

原 著

Mycobacterium tuberculosis の Minocycline 耐性形式

東 村 道 雄・水 野 松 司・村 田 浩

国立療養所中部病院

受付 昭和 56 年 2 月 18 日

PATTERN OF RESISTANCE DEVELOPMENT OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (H₃₇Rv) TO MINOCYCLINE

Michio TSUKAMURA*, Shoji MIZUNO and Hiroshi MURATA

(Received for publication February 18, 1981)

It has been shown recently that minocycline exhibits growth-inhibitory effect on *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵⁾. In the present study, we studied the pattern of resistance development to this agent. A series of studies on this subject were done in this laboratory for various antituberculous agents¹¹⁻⁹⁾. Ogawa egg medium was used. The level of resistance was estimated by the "actual count method"¹²⁾⁻¹⁴⁾. It was expressed as the highest concentration of agent, on which 10 to 100 viable bacteria inoculated per medium can grow as countable colonies after incubation at 37°C for 4 weeks.

The number of phenotypes of resistant mutants (number of the kinds of survival curves shown by strains each derived from single colony) was two in minocycline resistance. The upper limit of resistance (the highest concentration of agent on which test organisms that were obtained by repeated selections of resistant mutants can grow) was 50 µg/ml, *i. e.*, 50 fold of the level of resistance of the parent strain. Resistant mutants that show the highest level of resistance could be obtained by obligatory two-step pattern.

緒 言

私共はここ25年来、抗酸菌特に人型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の抗結核剤耐性形式を研究してきた¹¹⁻⁹⁾。人型結核菌を材料とし、耐性突然変異を起こした単個集落を使用しての研究は、私共の研究室のみで行なわれてきたもので、世界にも類似の研究をみない。幸い人型結核菌の突然変異菌は、生菌数 10⁶~10⁹ に 1 個の割合に見出されるため (頻度は薬剤によつて異なる¹¹⁾)、分離された単個集落は単個菌由来と考えられる。すなわち純系の population であるため、得られた菌株の耐性度は極めて安定したものであつた⁹⁾。

本報では、そのような研究の一環として、minocycline に対する耐性形式を研究した。

研究 方 法

Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv 株を使用した。培地は 1% 小川培地を使用した。その組成は次のとおりである。原液 (1% KH₂PO₄ および 1% sodium glutamate) 100 ml, 全卵液 200 ml, glycerol 6 ml, 2% malachite green 水溶液 6 ml。培地は 7 ml ずつ、165×16.5 mm, 試験管に分注し、90°C, 60 分滅菌することにより斜面とした。minocycline は Lederle Japan 製の minomycin 静注用注射液を使用した。アンプルの内容を水

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

にとかし、滅菌前の培地に添加した。添加に際しては、添加する minocycline 液が、培地 100 容量に対して 1 容量となるように、濃度を調整した。作製した培地は、即日実験に使用した。

被検株は、1% 小川培地に 37°C 4 週培養した後、集落をとつて、ガラス玉入りなす型コルペンに入れて、10 分間振盪して均一化し、これに 0.1% Tween 80 水溶液を加えて、菌液を作つた。菌液はあらかじめ作製した標準曲線と比濁により比較し、10~20 mg/ml 湿菌量として、これを原液とした。生菌数 (生菌単位) の測定のためには、この原液を、0.1% Tween 80 水溶液で 10^{-7} まで希釈し、 10^{-4} ~ 10^{-7} の各希釈液から渦巻白金耳 (0.02 ml 接種用) で、1 白金耳ずつ小川培地に接種した。生菌数算定のためには、各希釈液に 5 本ずつの培地を使用した。なお結核菌生菌数算定のためには、ピペット接種は不適當で、渦巻白金耳接種の方が優れていることは既報した¹⁰⁾。

自然突然変異による耐性菌を分離するためには、原液および 10^{-1} ~ 10^{-3} 希釈液を、薬剤を含む培地 5 本ずつに接種した。使用した minocycline の濃度は、0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$ の 12 種である (注. 実験後 0.5 および 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度は、発育に無影響と分かつたので、実験の後半では省略した)。

