

新抗生物質 Lividomycin の抗結核菌作用

東村道雄・水野松司

国立療養所中部病院

山本正彦

名古屋大学医学部第一内科教室

受付 昭和45年6月27日

ANTITUBERCULOUS ACTION OF A NEW ANTIBIOTIC, LIVIDOMYCIN*

—Effect on Experimental Tuberculosis of Mice and Cross
Resistance with Other Antituberculous Agents—

Michio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO and Masahiko YAMAMOTO

(Received for publication June 27, 1970)

In vitro and *in vivo* experimental studies were carried out on the antituberculous action of a new antibiotic, Lividomycin, discovered by the Kowa Company, Nagoya. *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v and Aoyama-B and tubercle bacilli recently isolated from sputa of patients were used in the study. The antibiotic is produced by *Streptomyces lividus* n. sp. and has a molecular formula C₂₉H₅₅N₅O₁₈ belonging to the aminocyclitol group.

Estimation of susceptibility (or drug resistance level) was carried out by the "actual count method"^{1)~3)}, using the Ogawa egg medium. The composition of the medium was as follows: Basic solution (1% KH₂PO₄ and 1% sodium glutamate), 100 ml; Whole eggs, 200 ml; Glycerol, 6 ml; 2% malachite green solution, 6 ml. The medium was poured in 8 ml quantities into tubes and made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes. Antituberculous agents were added to the medium before sterilization and the concentration of the agents was expressed as the concentration added itself. (Remark. The activity of kanamycin in the Ogawa egg medium was reduced to 25% when compared with that in the Löwenstein-Jensen medium.) The resistance degree by the actual count method was read as the highest concentration of drug on which a small inoculum, consisting of 20 to 100 viable units, was able to grow after incubation at 37°C for 4 weeks (or, in some cases, for 3 weeks). In other words, the degree of resistance was read in a series of tubes inoculated with small inocula ranging from 20 to 100 viable units; other series were discarded. The term "resistance" to a concentration of drug, as used here, corresponds to 0.5% or more growth in a particular concentration of drug in the proportion method³⁾.

The results obtained are as follows.

1. *In vitro* and *in vivo* tuberculostatic action of lividomycin on *M. tuberculosis*

Lividomycin inhibited the growth of *M. tuberculosis* in *in vitro* and *in vivo* experiments. It was effective against experimental tuberculosis in mice (Figures 1, 2 and 3 and Table 1).

2. Cross resistance in tubercle bacilli isolated from patients

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Chita-gun, Aichi-ken 474 Japan.

Tubercle bacilli isolated from patients, which were resistant to 500 $\mu\text{g/ml}$ or more kanamycin, were resistant to lividomycin, whereas the tubercle bacilli, which were resistant to 200 $\mu\text{g/ml}$ or less kanamycin, were susceptible to lividomycin (Table 2). The level of kanamycin resistance in tubercle bacilli from patients was closely related to the development of lividomycin resistance. Tubercle bacilli resistant to capreomycin were resistant to lividomycin, as well (Table 2). Tubercle bacilli resistant to all other drugs, streptomycin, isoniazid, *p*-aminosalicylate, ethambutol, ethionamide and cycloserine, were susceptible to lividomycin.

3. Cross resistance in *M. tuberculosis* H₉₇R_v and Aoyama-B

Kanamycin-resistant strains and capreomycin-resistant strains were resistant to lividomycin. Strains resistant to the other drugs remained susceptible to lividomycin (Table 1). Lividomycin-resistant strains were resistant to kanamycin, capreomycin and, to a less extent, to streptomycin (Tables 5 and 6). Lividomycin-resistant strain isolated from the H₉₇R_v strain was susceptible to viomycin, but that from the Aoyama-B strain was resistant to it. In conclusion, there is a "two way"-cross resistance relationship between lividomycin and kanamycin as well as between lividomycin and capreomycin. There is a "one way"-cross resistance relationship between lividomycin and streptomycin (Tables 1, 5 and 6).

4. Development of lividomycin resistance in *M. tuberculosis*

Spontaneously lividomycin-resistant mutants were found in the H₉₇R_v and Aoyama-B strains at rates of 10^{-5} to 10^{-6} . The mutants grew very slowly on the primary isolation medium and the colonies of the mutants appeared as late as after incubation for 8 weeks. However, if transferred to fresh medium, these mutants could grow at a normal growth rate (Table 4).

5. Bacteriostatic action on the mycobacteria other than *M. tuberculosis*

The mycobacteria other than *M. tuberculosis* were usually not so susceptible to lividomycin as *M. tuberculosis* (Table 3).

