

Mycobacterium tuberculosis (H₃₇Rv) の Lividomycin 耐性形式

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和 46 年 5 月 25 日

RESISTANCE PATTERN OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (H₃₇Rv) TO A NEW ANTIBIOTIC, LIVIDOMYCIN*

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

(Received for publication May 25, 1971)

The resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Rv to a new antibiotic lividomycin¹⁾ was studied using a technique previously described²⁾. The results obtained are shown in Fig. and Table.

Mycobacterium tuberculosis strain H₃₇Rv showed only one phenotype of resistance, which is shown as a survival curve in figure, and the upper limit of resistance was a 400 µg/ml level. Repeated selection by the drug was ineffective to obtain a more resistant strain. The organism was either resistant to 25 µg/ml of the drug, as was the parent strain not exposed previously to the drug, or resistant to 400 µg/ml of the drug. The resistance pattern was shown to be a single-step pattern.

Resistant mutants, which give rise to resistant strains capable of growing on the 400 µg/ml level of the drug, were obtained at a rate of 2×10^{-6} among the organisms of the parent strain.

The most striking finding was that the resistant mutants are very dysgonic at primary isolation and the colonies of the resistant mutants could be detected only after incubation at 37°C for 8 weeks. The strains could grow showing a normal growth rate at the second and successive transers.

Lividomycin (LM) は最近、興和株式会社研究所で開発された新しい抗生物質である。その試験管内抗結核菌作用、交叉耐性およびマウス実験結核症の治療効果については前報¹⁾に述べた。抗結核剤の耐性形式²⁾は、耐性研究の基礎をなすので、本報では *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv 株の LM 耐性形式について実験した結果を報告する。

方 法

被検株として、*M. tuberculosis* H₃₇Rv 株を用いた。培地は 1% 小川培地を用い、研究方法は既報²⁾の方法を

使用した。

耐性形式研究の方法について

研究方法の要点は、種々の濃度で分離される単個集落の生残曲線 (survival curve) を調べることにある。

耐性形式を調べるにあたって液体培地に発育した菌の一定量を継代する方法または固形培地に発育した多数集落を集めて population 構成を調べる方法では、種々の遺伝的性質の菌の集りを調べることになるので、個々の菌に起こる遺伝的变化を知ることはできない。

液体培地継代法では、継代に使用する菌集団に耐性菌が含まれていれば耐性度の step 上昇が起り、含まれ

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-Prefecture 474 Japan.

ていなければ step 上昇は起こらない。この場合、通常使用される「耐性度」の定義は、次のごとくであると思われる。すなわち薬剤の希釈列を作り、これに一定量の菌を接種した場合に、菌の発育がみられる最高薬剤濃度をもつて「耐性度」とされている。液体培地継代法で作られる耐性上昇曲線は、接種量に耐性菌が含まれていれば上昇し、耐性菌が含まれていなければ上昇しない。接種量が比較的小さいと、接種量に耐性菌が含まれる機会が小さくなる。したがって結果が実験の度に変わりやすい。また突然変異頻度に比して接種菌量が小さいと何回継代しても耐性曲線の上昇が起こらない。この場合は、あたかも「耐性獲得」が起こらないようにみえるが、大きい接種菌量を用いれば、耐性曲線の上昇が起こるはずである。また接種菌量の中に耐性菌が含まれていても、それが耐性度の上昇として認められるには耐性菌が増加するまでの時間が必要である。耐性菌が十分増加しないのに継代を行なうと耐性度の上昇は起こらない。これは耐性菌が次の継代の接種菌量に入る機会がないか、入つても前と同様に小菌数にとどまるためである。

以上のように、液体培地継代法では、耐性菌を見逃がして、事実を誤認することがある。また継代に使用される接種菌量に耐性菌が入る割合が実験の度に変わりやすく再現性に乏しい。

具体的な例をあげれば、突然変異頻度が 10^{-8} である場合に、継代に 10^7 生菌数を用いると、継代時に接種菌量に耐性菌が含まれる確率は $1/10$ であるから、なかなか耐性度の上昇が起こらない。この現象をみて、「耐性獲得」が起こりにくいと結論するのは誤りであろう。