菌を接種した試験管 (培地) は、穴あきゴム栓で栓をし、37°C で、直立位で培養した。集落数の観察は、4 週後と 6 週後に行なつた。接種生菌数の測定は 4 週後に、minocycline を含まぬ培地で行なつた。耐性菌の集落数算定は 6 週後に行なつた。これは後に述べるように、耐性集落の発育速度が分離培地で遅いためである。

耐性変異株の分離は、6 週後に minocycline 含有培地に発育した単個集落の中から、3 集落を任意に選んで、新しい薬剤を含まぬ培地に培養した。こうして得た単個集落由来の耐性株を 37°C に 3 週培養し、前と同じ方法で菌液を作り、種々の minocycline 濃度を含む培地に接種した。原菌液および希釈液の作製法および接種法は、上記と同じである。次に得た耐性集落から、再び単個集落由来株を作り、この操作を繰り返した。

上記の方法で得た結果から、単個集落由来株の生残曲線 (survival curve) を作つた。すなわち種々の minocycline 濃度における発育集落数の比率を図にプロットした。例えば、ある株について、薬剤なし培地に 10^{-6} 希釈液を接種して、集落数 8.0 を得、 10^0 液を minocycline 10 $\mu\text{g/ml}$ 培地に接種して集落数 11.2 を得た場合は、1 生菌単位当りの 10 $\mu\text{g/ml}$ 耐性集落 (耐性菌) の比率は、 $11.2 \div (8.0 \times 10^6) = 1.4 \times 10^{-6}$ である。したがって、minocycline 濃度 0 $\mu\text{g/ml}$ のプロットは常に縦軸の 1 すなわち対数値で 0 の位置であり、濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ のプロットは縦軸 1.4×10^{-6} の位置になされる。生菌数

比の縦軸、minocycline 濃度の横軸ともに対数 scale を使用した。

生残曲線を作製する際には、集落数 (培地あたり) 10~100、できれば 20~50 の値の成績を用いた。例えば、接種菌液 10^{-5} を用いて対照培地に 42 の集落数を得た際、minocycline 10 $\mu\text{g/ml}$ 培地の集落数が、 10^0 菌液接種で 25、 10^{-1} 菌液接種で 7 であれば、25 の方をとつて、生菌単位当りの耐性菌出現率を計算した。すなわち、 $25 \div (42 \times 10^5) = 6 \times 10^{-6}$ 。この理由は既報した¹¹⁾。

また単個集落由来菌株の耐性度は、“actual count 法”¹²⁾⁻¹⁴⁾ で表した。すなわち 10~100 生菌単位を接種した際、37°C 4 週後に、集落形成がみられる最高濃度を耐性度とした。

研究成績

M. tuberculosis H₃₇Rv の親株の生残曲線は、図 1 の P の形となつた。minocycline 濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ では、対照培地とほとんど同じ集落数がみられた。2 $\mu\text{g/ml}$ 培地では、 10^{-4} ~ 10^{-3} 菌液の接種では薄膜状発育がみられ、 10^{-2} ~ 10^0 菌液の接種では膜状の発育がみられた。すなわち、この濃度では 10^{-5} および 10^{-6} 菌液の接種では発育がみられないが、 10^{-4} 以上の濃い菌液では薄膜状ないし膜状発育がみられる。 10^0 菌液接種では、対照 (薬剤なし培地) と同じような膜状発育がみられる。 10^{-5} 菌液の接種では、42.0 の集落数がみられたから、 10^0 菌液使用の培地当り接種量は、 $42 \times 10^5 = 4.2 \times 10^6$ である。以上のように、同じ 2 $\mu\text{g/ml}$ でも、接種菌量により発育の状態が異なつていた。

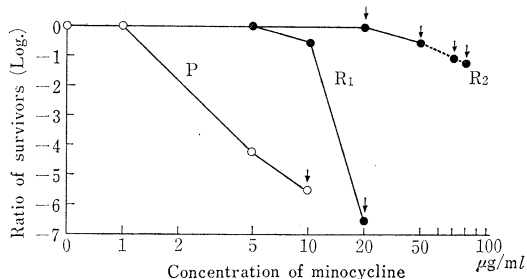


Fig. 1. Survival curves of *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Rv for minocycline.