緒 言

Lividomycin (LM) は興和株式会社薬品部によつて発見された新抗生物質で、*Streptomyces lividus* n. sp. (ATCC 21178) によつて産生され、 $\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{18}$ (分子量 761.77) の分子式をもち、aminocyclitol 群に属する。われわれは今回、LM のサンプルを興和株式会社から分与され、その抗結核菌作用に関する基礎実験を行なつたので、ここに報告する。

実 験 方 法

菌株 *Mycobacterium tuberculosis* H₉₇R_v 株および青山 B 株およびそれから分離した各種抗結核剤耐性株を用いた。これらは、いずれも単個集落に由来し、9~13 年間薬剤なしの卵培地に保存されて、なお耐性度が変わらないことを確かめた性状の安定した株である。このほか 1969 年度に新たに患者から分離した新鮮分離患者株も実験に供した。

耐性度の測定 耐性度の測定はすべて東村¹⁾⁻³⁾のいう "Actual count 法" を用いた。すなわち接種生菌数による耐性度の変動を除外するため、生菌単位 20~100 を接

種したときに 37°C 4 週後に発育する最高薬剤濃度で耐性度を測定した。この方法は原理的には、Canetti など⁴⁾のいう "Proportion method" と同じであるが、表現方法が単純化されている。実施方法を簡単に述べれば、まず被検菌を 1% 小川培地斜面に 37°C 3~4 週培養し、菌を白金耳でとつて、ガラス玉コルペンに入れて約 10 分間振盪する。これに生理的食塩水を加えて、湿菌量 2~5 mg/ml の菌液を作り、これを 10 倍希釈して 10^{-5} 液まで作る。接種には 10^0 ~ 10^{-5} 液まで、6 種の菌液を用い、0.02 ml ずつ渦巻白金耳で接種し、ただちにゴム栓を施して 37°C に 4 週間培養する。control 培地 (薬剤なし) に 20~100 集落を示す組で、発育の認められる最高濃度で耐性度を表現する。このように小生菌単位の接種量を用いる利点は、判定が明確で再現性が高いことにある。

各種の抗結核剤は滅菌前の 1% 小川培地に添加し、添加濃度をそのまま表示した。培地は通常 10 本を 1 組とし、うち 1 本は control 培地である。同じ培地 6 組 (60 本) を耐性度の測定に用いる。したがつて、たとえば H₉₇R_v 株の 10 種の薬剤の耐性度の測定には、1 薬剤 60 本、計 600 本の培地を用いた。

Table 1. Susceptibility to Lividomycin of Various Drug-resistant Strains of *M. tuberculosis* H₃₇R_v and Aoyama-B

Strain	Concentration of lividomycin (μg/ml)							
	400	200	100	50	25	12.5	6.3	0
H ₃₇ R _v parent	—	—	—	—	+	+	+	+
H ₃₇ R _v streptomycin-resistant *1	—	—	—	—	+	+	+	+
H ₃₇ R _v PAS-resistant *2	—	—	—	—	+	+	+	+
H ₃₇ R _v isoniazid-resistant *3	—	—	—	—	+	+	+	+
H ₃₇ R _v kanamycin-resistant *4	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ R _v viomycin-resistant *5	—	—	—	(+)	+	+	+	+
H ₃₇ R _v capreomycin-resistant *6	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₃₇ R _v ethionamide-resistant *7	—	—	—	—	+	+	+	+
H ₃₇ R _v ethambutol-resistant *8	—	—	—	—	+	+	+	+
Aoyama-B parent	—	—	—	—	+	+	+	+
Aoyama-B streptomycin-resistant *9	—	—	—	—	+	+	+	+
Aoyama-B PAS-resistant *10	—	—	—	—	+	+	+	+
Aoyama-B isoniazid-resistant *11	—	—	—	—	+	+	+	+
Aoyama-B kanamycin-resistant *12	+	+	+	+	+	+	+	+
Aoyama-B capreomycin-resistant *13	+	+	+	+	+	+	+	+
Aoyama-B ethionamide-resistant *14	—	—	—	—	+	+	+	+

Estimated by the "actual count method".

*1 Resistant to 1,000 μg/ml. *2 Resistant to 1,000 μg/ml. *3 Resistant to 100 μg/ml. *4 Resistant to 1,000 μg/ml. *5 Resistant to 100 μg/ml. *6 Resistant to 100 μg/ml. *7 Resistant to 100 μg/ml. *8 Resistant to 10 μg/ml. *9 Resistant to 1,000 μg/ml. *10 Resistant to 1,000 μg/ml. *11 Resistant to 1,000 μg/ml. *12 Resistant to 1,000 μg/ml. *13 Resistant to 100 μg/ml. *14 Resistant to 100 μg/ml.

(): Minute colonies.

動物実験 動物実験には、体重 20±2g の CF₁ 系マウスを用いた (雌雄混合)。動物実験の被検株には、*M. tuberculosis* H₃₇R_v 株を用い、2 種の方法を用いた。第 1 の方法は、被検株を Tween なしの TB-broth (Difco) に 7 日間培養し、それを比濁によつて湿菌量 10mg/ml の濃度に調整し、その 0.2ml ずつを、マウスの尾静脈から静注した。第 2 の方法は、1% 小川培地に発育した H₃₇R_v 株をガラス玉入りコルペンで振盪した後、湿菌量 10mg/ml の菌液とし、その 0.2ml ずつを腹腔内に注射した。治療は菌接種の翌日から開始し、抗結核剤は所定量をマウスの背部に皮下注射した。治療効果は肺および脾の生菌単位数で示した。すなわち各治療群から 3 匹のマウスをとつて殺し、その肺および脾をとつて秤量し、3 匹分を合わせてホモゲナイザーで均一化した。これに 10 倍量の 1% NaOH 液を加えて organ homogenate を作り、これを生食水で 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ に希釈し、原液とともに計 5 種の希釈液から 0.02ml ずつを 1% 小川培地に接種した。1% 小川培地は 1 希釈液について 2 本用いた。37°C 4 週培養後に集落数を数え、集落数と希釈度および臓器の重量から、マウス 1 匹当たりの肺または脾に含まれる生菌単位数を計算した。抗結核剤の治療効果が大きいほど、未処置の control マウスに比して、肺および脾内の生菌単位数が減少すると考えられ