以上の理由から、耐性形式の研究には、固形培地を用いる定量的な方法が用いられるべきで、液体培地継代法は適当な方法ではない。また「耐性獲得」という、あいまいな述語も避けるべきであると思われる。

薬剤耐性形式の表現方法に、streptomycin 型³⁾とか penicillin 型³⁾という表現がしばしば用いられる。この型は、Bryson & Szybalski⁴⁾ によれば、それぞれ facultative single-step pattern または multi-step pattern である。Demerec³⁾ が最初に streptomycin 耐性形式と penicillin 耐性形式の差を報告したときの実験方法も定量的なもので、単個集落の耐性度を調べる方法によっている。したがって、非定量的な方法で安易に結論を出すのは、Demerec³⁾ および Bryson & Szybalski⁴⁾ の定義にもとづいている。耐性形式の研究には、単個集落の生残曲線(耐性度)を調べることが必須条件であることを重ねて強調しておきたい。したがって今回の LM 耐性形式の研究は、今までの結核菌の薬剤耐性形式の研究²⁾と同じく、単個集落の生残曲線を調べる方法を用いた。

耐性度の定義について

これまで「耐性度」という述語はいろいろの意味に用

いられている。たいていの場合、「ある菌集団が発育を示す最高濃度」という意味に用いられている。しかし耐性形式の研究にさいしては、もつと厳格な定義でこの述語を使用したい。

耐性度を上述のように定義すると、実験条件によつて菌集団の構成が変わると、耐性度もそれに応じて変化し、一定の成績が得られないことになる。したがって耐性度を再現性あるものにするには、菌集団の遺伝的性質が同じである(均一である)ことを前提とする必要がある。

微生物の場合、単個集落は遺伝的に均一な菌集団と考えてよいから、「単個集落に由来する菌集団が一定実験条件で発育を示す最高濃度」を「耐性度」と定義すればよい。

このさい、単個集落が単個菌に由来するものであれば最良であるが、たとえ数コの菌に由来するものであつても、これら数コの菌が遺伝的に異なる菌(すなわち突然変異菌)である可能性はきわめて小さいから、やはり一定性状に関しては遺伝的に均一な集団すなわち純系集団と考えてよい。換言すれば、単個集落に由来する菌集団(菌株, strain)は事実上“clone”とみなしてよい。

われわれが使用した $H_{37}R_v$ 株は、単個集落分離を3回繰り返したものであるから、一応純系菌集団(純系株)とみなしてよい。

以上のごとく定義した「耐性度」は、「遺伝的に均一な集団の示す性質」とみなされる。したがって、この場合の「耐性度」は、ある遺伝的性質の「表現型」とみなしてよい。

上述の「耐性度」を調べるにあたつて重要なことは、上述の定義が「遺伝的に均一な菌集団」を用いることを前提としていることである。したがって耐性度測定に使用される菌集団(接種菌量)は、たんに単個集落に由来するだけでなく、さらに突然変異菌(遺伝的に異なつた菌)を含めぬ程度に十分に小さい菌集団でなければならない。それでは、どのくらいの大きさ(size)の菌集団を用いればよいのか? これに関しては次のごとく考えられる。

現在、 10^{-8} 以上の突然変異頻度は考えられないので、耐性度測定に使用する菌集団(すなわち、1培地に接種する生菌数)が純系である場合には数百以下の数をとれば、この中には突然変異菌を含めぬものと考えてよい。このさい、われわれが使用する培地は通常中試験管に作つた斜面であるから、培地の面積に限定がある。培地面に発育する集落数が大きいと近接した集落は融合するので、1つの集落とみえても実は数コの集落の集りである場合がある。このような状態を避けるためには、1培地に接種される生菌数は100以下であることが望ましい。このような条件の基礎については文献(5)に検討した。

上述のような意味で、使用される菌集団の大きさ（接種生菌数）は小さいほうが望ましいが、あまりに小さいと各培地あたりの菌の分布が poisson 分布となつて分布誤差が大きくなる。したがつて、これを避けて、正規分布となるだけの大きさとするのが望ましい。そのためには、接種生菌数は少なくとも 10 以上でなければならないし、できれば 20 以上であることが望ましいと思われる。結論として、望ましい接種菌量は 20~100 生菌数（生菌単位）と考えられる。