P is the survival curve of the parent strain, and R₁ and R₂ are survival curves of resistant mutant strains.

Arrows show that, at each concentration indicated, three single colonies were picked up, and the strains derived from these colonies were tested for their survival curve.

Strains each derived from a single colony that grew on the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ in the survival curve P showed the survival curve R₁, and strains each derived from a single colony that grew on the concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ of the survival curve R₁ showed the survival curve R₂. Survivor colonies that grew on the concentrations of more than 50 $\mu\text{g/ml}$ of the survival curve R₂ showed the same survival curves as shown by the curve R₂.

5 $\mu\text{g/ml}$ 培地では、 10^{-2} 菌液接種の場合、薄膜状発育の上に約2個の耐性菌集落らしい集落がみられたが、これを釣菌して継代培養して生残曲線をとると、親株と同じ曲線となった。10 $\mu\text{g/ml}$ 培地では、 10^{-2} ないし 10^0 菌液接種で、薄膜状発育の上に2~11個の集落がみられた。生残曲線を描くには、 10^0 菌液接種を基礎とした(集落数平均値10~100、できれば20~50の場合を計算の基礎とした¹¹⁾)。20 $\mu\text{g/ml}$ 培地には薄膜状発育のみで、集落は認められなかつた。

したがって、生残曲線Pの10 $\mu\text{g/ml}$ 培地に発育した集落3個を取つて、別々に培養し、生残曲線を描くと、3株とも同じ曲線 R_1 を示した(図1)。次に、この生残曲線 R_1 の20 $\mu\text{g/ml}$ 培地に発育した集落3個をとつて、同じ実験を繰り返すと生残曲線 R_2 が得られた。この際50 $\mu\text{g/ml}$ 培地の集落はやや小さく、60~80 $\mu\text{g/ml}$ 培地にも小集落を生じた。

次に R_2 の曲線を描いた集落から、20 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、70 $\mu\text{g/ml}$ 、および80 $\mu\text{g/ml}$ 培地の集落をとつて継代し、再び生残曲線を作ると R_2 と同じ生残曲線となった。この際、50 $\mu\text{g/ml}$ までは集落がみられたが、70~80 $\mu\text{g/ml}$ には集落がみられなかつた。そこで、更に50 $\mu\text{g/ml}$ 培地に発育した集落をとつて継代し、再び生残曲線を描いたが、集落発育の最上限は50 $\mu\text{g/ml}$ であつた。

以上の結果から、次のごとくいえる。

1) $H_{37}Rv$ 株の生残曲線はPで、いわゆる“Actual count 法”^{12)~14)}による耐性度は1 $\mu\text{g/ml}$ である。親株中には、次の R_1 曲線を描く耐性菌は見出されるが、 R_2 曲線を示す耐性菌は存在しない。親株中の R_1 耐性菌の出現率は、生菌単位当り約 3×10^{-6} である。

2) R_1 耐性菌の生残曲線は R_1 で、耐性度(“actual count 法”による耐性度、すなわち接種菌量10~100生菌単位を接種した際、37°C 4週後に集落形成を示す最高濃度^{12)~14)})は10 $\mu\text{g/ml}$ である。 R_1 耐性株中の R_2 耐性菌の出現率は約 3×10^{-7} である。

3) R_2 耐性菌の生残曲線は R_2 で、耐性度は50 $\mu\text{g/ml}$ である。50 $\mu\text{g/ml}$ が、 $H_{37}Rv$ 株が変異で到達しうる耐性上限である。

以上の結果から、 $H_{37}Rv$ 株の minocycline 耐性形式は、“obligatory two-step pattern”であり、耐性表現型の数は2つである。