る。

使用した LM は、Lot No. 5, 0.670 mg activity value/ mg の品である。

使用した抗結核剤およびその略号は次の通りである。dihydrostreptomycin sulfate (SM), sodium *p*-aminosalicylate (PAS), isonicotinic acid hydrazid (INH), kanamycin sulfate (KM), capreomycin sulfate (CPM), viomycin sulfate (VM), ethionamide (TH), ethambutol (EB), cycloserine (CS), Lividomycin (LM) である。LM 量は活性 mg 量で示した。

実験成績

I. 各種薬剤耐性菌の Lividomycin 感受性

M. tuberculosis H₃₇R_v 株および青山 B 株から実験室で分離した種々の薬剤耐性菌の LM に対する感受性を "actual count 法" (1% 小川培地使用) で測定した。その結果を表 1 に示す。感性株の LM 耐性度は、H₃₇R_v 株および青山 B 株ともに 25mcg/ml であつた。SM, PAS, INH, TH, EB, VM 耐性菌の感受性 (LM 耐性度) も原株と同じであつた。しかし KM 耐性菌および CPM 耐性菌は LM 400mcg/ml 培地にも発育し、明らかに LM 耐性であつた。

II. 患者分離株の Lividomycin 感受性

Table 2. Susceptibility to Lividomycin of Various Strains Isolated from Tuberculous Patients Resistant to Kanamycin, Capreomycin or Both Drugs

Strain	Resistance level*										
	Ogawa egg medium containing:										
	No drug	Kanamycin (μg/ml)			Capreomycin (μg/ml)			Lividomycin (μg/ml)			
	100	200	500	50	100	200	25	50	100	200	
1. S. Toda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. S. Hayano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. M. Satta	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. G. Hoshino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. K. Uchida	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6. K. Konishi	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7. S. Munehara	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
8. S. Kanamaru	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
9. K. Kimura	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
10. T. Kawai	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
11. K. Ri	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
12. G. Yamazaki (3)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
13. Y. Suzuki	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
14. H. Okubo	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
15. G. Yamazaki (2)	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
16. F. Banno	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
17. S. Mashita	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
18. Y. Hasegawa	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
19. G. Yamazaki (1)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
20. S. Nakai	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
21. H. Yoshida	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
22. M. Suzuoki	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
23. C. Itsushima	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
24. T. Watanabe	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
25. C. Kawanishi	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
26. Y. Imai	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
27. S. Watanabe	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

* Determined by the "actual count method".

Strains Nos. 25, 26 and 27 are resistant to streptomycin, isoniazid, PAS, ethambutol and ethionamide.

上述の基礎実験で、KM 耐性菌と CPM 耐性菌が LM 耐性であることが分かったので、患者から新たに分離した KM 耐性株、CPM 耐性株および KM・CPM 2 剤耐性株について同じく "actual count 法" で LM 耐性を測定した。同時に KM 耐性度または CPM 耐性度と LM 耐性との関係を調べるために、KM 耐性度および CPM 耐性度も合わせて "actual count 法" で測定した。その結果を表 2 に示す。

KM・CPM 2 剤耐性株は明らかに LM 耐性である。LM 耐性度は 200mcg/ml まで調べたが、感性株の LM 耐性度は 25mcg/ml であるので、8 倍以上の耐性度上昇である。

KM 高耐性菌 (KM 500mcg/ml 以上耐性菌) は既報のごとく CPM 耐性であるので⁴⁾⁵⁾、KM 高耐性のみの

影響は観察しがたい。表 2 の No. 13 および No. 14 の 2 株は、例外的に KM 高耐性であるのに CPM 感性であったが、この株も明らかに LM 耐性である。したがって KM 高耐性菌は LM 耐性になっているといえる。

次に KM 低耐性菌 (KM 100 ないし 200mcg/ml 耐性菌) は、5 株中 2 株が LM 耐性がやや上昇しているが (2 倍上昇)、他の 3 株は感性にとどまっている。したがって KM 低耐性菌はおおよそ LM 感性にとどまるか、せいぜい軽微な LM 耐性度の上昇を起こすにすぎないと思われる。

CPM のみに耐性の菌株は、5 株を得ることができた。CPM 耐性菌は 5 株とも LM 耐性度が 2 ないし 8 倍に上昇している。すなわち CPM 耐性の出現は LM 耐性を誘導するといえる。

SM, PAS, INH, EB, TH 5 者耐性菌は3株 (No. 25, No. 26 および No. 27) 検査することができたが、これら3株の LM 耐性度は 25mcg/ml で、LM 耐性度に変化はない。