以上のことを考慮して、われわれは耐性を測定するにあつては、単個集落に由来する菌を薬剤を含みぬ培地で増菌し、これをガラス玉コルペンで 10 分間振盪して均一化した後、生理食塩水を加えて、10~30 mg/ml の菌液を作り、これを 10 倍希釈列で 10^{-6} まで希釈し、原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} の 6 種類の菌液を接種に使用することとした。接種は 0.02 ml を接種しうる渦巻白金耳で、各菌液を LM の種々の濃度を含む培地に接種して、37°C 4 週間培養した後、集落数を数えた。原液および 10^{-1} 液は突然変異菌を得るためのもので、 10^{-2} ~ 10^{-6} 液は生菌数算定のためのものである。集落数の算定にあつては、以前の研究²⁾では 10 本の培地の平均値をとつたが、今回の LM 研究では便宜上 2 本の平均値をとつた。

使用した LM 濃度は、0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1,600, 3,200 $\mu\text{g/ml}$ の 10 本立てで、各菌液について 2 組、すなわち 1 菌株の耐性度測定に、 $10 \times 6 \times 2 = 120$ 本の培地を 1 組として使用した。

37°C 4 週後に発育した集落を、種々の濃度からとつて増菌し、同様に菌液を作つて LM 耐性を測定し、このような操作を繰り返した。集落数の算定は通常 37°C 4 週間に行なつたが、後述するように、耐性菌を最初に分離するには 8 週培養が必要であつた。したがつて高濃度の LM 培地に発育がみられぬ場合は、判定を 8 週まで延長して集落発生の有無を観察した。

以上の理由から、「耐性度」とは、「単個集落に由来する菌集団の 20~100 生菌数（生菌単位）を培地に接種した場合、37°C 4 週後に集落形成を示す最高濃度」と定義した。

注。上述の方法をもつてしても測定される耐性度が多少動揺することは避けられない。このような誤差は、遺伝的に均一な菌が示す偽値変異⁶⁾（培地条件その他の実験条件による変動）に基づくものとみなされる。

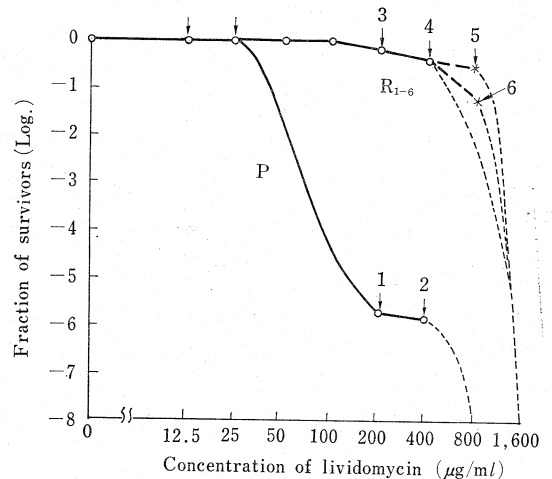
注。結核菌 (*M. tuberculosis*) の場合、突然変異菌は、生菌数あたり 10^{-6} ~ 10^{-8} の割合で得られる²⁾。通常用いられるのは 10^7 程度の接種生菌数であるから、この場合、薬剤を含む培地にみられる耐性菌（突然変異菌）の集落数は培地あたり 1~数にすぎない。したがつて独立して生じた突然変異菌が培地上に相接して分布する確

率は事実上ないと言つてよいから、耐性菌集落は確実に「単個菌」に由来していると考えてよい。

結果および考察

図に示すように、LM にふれたことのない $H_{37}R_v$ 株（感性株、図の P）の耐性度は 25 $\mu\text{g/ml}$ である。すなわち感性株の菌は LM 25 $\mu\text{g/ml}$ まで発育するが、50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. Resistance Development of *Mycobacterium tuberculosis* ($H_{37}R_v$) to Lividomycin