注. 最高耐性度を示す耐性菌が、two-step selection で得られるものが two-step pattern である¹⁾。耐性菌の表現型は、耐性菌の示す生残曲線の種類で¹⁾、minocycline の場合は R_1 と R_2 の2種である。

考 察

Minocycline が *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* などの病原性抗酸菌の発育を阻止することは、最近 Tsukamura¹⁵⁾ が報告した。本報では、抗結核剤耐性形式に関

Table 1. Comparison of Pattern of Resistance Development of *M. tuberculosis* strain $H_{37}Rv$ for Various Antituberculous Agents

Drug ^a	Level of resistance of parent bacteria estimated by the “actual count method” ($\mu\text{g/ml}$)	Pattern of resistance development (Number of steps necessary for reaching the upper limit of resistance)	Upper limit of resistance to which resistant mutants can reach ^b
SM ⁹⁾	6	Facultative single-step	More than 300
KM ⁹⁾	20	Facultative single-step	More than 100
VM ⁹⁾	20	Facultative single-step	More than 100
CPM ⁹⁾	20	Facultative single-step	More than 100
EVM ⁹⁾	20	Facultative single-step	More than 100
RFP ⁶⁾	10	Obligatory single-step	20
EB ⁴⁾	2	Obligatory single-step	5
CS ³⁾	10	Obligatory single-step	2
INH ¹⁾	0.02	Obligatory two-step	5,000
PAS ¹⁾	0.05	Obligatory two-step	20,000
Tb1	0.2	Obligatory two-step	400
TH ²⁾	8	Obligatory two-step	16
MC	1	Obligatory two-step	50

a Abbreviations and references. SM: Streptomycin, KM: Kanamycin, VM: Viomycin, CPM: Capreomycin, EVM: Enviomycin, RFP: Rifampicin, EB: Ethambutol, CS: Cycloserine, INH: Isoniazid, PAS: *p*-Aminosalicylate, Tb1: Amithiozone, TH: Ethionamide, MC: Minocycline.

b Expressed as a multiple of the level of resistance of parent bacteria estimated by the “actual count” method^{12)~14)}.

する一連の研究¹²⁻⁹⁾の一環として minocycline 耐性形式を取り上げた。

一般に抗結核剤は、INH を例外として *M. tuberculosis* の発育を遅延させる作用があり、その作用は薬剤濃度に比例して増強する¹⁶⁾。この点、minocycline の抗結核菌作用も発育遅延的であると思われる。それは、成績の項で述べたように、接種菌量が大きければ大きいほど発育量が大いことである。すなわち 2 $\mu\text{g/ml}$ 培地に、数10生菌単位を接種したときには、発育は微量で肉眼でみえないが、大量 $10^5\sim 10^6$ を接種すれば、微量発育の集合によつて膜状発育が起こることでも分かる。微量接種の場合は、みかけ上は、発育が完全に阻止されているかにみえるが、実は微量の発育が起こっている。そのため大量接種では、微量発育が寄り集まつて可視となるものと思われる。

また minocycline 耐性菌は、streptomycin 耐性菌などと同じく、初代分離の際には発育が遅く6週でないと大きい集落にならないが、一たん分離してしまうと4週でも薬剤培地に大きい集落を形成する。すなわち “delayed phenotypic expression”¹⁷⁾を示す。これに対して INH 耐性菌だけは、初代分離でも INH 培地に4週で大きい集落を形成する¹⁷⁾。“delayed phenotypic expression”の原因は、突然変異(DNA 分子の構造変化)の後に、表現型を表すのにある時間を要するためと考えられている。この時間は、耐性という表現型を作るのに必要な細胞構造の再構成のためと解される¹⁷⁾。minocycline 耐性菌の表現型発現にも、このような過程が必要なのであろうと思われる。