以上のごとく、in vitro 分離耐性株で得た結果は、そのまま患者分離耐性株でも認められ、KM 高度耐性菌および CPM 耐性菌は、LM に接触する前から LM 耐性になっていると結論された。

III. 動物体内における Lividomycin の治療効果

動物実験は CF₁ 系マウス (体重 20g±2g) を用いて、静注による攻撃と腹腔内注射による攻撃と2種の実験を行なった。治療効果は、マウスの肺および脾の生菌単位数を指標として観察した。

(A) 静注攻撃

M. tuberculosis H₃₇R_v の湿菌量 2mg (生菌単位: 2×10⁷) を CF₁ 系マウス (雌雄混合) の尾静脈に静注したのち、5群に分けて治療を行なった。

(1) 対照群 (生食水 0.2ml を1週3回注射した。注射は月、水、金に行なった。以下も同様。)

- (2) LM 0.7mg を1週3回皮下注射
- (3) LM 1.4mg を1週3回皮下注射
- (4) KM 1mg を1週3回皮下注射
- (5) SM 1mg を1週3回皮下注射

治療4週後および6週後に各群から3匹ずつのマウス

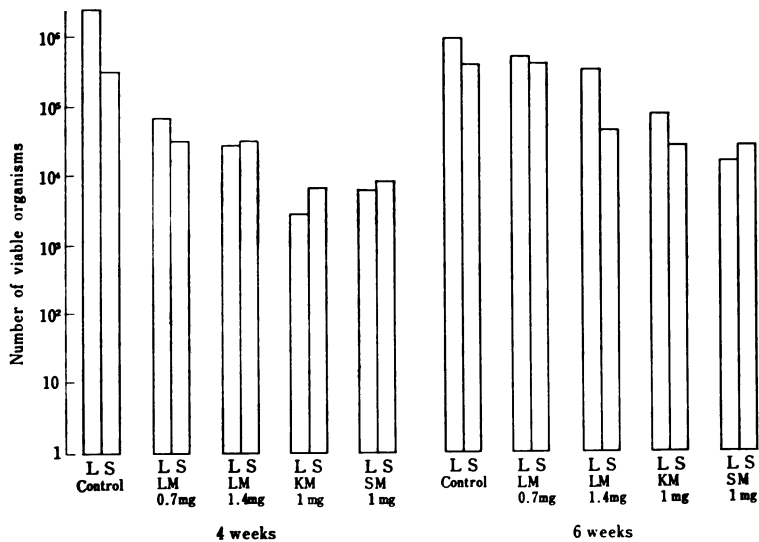
をとつて、その肺および脾の生菌単位数を調べ、1匹当たりの肺または脾に含まれる生菌単位数を計算した成績を図1に示す。この成績から、LM 0.7mg および LM 1.4mg の治療とも効果はあるが、KM 1mg または SM 1mg よりやや劣る印象を受ける。

(B) 腹腔内攻撃

最近の米国における報告では⁹⁾⁷⁾、腹腔内接種法は、術者、針の大きさなどによつて必ずしも正確に腹腔内に接種されず、ある程度の接種量のバラツキは避けがたいという報告がある。しかし、このようなバラツキは静脈内接種法についても起こりうるはずである。上記の報告では、腹腔内接種と静脈内接種の比較は行なわれていない。最近のわれわれの研究室における抗酸菌の接種実験では、腹腔内接種法は静注法に優るとも劣らない成績が得られた (未発表成績)。したがつて、本実験では湿菌量 2mg (6.6×10⁶ 生菌単位) の腹腔内接種を行なった。接種菌は *M. tuberculosis* H₃₇R_v 株で、マウスは CF₁ 系の雌マウス (体重 20±2g) を用いた。治療法は次のごとくである。

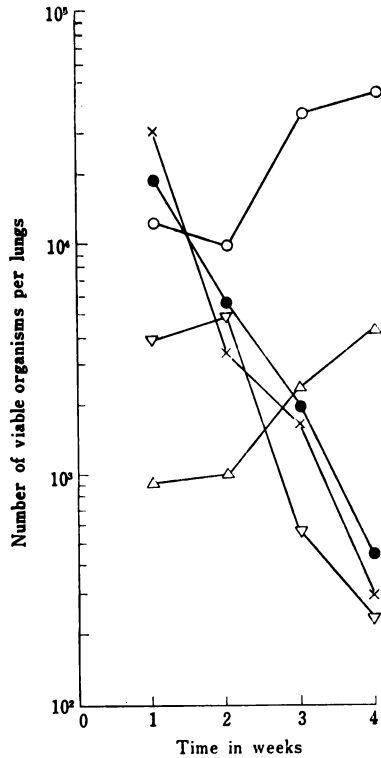
- (1) 対照群 (生食水 0.2ml を毎日皮下注射)
- (2) LM 1.4mg を毎日皮下注射
- (3) SM 1mg を毎日皮下注射
- (4) KM 2mg を毎日皮下注射
- (5) CPM 2mg を毎日皮下注射

Fig. 1. Comparison of Therapeutic Effect of Lividomycin, Kanamycin and Streptomycin