The curve shown in figure represents a survival curve of colonies originated from single colonies isolated on various drug concentrations. Resistance degree of the parent strain is a 25 $\mu\text{g/ml}$ level of resistance and that of resistant strains, which were obtained at concentrations either 200 $\mu\text{g/ml}$ or 400 $\mu\text{g/ml}$, is a 400 $\mu\text{g/ml}$ level of resistance. The arrows in figure show that single colonies were picked up at the concentrations indicated and the strains originated from these colonies were tested for preparing a survival curve. Small colonies may grow on the concentration 800 $\mu\text{g/ml}$, but the strains obtained by subculturing these colonies on a drug-free medium show a survival curve similar to the survival curve of the resistant strains isolated on 200 to 400 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, the capacity to grow on 800 $\mu\text{g/ml}$ is not a heritable character but is considered to be due to a "fluctuation", which is not heritable⁶⁾. When a heavy inoculum of the parent strain is used, a thin membranous growth is observed on the concentration 100 $\mu\text{g/ml}$. However, the strains obtained by subculturing this growth do not show a survival curve of resistant type but show a survival curve similar to that of the parent strain. The thin membranous growth on a 100 $\mu\text{g/ml}$ (and sometimes on a 200 $\mu\text{g/ml}$) level is never due to a mutation to real resistance but due to a "pseudoresistance"⁷⁾. The pseudoresistance is produced by a residual growth of drug-susceptible organisms.

ml には発育しない。いつたん 12.5 $\mu\text{g/ml}$ また 25 $\mu\text{g/ml}$ 濃度に発育した単個集落をとつて、薬剤なし培地に継代増菌して再び耐性を調べてみても同じである。LM 50 $\mu\text{g/ml}$ に時に小集落が生じることがある。とくに培養期間を 8 週まで延長するとたいていの場合、小集落を生じる。この小集落をとつて増菌して耐性を調べ

てみると、感性株と同じ耐性を示す。したがって、この小集落は感性菌の生じる集落であつて、遺伝的な性質によるものではない。

接種菌量をますと、LM 100 $\mu\text{g/ml}$ 培地にも微小な集落が多数認められ、培養期間を 8 週に増すと LM 200 $\mu\text{g/ml}$ にも薄膜様の発育が認められることがある。これらの微小集落や薄膜も遺伝的性状としての耐性ではない。これらの発育の微量を白金耳でとつて薬剤なし培地に増菌し、その耐性を調べてみるとやはり感性株のそれと同じであるからである。この発育は、いわゆる偽耐性⁷⁾の現象によると考えられる。すなわち菌の発育速度が薬剤の濃度の増加に逆比例して減少する型の薬剤 (streptomycin, kanamycin, capreomycin がこれに属する) にみられる現象で、LM 100 $\mu\text{g/ml}$ では発育が停止するのではなく遅延するにすぎないのであるから、単個菌またはこれに近い数の菌の接種では 37°C 4 週培養後、肉眼では集落形成が認められない。しかし感性菌の極少量の発育は起こるので、接種生菌数が $10^5 \sim 10^7$ というように大きくなると、これら微量の発育が集まつて薄膜にみえるものと考えられる。これが偽耐性の現象である。

感性株の中に、LM 200~400 $\mu\text{g/ml}$ に発育できる菌は約 2×10^{-6} の割合で見いだされる。さきに定義したように、耐性の判定を 4 週後に行なうと耐性菌は発育できないが、培養期間を 8 週まで延長すると、LM 200 $\mu\text{g/ml}$ 培地に少数の大きい集落が発生する。この集落をとつて、薬剤なし培地に増菌して耐性を調べると、37°C 4 週後に LM 400 $\mu\text{g/ml}$ の耐性を示す。そしてこの性質は、薬剤を含め培地に 5 代以上継代を繰り返しても不変であるから、遺伝的に安定した性質であると考えられる。このような耐性菌 (遺伝的性質の変化によるものと考えられるから突然変異菌である) は、培地あたり 10^6 生菌数の接種菌量を接種すると、平均 2 コ発見される。

LM 耐性の著しい特徴は、37°C 4 週培養では感性株の中に耐性菌 (突然変異による遺伝的に安定した耐性菌) を見いだせないことである。初回分離のさいには、耐性菌の発育はきわめて遅く、8 週後にはじめて集落を形成する。しかし 2 代目以後は、LM 400 $\mu\text{g/ml}$ 培地で 4 週後に単個集落形成が可能である。すなわち通常の発育速度を示すようになる。