本報の成績は、minocycline 耐性形式が two-step pattern であることを示した。この形式は、INH 耐性¹⁾、PAS 耐性¹⁾、ethionamide (TH) 耐性²⁾にみられる。これに対して、EB 耐性⁴⁾および RFP 耐性^{5,6)}では、single-step pattern で耐性表現型は1つしかない。SM, KM, VM, CPM, EVM などの aminoglycoside 系あるいは peptide 系抗結核剤に対する耐性形式は facultative single-step pattern である¹⁷⁾。この形式では、低耐性表現型の耐性菌も高耐性表現型の耐性菌も one-step selection で得られる。一方、INH, PAS, TH および minocycline に関しては、高耐性表現型の耐性菌は、one-step selection では得ることができない。必ず、一たん低耐性菌を分離してからでないと高耐性菌を得ることができない。

Minocycline 耐性の耐性上限は、感受性菌の耐性度 1 $\mu\text{g/ml}$ (“actual count 法”測定)の約50倍である(50 $\mu\text{g/ml}$)。したがつて minocycline 耐性は、耐性上昇が比較的低い耐性形式に属する(注。他抗結核剤の耐性上限については文献¹⁸⁾参照)。

結 論

M. tuberculosis H₃₇Rv 株の minocycline 耐性形式は two-step pattern であり、耐性表現型の数は2種である。耐性上昇は 50 $\mu\text{g/ml}$ で、感受性菌の耐性度 1 $\mu\text{g/ml}$ の約50倍である。

文 献

- 1) Tsukamura, M.: Variation and heredity of mycobacteria with special reference to drug resistance, Japan. J. Tuberc., 9: 43, 1961.
- 2) Tsukamura, M.: Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* to alpha-ethylthioisonicotinamide, Amer. Rev. Respir. Dis., 85: 584, 1962.
- 3) Tsukamura, M. et al.: Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* to cycloserine, Japan. J. Tuberc., 11: 36, 1963.
- 4) Tsukamura, M.: Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* to ethambutol, Acta Tuberc. et Pneumol. Scand., 46: 89, 1965.
- 5) Tsukamura, S. and Tsukamura, M.: Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* to rifamycin SV, Japan. J. Microbiol., 5: 457, 1961.
- 6) Tsukamura, M.: The pattern of resistance development to rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*, Tubercle, 53: 111, 1972.
- 7) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Cross-resistance relationships among the aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis*, J. Gen. Microbiol., 88: 269, 1975.
- 8) Tsukamura, M.: *In vitro* susceptibility of mycobacteria, especially of *Mycobacterium intracellulare*, to 5-fluorouracil and pattern of development of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to the drug, Microbiol. Immunol., 23: 427, 1979.
- 9) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Studies on the cross-resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H₃₇Rv, to aminoglycoside- and peptide-antibiotics, Microbiol. Immunol., 24: 777, 1980.
- 10) 東村道雄他: 喀痰から抗酸菌を分離するための渦巻白金耳接種法についての知見補遺, 医療, 33: 509, 1979.
- 11) 東村道雄・野田 用: 小川培地斜面と渦巻白金耳接種を用いる結核菌生菌数の測定. 第1報, 結核, 32: 639, 1957.
- 12) 東村道雄: Kanamycin の耐性検査, 医学と生物学, 49: 87, 1958.
- 13) Tsukamura, M.: “Actual count” method for the resistance test of tubercle bacilli, Japan. J. Tuberc., 12: 46, 1964.
- 14) Canetti, G. et al.: Recent progress in drug resistance tests for tubercle bacilli (major and minor drugs), Bulletin of International Union against Tuberculosis, 37: 185, 1966.
- 15) Tsukamura, M.: *In-vitro* antimycobacterial activity

- of minocycline, *Tubercle*, 61:37, 1980.
- 16) 東村道雄・水野松司：抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較, *結核*, 55:365, 1980.
- 17) Tsukamura, M.: Mutation and inactivation of mycobacteria induced by ultraviolet irradiation, *Japan. J. Tuberc.*, 10:1, 1962.
- 18) 東村道雄：結核菌の交叉耐性(第2編), *結核*, 52:47, 1977.