The therapeutic effect was expressed as the number of viable challenge organisms in a whole organ of mouse. The column in the figure shows an average in three mice (CF₁ strain of mice, 20±2g). The mice were inoculated intravenously with 2 mg of moist weight of *M. tuberculosis* H₃₇R_v (2×10⁷ viable units) and treated with the following regimens: (1) Control (Injected subcutaneously three times weekly with 0.2 ml of saline); (2) LM 0.7 mg (Injected subcutaneously three times weekly with 0.7 mg of lividomycin); (3) LM 1.4 mg (Injected subcutaneously three times weekly with 1.4 mg of lividomycin); (4) KM 1 mg (Injected subcutaneously three times weekly with 1 mg of kanamycin); (5) SM 1 mg (Injected subcutaneously three times weekly with 1 mg of dihydrostreptomycin). The number of tubercle bacilli in the organ was calculated after 4 weeks and after 6 weeks of treatment. L: The number of viable organisms in the lungs of a mouse. S: The number of viable organisms in the spleen of a mouse.

Fig. 2. Comparison of Therapeutic Effect of Lividomycin, Streptomycin, Kanamycin and Capreomycin



The figure indicates the number of viable challenge organisms in the lungs of a mouse, which is expressed as an average in three mice.

The mice of CF₁ strain (female, 20±2g) were inoculated intraperitoneally with 2 mg of moist weight (6.6 × 10⁶ viable units) of *M. tuberculosis* H₃₇R_v. The mice were treated with the following regimens: (1) Control O—O (Injected subcutaneously with 0.2 ml of saline daily); (2) LM x—x (Injected subcutaneously with 1.4 mg of lividomycin daily); (3) SM ▽—▽ (Injected subcutaneously with 1 mg of dihydrostreptomycin daily); (4) KM ●—● (Injected subcutaneously with 2 mg of kanamycin daily); (5) CPM △—△ (Injected subcutaneously with 2 mg of capreomycin daily).

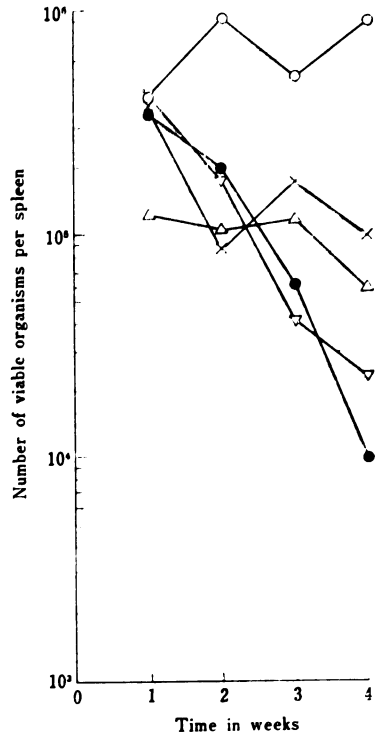
治療効果を肺および脾内の生菌単位数で示すと図2および図3のごとくである。

肺の生菌単位数の推移からみると、4つの治療法はいずれも有効であるが、SM 1mg, KM 2mg, LM 1.4mg がほとんど同じで、CPM 2mg が劣る印象を受ける(図2)。

次に脾の生菌単位数の推移からみると、SM 1mg および KM 2mg のほうが、LM 1.4mg および CPM 2mg よりやや優る印象を受ける(図3)。

以上の結果から、LM 1.4mg 毎日法は CPM 2mg 毎日法にほぼ匹敵し、SM 1mg または KM 2mg 毎日法に若干劣るかに思われる。そして LM が動物体内でも有効であることは疑いないと思われる。

Fig. 3. Comparison of Therapeutic Effect of Lividomycin, Streptomycin, Kanamycin and Capreomycin



The figure indicates the number of viable challenge organisms in the spleen of a mouse, which is expressed as an average in three mice. See the legend of Fig. 2.

(1) Control O—O; (2) LM x—x; (3) SM ▽—▽; (4) KM ●—●; (5) CPM △—△

IV. 非定型抗酸菌の Lividomycin 感受性

非定型抗酸菌の LM 感受性検査は定量的方法によらず、1% 小川培地で LM の希釈列を作り、これに被検菌を1白金耳ずつ塗抹接種し、37°C 3週培養後に、対照とはほぼ同等度の発育を示す最高濃度を記録する方法によつた。種々の非定型抗酸菌の LM 感受性測定結果を表3に示す。種々の抗酸菌の中で、最も LM に対して高い感受性を示したのは、*M. tuberculosis* であり、病原性非定型抗酸菌は低い感受性を示した。したがって LM を非定型抗酸菌感染症の治療に使用しうる可能性は少ないと思われる。

V. *M. tuberculosis* の Lividomycin 耐性菌

M. tuberculosis H₃₇R_v 株および青山 B 株の LM 耐性発現の様相はかなり特異的であつた。

1% 小川培地に LM の希釈列を作り、種々の濃度の菌液を接種した場合、おおよそ 20~50 集落を生じる小接種菌量を用いると、LM 25mcg/ml に発育するが、50 mcg/ml には発育しないか、ときに微小集落を形成する。しかし 10⁷ 生菌単位のごとき大接種菌量を用いると、50mcg/ml ないし 100mcg/ml に薄膜状の全面発

