fig. 2. Survival Curves for Clones of *M. tuberculosis* H₃₇Rv Obtained by Different Capreomycin Concentrations



人型結核菌の耐性形式については、東村およびその協同研究者が系統的に研究したところである^{1)~14)}。その結果によれば、耐性形式は比較的明瞭に区別でき、VMの場合を例外として、その判定に迷うことはなかつた¹⁾。ただ VM の場合のみ例外で、本報の CPM の場合と全く同じ様相を示した⁵⁾。

耐性獲得形式

耐性獲得形式は Demerec¹⁵⁾ および Bryson & Szybalski¹⁶⁾ 以来、広く用いられる耐性形式記載方法の一つであるが、これは前記の耐性表現型の数と密接に関係する。CPM 耐性の場合、前記の表現型を一つと考えれば、耐性獲得形式は single-step pattern (obligatory single-step pattern) であり、多表現型と考えれば、facultative single-step pattern である。

SM および KM 耐性も facultative single-step pattern^{1)~4)} であるが、SM および KM の場合には、感性株 (親株) の示す耐性度から高耐性度にいる間に、小刻みの種々の耐性度の段階があるのに対して、CPM の場合には (VM の場合も同じ)、親株の耐性度が 10 mcg/ml であるのに対して、耐性株の耐性度は少なくとも 100 mcg/ml 以上で、この間に中間型というものがない。

耐性上限

耐性形式を規定する第3の要素は耐性上限である^{1)~17)}。耐性上限は親株の示す耐性度の倍数で記載するのが便利である¹⁾。この場合、耐性度の記載は、接種生菌数の影響を除いた再現性あるものにする必要がある。したがって「Actual Count 法」¹⁸⁾¹⁹⁾ によつて記載する必要がある。

CPM 耐性の場合、感性株の耐性度は 10 mcg/ml で、耐性上限は 100~500 mcg/ml である。すなわち耐性上限は親株耐性度の 10~50 倍である。これを SM および KM の上限無限大と比較すると大きい相違で、VM の上限 10~20 倍と類似している。

上述の CPM 耐性形式を SM, KM および VM 耐性形式と比較すると、表 1 に示すごとく、VM 耐性形式ときわめてよく似ている。

また CPM の静菌作用は、SM, KM, VM などと同

Table 1. Resistance Pattern to Streptomycin, Kanamycin, Viomycin and Capreomycin for *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and Aoyama-B

Number of resistance-phenotypes	SM	Multiple
	KM	Multiple
	VM	One (or multiple types with minor variation)
	CPM	One (or multiple types with minor variation)
Pattern of resistance development	SM	Facultative single-step
	KM	Facultative single-step
	VM	Single-step (or facultative single-step or multi-step*)
	CPM	Single-step (or facultative single-step*)
Upper limit of resistance	SM	Infinite
	KM	Infinite
	VM	10-to 20-fold increase (100 to 200 mcg/ml)**
	CPM	10-to 50-fold increase (100 to 500 mcg/ml)**

* With a wide first step.

** Determined by the "Actual Count" method. When used a massive inoculation for resistance determination, a thin membranous growth may occur on 1,000 to 2,000 mcg/ml. This is not due to "real resistance" but due to "pseudoresistance"²⁰⁾. If tested by the "Actual Count" method, the organisms grow no more on the concentrations.

じく発育遅延的である。すなわちある濃度に達すれば、感性菌の発育が急に停止するというような型 (INH の場合がこれに当たる) ではない。感性菌の発育速度は、CPM 濃度が高くなるにつれて、これに並行して遅くなる。このことは CPM 濃度が 0, 5, 10 mcg/ml と高くなるにつれて、集落の大きさが小さくなることから想像される。20 mcg/ml の濃度では、通常「Actual Count 法」では発育がみられないが、完全に感性菌の発育が停止しているわけではないから、接種菌量の大きい場合には、微小発育が集まって可視域に達し、薄膜を形成する。H₃₇Rv 株の場合には、このような薄膜が耐性菌の発育に干渉して、この濃度で耐性菌の発育がみられない。薄膜は感性菌よりなり、東村²⁰⁾のいわゆる「偽耐性」の現象である。このような偽耐性は、耐性上限の CPM 濃度 1,000 mcg/ml ないし 2,000 mcg/ml の領域でもみられる。この濃度には「Actual Count 法」では発育を認めないが、大接種菌量の培地では薄膜状発育がみられる。この薄膜をとつて「Actual Count 法」で再検しても、当該濃度には発育しない。すなわち薄膜形成は、真の耐性によるものではなく、偽耐性と同一現象によるものと思われる。

結 論

Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv 株および青山B株の Capreomycin (CPM) 耐性形式を研究した。耐性表現型の数は、1 表現型 (または互いに小差を示す多表現型) である。耐性獲得形式は、single-step pattern (または facultative single-step pattern) である。耐性上限は、親株耐性度の 10~50 倍で、「Actual Count 法」によれば、親株の耐性度 10 mcg/ml, 耐性上限 100~500 mcg/ml である。

以上の CPM 耐性形式を SM, KM および VM の耐性形式と比較すると、SM および KM とは明らかに異なり、VM の場合にきわめてよく似ている。

文 献

- 1) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 9 : 43, 1961.
- 2) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M. & Hayashi, M.: Jap. J. Genetics, 33 : 341, 1958.
- 3) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M. & Hayashi, M.: Jap. J. Genetics, 33 : 379, 1958.
- 4) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M., Hayashi, M., Torii, F. & Katsunuma, R.: Jap. J. Genetics, 34 : 205, 1959.
- 5) Tsukamura, M. & Yamamoto, M.: Jap. J. Microbiol., 3 : 355, 1959.
- 6) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M. & Hayashi, M.: Jap. J. Genetics, 34 : 43, 1959.
- 7) Tsukamura, M., Noda, Y. & Yamamoto, M.: Jap. J. Microbiol., 3 : 113, 1959.
- 8) Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 4 : 115, 1960.
- 9) Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 23 : 203, 1960.
- 10) Tsukamura, M., Noda, Y., Yamamoto, M. & Hayashi, M.: Jap. J. Microbiol., 3 : 17, 1959.
- 11) Tsukamura, M., Noda, Y., Hayashi, M. & Yamamoto, M.: Jap. J. Microbiol., 3 : 1, 1959.
- 12) Tsukamura, M., Toyama, H. & Tsukamura, S.: Jap. J. Tuberc., 11 : 36, 1963.
- 13) Tsukamura, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 85 : 584, 1962.
- 14) Tsukamura, M.: Acta Tuberc. Scand., 46 : 89, 1965.
- 15) Demerec, M.: J. Bacteriol., 56 : 63, 1948.
- 16) Bryson, V. & Szybalski, W.: Advances in Genetics, 7 : 1, 1955 (Academic Press, New York).
- 17) Canetti, G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 92 : 687, 1965.
- 18) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 12 : 46, 1964.
- 19) Canetti, G., Armstrong, A. R., Bartmann, K., Cetrangolo, A., Hobby, G. L., Lucchesi, M., Stewart, S. M., Sula, L., Tsukamura, M. & Schmiedel, A.: Bull. Inter. Union Tuberc., 37 : 185, 1966.
- 20) 束村道雄: 結核, 33 : 815, 昭 33.