以上のごとく初代分離にさいして、LM 耐性菌がきわめて dysgonic であるという特徴が、他の研究者によつて、あたかも “LM 耐性は生じたい” といわれた原因である。しかし、実際に LM 耐性菌が得られないのではない。初代分離のさいに、培養時間を延長すれば、これを得ることができる¹⁾。

上述の耐性菌の耐性は 400 $\mu\text{g/ml}$ であるが、この

耐性菌集落 (耐性株) から 800 $\mu\text{g/ml}$ 耐性を示す菌を分離しようとしても不可能である。耐性株を 800 $\mu\text{g/ml}$ 培地に接種すると、時に 800 $\mu\text{g/ml}$ 培地に小集落を生じるが、この小集落を増菌して耐性を調べると、前と同じ耐性を示す (図)。したがって 800 $\mu\text{g/ml}$ 培地に小集落を生じるのは、非遺伝的な彷徨変異によるものと思われる。

以上の結果から、H₃₇Rv 株の感性株の耐性は 25 $\mu\text{g/ml}$ であり、耐性株の耐性は 400 $\mu\text{g/ml}$ であると結論される (図、表)。H₃₇Rv 株の LM に対する response は、感性か耐性のいずれかであつて、耐性菌は 400 $\mu\text{g/ml}$

Table. Resistance Pattern of *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) to Lividomycin

	Phenotype	Mutation frequency	Upper limit of resistance
Susceptible cells	Resistance to 25 $\mu\text{g/ml}$		
Resistant cells	Resistance to 400 $\mu\text{g/ml}$	2×10^{-6}	16-fold

There is only one phenotype of resistance to lividomycin. The resistance pattern is “single-step pattern”.

耐性を示すものしかない。すなわち H₃₇Rv 株の LM 耐性形式は、“single step pattern” であると結論される (表)。

また耐性菌の耐性は 400 $\mu\text{g/ml}$ の 1 種しかなく、これ以上の耐性のものは得られないから、耐性上限は 400 $\mu\text{g/ml}$ である。この耐性上限は、感性株の耐性 25 $\mu\text{g/ml}$ の 16 倍である (表)。

M. tuberculosis で “single step pattern” を示す例は比較的珍しい²⁾。現在まで、“single step pattern” が認められた例は、H₃₇Rv 株の Rifamycin 耐性⁸⁾、cycloserine 耐性⁹⁾ および capreomycin 耐性¹⁰⁾ である。

LM の耐性形式に関して最も注目されるのは、LM 耐性菌が初代分離のさいに著しく dysgonic な点である。このような現象は、これまでの抗結核剤で経験されないことである。もし、この現象が人体内病巣で起こるとすれば、耐性菌の増殖がなかなか起こらず、いわゆる “耐性が出現しにくい” 現象が起こりうる。もしそうであれば、LM は臨床に、抗結核剤として注目すべき薬剤であると期待される。

結 論

M. tuberculosis H₃₇Rv 株の Lividomycin (LM) 耐性形式は、“single step pattern” であり、感性菌の耐性は 25 $\mu\text{g/ml}$ 、耐性菌の耐性は 400 $\mu\text{g/ml}$ である。すなわち耐性菌の表現型は 1 種しかない。耐性菌を生じる突然変異頻度は、 2×10^{-6} であり、耐性上限は 400 $\mu\text{g/ml}$ (感性菌の耐性の 16 倍) である。最も注目すべき

現象は、LM 耐性菌が初代分離のさいに著しく dysgonic な点で、この点は今までの抗結核剤にみられない特徴である。

文 献

- 1) 東村道雄・水野松司・山本正彦：結核，45：263，昭 45.
- 2) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 9: 43, 1961.
- 3) Demerec, M.: J. Bacteriol., 56: 63, 1948.
- 4) Bryson, V. and Szybalski, W.: Advances in Genetics, 7: 1, 1955 (Academic Press, New York).
- 5) 東村道雄・野田用：結核，32：639，昭 32.
- 6) 東村道雄・三浦幸二：日本細菌学雑誌，13：1154，昭 33.
- 7) 東村道雄：結核，33：815，昭 33.
- 8) Tsukamura, S. and Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 5: 457, 1961.
- 9) Tsukamura, M., Toyama, H. and Tsukamura, S.: Jap. J. Tuberc., 11: 36, 1963.
- 10) 東村道雄・外山春雄：結核，43：161，昭 43.