Table 3. Susceptibility to Lividomycin of Various Mycobacteria

Species	Number of strains tested	Concentration of Lividomycin ($\mu\text{g/ml}$)							
		400	200	100	50	25	12.5	6.3	0
<i>M. tuberculosis</i>	5	0	0	0	(2)	5	5	5	5
<i>M. kansasii</i>	10	2	8	10	10	10	10	10	10
<i>M. marinum</i>	5	1	3	5	5	5	5	5	5
<i>M. avium</i>	10	6	7	9	9	10	10	10	10
<i>M. intracellulare</i>	10	3	5	10	10	10	10	10	10
<i>M. scrofulaceum</i>	10	7	10	10	10	10	10	10	10
<i>M. fortuitum</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>M. abscessus</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>M. borstelense</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>M. phlei</i>	5	0	0	0	5	5	5	5	5
<i>M. smegmatis</i>	5	0	0	5	5	5	5	5	5
<i>M. aurum</i>	5	0	2	2	5	5	5	5	5
<i>M. nonchromogenicum</i>	10	4	9	10	10	10	10	10	10
<i>M. gastri</i>	5	0	0	0	3	5	5	5	5

The number in the table indicates the number of strains showing positive growth similar to that on the control medium containing no agent. In this experiment, the medium was inoculated with one loopful of the test strain and incubated at 37°C for 3 weeks.

育を示す。この 100 mcg/ml に発育した菌膜を一たん薬剤なしの 1% 小川培地に継代して、その LM 耐性を調べてみると、“actual count 法”で示される耐性は感性株と同じである。すなわち 100 mcg/ml に薄膜状に発育したのは、実は感性菌であつて、いわゆる耐性菌ではないことが分かる。この現象は、いわゆる「偽耐性」(Pseudoresistance)⁸⁾の現象であつて、すでに SM, KM などで行われるように、“actual count 法”の阻止濃度をやや上回る濃度帯では、菌の発育が完全に停止しているのではなくて、遅延しているにすぎない。したがつて大接種菌量を用いると、この発育遅延を起こしている感性菌の発育が集まつて薄膜状に見えるものと考えられる。

次に 200 mcg/ml では、 10^7 生菌単位程度の接種菌量を用いると、4 週後に 10 ないし数十コの小さい集落が認められる。この集落をとつて増菌し、LM 耐性を調べてみると、“actual count 法”で 50 mcg/ml に発育する。すなわち、この菌の耐性はほぼ 2 倍の上昇を起こしているといえる。この現象は注目すべき現象で、はじめ 200 mcg/ml の培地に小集落を形成する菌の耐性は、一見 8 倍の上昇に見えるけれども、実は 2 倍程度の耐性上昇にすぎないことが分かる。この耐性菌の耐性は遺伝的に不安定で、LM を含まない 1% 小川培地に 2 代継代して“actual count 法”測定を再び行なつてみると、感性株と同じ耐性度になつてしまつている。以上のように、一過性に 2 倍程度の耐性上昇を起こした耐性菌を「不安定な耐性菌」(unstable resistant organisms)と呼ぶこととする。後述するように、この「不安定な耐

Table 4. Development of Resistance to Lividomycin in *M. tuberculosis* H₃₇R_v and Aoyama-B

Strain	Mutation frequency*
H ₃₇ R _v	2×10^{-6}
Aoyama-B	7×10^{-6}

* Ratio of resistant mutants per total viable population of the parent strain not exposed previously to lividomycin.

Resistant mutants are highly dysgonic in primary isolation medium and appear as colonies on the Ogawa egg medium containing 200 to 400 $\mu\text{g/ml}$ lividomycin first after incubation at 37°C for 8 weeks. Minute and/or small colonies, which appear after incubation at 37°C for 4 weeks on the Ogawa egg medium containing 100 to 200 $\mu\text{g/ml}$ lividomycin, are not real resistant mutants. At resistance tests made by the “actual count method” immediately after isolation, these “unstable” resistant organisms show a 2-fold increase in resistance, but they show no more such resistance if transferred twice on Ogawa egg medium containing no agent. These are, therefore, not “real” resistant mutants but “unstable” resistant organisms, probably due to “phenotypic resistance”⁸⁾.

性菌)の他抗結核剤に対する感受性は、感性株と同じである。この点、KM および CPM と交叉耐性を示す真の LM 耐性菌 (後述) とは全く異なつている。「不安定な耐性上昇」の原因はおそらく「表現型耐性」⁸⁾ではないかと想像される。

以上の経過から、はじめは遺伝的に安定した耐性菌 (resistant mutants) を得ることは困難であるかにみられたが、次のようにして真の耐性菌⁸⁾を得ることができた。

前に東村⁹⁾は、耐性菌といえども薬剤によつて多少とも発育速度を修飾されることを観察した。たとえば SM

Table 5. Susceptibility to Various Antituberculous Drugs of Lividomycin-susceptible and Lividomycin-resistant Strains of *M. tuberculosis* H₃₇R_v

Drug	Strain	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)									
		500	250	125	63	32	16	8	4	2	0
LM	LM-S	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	LM-R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CPM	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
VM	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SM	LM-S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EB	LM-S	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
TH	LM-S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CS	LM-S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Drug	Strain	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)									
		5	2.5	1.25	0.63	0.32	0.16	0.08	0.04	0.02	0
INH	LM-S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
PAS	LM-S	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Abbreviation.

LM-S: Lividomycin-susceptible strain; LM-R: Lividomycin-resistant strain; LM: Lividomycin; KM: Kanamycin; CPM: Capreomycin; VM: Viomycin; SM: Dihydrostreptomycin; EB: Ethambutol; TH: Ethionamide; CS: Cycloserine; INH: Isoniazid; PAS: Sodium *p*-aminosalicylate.

Drug resistance level was determined by the "actual count method" after incubation at 37°C for 3 weeks.

"Unstable" resistant strain (refer to Table 4) showed the same resistance levels to all antituberculous drugs, except for lividomycin, as did the parent lividomycin-susceptible strain. The "unstable" lividomycin-resistant strain showed a two-fold increase in resistance to lividomycin.

耐性菌は SM 培地で感性菌が薬剤なし培地で発育するのと同じ速度で発育するのではなく、SM 耐性菌といえども SM によつて発育が遅延することを観察した。感性菌と耐性菌との差は、all or nothing のような差ではなく、SM による発育速度の修飾が量的に異なるにすぎないことを見出した。このような事実にかんがみ、LM 耐性菌の発育が LM によつてかなり遅延するのではないかと想定して、培養日数を 8 週に延長して観察してみた。その結果、LM 200 mcg/ml ないし 400 mcg/ml 培地に少数のかなり大きい集落が発育してくるのがみられた。この集落は、先に 4 週後に観察された小集落とは別で、4 週後の小集落がその後培養日数を増しても大きくならないのに反して、8 週後の大集落は徐々に集落のサイズを増してくる点で異なっている。この大集落は、

H₃₇R_v 株で感性菌 (生菌数) 10⁶ 当り 2 コの割合で、青山 B 株で感性菌 (生菌数) 10⁶ 当り 7 コの割合で見出された。この大集落を形成する耐性菌は初代分離時には LM 培地できわめて緩徐にしか発育しないが、次に薬剤なし 1% 小川培地に継代すると発育速度は感性菌とかわらず、LM 培地でも初代よりはるかに速く発育する。しかも耐性度は、"actual count 法" で測定して 200 mcg/ml ないし 400 mcg/ml であるから、感性菌の 8 倍ないし 16 倍の耐性度を示す。

以上を要約すれば、*M. tuberculosis* H₃₇R_v 株および青山 B 株の LM 耐性菌 (resistant mutants) は、感性株中に 2×10⁻⁶ または 7×10⁻⁶ の割合で見発される。耐性菌は初代分離のさいには、LM 培地での発育速度が遅い (著明な dysgonic growth を示す) ので、分離に

Table 6. Susceptibility to Various Antituberculous Drugs of Lividomycin-susceptible and Lividomycin-resistant Strains of *M. tuberculosis* Aoyama-B

Drug	Strain	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)									
		500	250	125	63	32	16	8	4	2	0
LM	LM-S	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	LM-R	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CPM	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
VM	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SM	LM-S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
EB	LM-S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TH	LM-S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CS	LM-S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Drug	Strain	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)									
		5	2.5	1.25	0.63	0.32	0.16	0.08	0.04	0.02	0
INH	LM-S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
PAS	LM-S	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	LM-R	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

As to abbreviation, refer to Table 5.

(+): Growth variable.

は8週培養を必要とする。一たん分離されたLM耐性菌の耐性度は安定で、発育速度も感性菌と変りない。

VI. Lividomycin 耐性菌の他抗結核剤感受性

M. tuberculosis H₃₇R_v 株および青山B株の感性株(原株), 「不安定な」耐性株および真の耐性株の種々の抗結核剤に対する感受性測定結果を表5および表6に示す。ここに使用した(真の)LM耐性株はいずれも培養期間を8週まで延長し、いわゆる“one step-selection”によつて得たものである。耐性度の測定は“actual count法”によつた。上述したごとく、一たん分離された耐性菌の2代目以降の培地における発育速度は、感性菌と異ならないので、耐性度測定の判定は、37°C 3週後に行なつた。

結果は表5および表6に示すごとくで、感性菌と比較して約8倍のLM耐性度上昇を示すLM耐性菌は、同時にKMおよびCPMにも耐性を増している。またSMに対する耐性度も軽度(2~4倍)に上昇している。

他の抗結核剤に対する耐性度は変わっていない。ただVMに対する態度だけは、菌株特異性があり、H₃₇R_v株のLM耐性菌ではVM耐性度は不変であるが、青山B株のLM耐性菌ではVM耐性度が上昇している。

「不安定な耐性株」の態度は感性株と同様であり、この株の耐性上昇の原因は真の耐性株のそれとは全く異なることが裏がきされた(成績省略)。

考 察

以上の実験成績を総括すれば次のごとくいえる。(1) LMは*in vitro*でも*in vivo*でも*M. tuberculosis*に対して発育阻止作用を示す。(2) LMはKMまたはCPMとの間に交叉耐性を示す。KM耐性菌またはCPM耐性菌はLM耐性であり、逆にLM耐性菌もKMおよびCPM耐性である。SM耐性菌はLM感性であるが、LM耐性菌は軽度のSM耐性上昇を示す。また青山B株のLM耐性菌はVMにも耐性上昇を示した。

(3) 患者から分離した KM 高耐性菌 (KM 500mcg/ml 以上耐性) および CPM 耐性菌は LM 耐性である。
 (4) LM 耐性菌の性質は特異的で、初回に LM 培地で分離するさいには発育が遅く、集落発見に 8 週培養を必要とする。しかし次に継代培養すれば通常の発育速度で発育する。

以上の結果から考えると、LM が——副作用の問題は別として——人体内でも抗結核菌作用を発揮しうることにはほぼ確かであろうが、さて実用に耐える抗結核剤となりうるかどうかという点になると、かなり問題がある。最大の難点は既存の抗結核剤 KM および CPM と交叉耐性があるという点にある。

他の問題点は、LM の耐性発現の特異性である。上述の「みかけ」上の耐性上昇の困難さが人体内でも有利な性質となりうるであろうか。もちろん確実な答えは、空洞のあるヒトの結核症に実際に LM を使用してみないと分からないが、われわれは次のように想像する。遺伝的に安定な LM 耐性菌は、LM に接触したことのない *M. tuberculosis* の population 中におおよそ 10^{-5} ~ 10^{-6} の率で含有されている。この耐性菌 (spontaneous mutants) は、LM を投与された患者の空洞内ではじめは緩徐に発育するであろうが、おそらくある時期がくると発育速度が速くなり、他の抗結核剤使用のさいと同じように、LM 耐性菌の集団が出現してくるであろうと思われる。したがってこの LM 耐性菌の性状をもつて、とくに有利な点と速断するわけにはゆくまいと考える。

結 論

新抗結核剤 Lividomycin (LM) について、*M. tuberculosis* H₉₇R_v 株および青山 B 株ならびに患者分離株を用いて試験管内実験および動物実験を行なった結果、次の結論を得た。

(1) LM は試験管内および動物体内で結核菌の発育を阻止する。

(2) *M. tuberculosis* H₉₇R_v 株および青山 B 株の kanamycin (KM) 耐性株および capreomycin (CPM) 耐性株は LM 耐性である。他の抗結核剤耐性株は LM 感性である。逆に H₉₇R_v 株および青山 B 株の LM 耐性株は、KM および CPM 耐性である。また streptomycin (SM) に対しても軽度の耐性上昇を示す。

したがって LM と KM または LM と CPM の間に

は、「両側通行」の交叉耐性が存在する。LM と SM の間には、LM 耐性→SM 耐性の方向の「片側通行」の交叉耐性が存在する。ただし、この交叉耐性の程度は軽度である。LM と viomycin (VM) の間では、青山 B 株についてのみ、LM 耐性→VM 耐性の「片側通行」の交叉耐性がみられた。他の抗結核剤との間には、交叉耐性はみられなかつた。

(3) 結核患者から新たに分離された KM 高耐性株および CPM 耐性株も LM に耐性であつた。KM 耐性と LM 耐性との間の交叉耐性では、耐性度が重要な因子であつて、KM 500mcg/ml 以上耐性菌は LM 耐性であつたが、KM 200mcg/ml 以下耐性菌は LM 感性であつた。

(4) *M. tuberculosis* H₉₇R_v 株および青山 B 株の LM 耐性菌は、LM にふれたことのない感性株の中に 10^{-6} ~ 10^{-8} の頻度で見出される。この耐性菌の初代分離培地における発育は緩徐であるので、耐性菌集落を見つけるのには 8 週の培養期間を要する。ただし 2 代目以後の継代では発育速度は感性菌と変わらない。

(5) *M. tuberculosis* 以外の抗酸菌の LM 感受性は比較的低い。

本研究に対してご指導をいただいた国立名古屋病院長日比野進名誉教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 東村道雄：医学と生物学，49：87，昭 33。
- 2) Tsukamura, M. : Jap. J. Tuberc., 12 : 46, 1964.
- 3) Canetti, G., Armstrong, A. R., Bartmann, K., Cetrangolo, A., Hobby, G. L., Lucchesi, M., Stewart, S. M., Sula, L., Tsukamura, M. and Schmiedel, A. : Bull. Int. Un. Tuberc., 37 : 185, 1966.
- 4) 東村道雄・外山春雄・水野松司・東村純雄：結核，42：399，昭 42。
- 5) Tsukamura, M. : Amer. Rev. Resp. Dis., 99 : 780, 1969.
- 6) Steward, J. P., Ornellas, E. P., Beernink, K. D. and Northway, W. H. : Appl. Microbiol., 16 : 1418 . 1968.
- 7) Miner, N. A., Koehler, J. and Greenaway, L. : Appl. Microbiol., 17 : 250, 1969.
- 8) 東村道雄：結核，33：815，昭 33。
- 9) Tsukamura, M. : J. Antibiotics, Ser. A, 12 : 105 : 1959.