

原 著

試験管内で誘導した薬剤耐性結核菌の PH フェージ感受性、
および SM 耐性菌より得られた溶原株について

須子田キヨ・彌吉真澄・中野壽夫
河野雅子・若井真理子

東京女子医科大学微生物学教室

受付 昭和 56 年 6 月 17 日

THE SUSCEPTIBILITY OF IN VITRO-SELECTED DRUG-RESISTANT
STRAINS OF *M. TUBERCULOSIS* TO LYSIS BY MYCOBACTERIOPHAGE
PH (MTPH 9), AND THE STUDY OF A LYSOGENIC MUTANT
ISOLATED FROM THE SM-RESISTANT STRAIN

Kiyu SUSHIDA*, Masumi YAYOSHI, Hisao NAKANO, Masako KONO and Mariko WAKAI

(Received for publication June 17, 1981)

The phage PH susceptible and drug-sensitive *M. tuberculosis* isolated from patients were cultured on egg-medium containing the following drugs; SM, PAS, INH and RFP. Mono-drug resistant strains and tri-drug resistant strains of mycobacteria were obtained. A relationship between drug-resistance and a change in the phage susceptibility was indicated. The grade of diminution of the phage PH susceptibility in the mono-drug resistant mycobacteria—SM-1,000 $\mu\text{g/ml}$, PAS-100 $\mu\text{g/ml}$, INH-50 $\mu\text{g/ml}$ and RFP-100 $\mu\text{g/ml}$ was 1/1, 1/10 or 1/100, respectively, as compared with those of the parent cultures in the former three drugs. The phage PH susceptibility of the RFP-resistant strain, however, had diminished more markedly than the other three agents (SM, PAS & INH), viz. 1/1,000 compared with its parent strain. The tri-drug resistant mycobacteria, 3R-10 (SM 10 μg , PAS 10 μg , INH 10 $\mu\text{g/ml}$) did not lyse with the phage PH suspension containing 10⁶/ml PFU.

The phage PH non-susceptible lysogenic colonies appeared in the lysis-area by the phage spotting method on the drug-resistant cultures. The lysogenic mutant produced from the SM-resistant mycobacterium showed resistance not only to SM but also to other anti-tuberculous drugs such as PAS, INH, SF, PZA, KM, VM, EM, CPM, RFP, and CS.

患者から分離された結核菌の PH フェージ (MTPH 9)¹⁾ に対する感受性について先に報告した²⁾。その結果分離株 200 株(東京女子医科大学附属病院にて分離)のうち 25 株, 12.5% はフェージに溶菌し, これら陽性株はすべての抗結核剤 (SM, PAS, INH, KM, その他) に感受性であった。残り大多数のフェージ不感受性のもは薬剤感受性のもも耐性のももあつた。しかしこれら

の耐性度は比較的 low かつた。他方長期療養中の患者 (慈生会病院にて分離) からの高度耐性菌株は少数例であつたが, すべて PH フェージに不感受性であつた。患者由来の薬剤耐性菌とフェージタイピングとは関係がなく, また一部試験管内で得た薬剤耐性株もフェージ感受性は変わらないと報告されている³⁾⁻⁷⁾。そしてフェージ感受性は遺伝的に安定しているといわれる⁷⁾。また先に報告

* From the Department of Microbiology Tokyo Women's Medical College, 10 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan.

した著者らの成績はかぎられた病院で分離された菌株で、ファージタイピングが地域的に類似している報告⁸⁾と関係があるかも知れない。このように薬剤耐性とファージ感受性との関係がないという報告が多く、ファージタイピングには影響がないことが示されているが、著者らは先の臨床株における成績から、薬剤耐性とファージ感受性の関係を追求する目的で、試験管内で得た単剤耐性と多剤耐性菌についてファージ感受性の差異について更に実験を行なった。また単剤耐性菌より得たファージ不感受性の溶原化変異株について、諸種薬剤に対する感受性について実験した。

実験方法

被検菌：患者分離結核菌のうち、薬剤感受性、PHファージ感受性菌の中から無作為に数株を選び、薬剤耐性株の得られた10株 (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, MK12, M246) と、PHファージ分離に用いた宿主菌 H₃₇Rv を被検菌とした。比較として、薬剤感受性で、PHファージ不感受性の患者由来の保存菌4株 (Y7, Y8, Y10, Y12) も用いた。

薬剤耐性株：試験管内で低濃度薬剤より耐性とした漸次増量法と、NG処理法によつたものを用いた。抗結核剤は硫酸ジヒドロストレプトマイシン (SM), イソニアジド (INH), パラアミノサルチル酸 (PAS), リファンピシン (RFP), カナマイシン (KM) を用いた。1剤のみに耐性としたものを単剤耐性, SM・PAS・INH に耐性のものを3剤耐性とした。

漸次増量法による単剤耐性菌：個々の菌株をそれぞれ1%小川培地に接種し37℃ 2週間培養したものを親株とした。いずれも患者材料より分離後約3代継代されたものである。1%小川培地に 0.1, 1.0, 10.0 µg/ml となるように薬剤を含有せしめ、最も高い濃度によく発育した培地より、漸次高濃度含有培地に移植し、最高濃度含有培地に数代継代し、発育の安定した耐性菌を被検菌とした。なお初期実験においてはSMは加熱により効力が

低下すると言われているので、表示濃度の3倍量含有培地を用いた。SM 1,000 µg/ml 耐性 (SM-1000) 7株, PAS 100 µg/ml 耐性 (PAS-100) 7株, INH 50 µg/ml 耐性 (INH-50) 2株, RFP 100 µg/ml 耐性 (RFP-100) 4株, KM 1,000 µg/ml 耐性 (KM-1000) 2株である。

3剤耐性菌：3剤を溶解含有せしめた培地に発育した菌株である。SM・PAS・INH を 0.01~10 µg/ml ずつ加えた1%小川培地の上に記菌株を接種し、単剤耐性菌と同様に、低濃度発育より高濃度耐性とし、10 µg/ml 3剤耐性菌2株 (M246-3R10, MK12-3R10) が得られた。他の菌株からは得ることが困難であつた。

交叉耐性による3剤耐性菌：SM-1,000耐性菌をINH

Table 1. SM-resistant Strains Produced by NG-treated *M. tuberculosis* isolated from Patients

Strains	NG-treated time (min.)	No. of colonies on SM-medium	
		0 µg/ml	50 µg/ml
M 55	0	+++	2
	5	+++	13
	30	+++	6
	60	+++	34
	90	+++	6
	120	+++	6
M 69	0	+++	0
	5	+++	7
	30	+++	0
	60	+++	14
	90	+++	1
	120	+++	0
M 246	0	+++	1
	5	+++	17
	30	+++	4
	60	+++	0
MK 12	0	+++	5
	5	+++	50

Table 2. Mono- and Tri-drug Resistant Strains Isolated from NG-treated *M. tuberculosis*

Strains	NG treated time (min.)	Mono-resistant				Tri-resistant (SM・PAS・INH)		
		SM 50 µg/ml	INH 150	KM 100	KM 1,000	0.01	0.1	1.0
M 246	0	1	0	23	0	+++	23	0
	5	10	21	+	0	+++	++	0
	30	6	3	+	0	++	+	0
	60	1	0	+	0	++	+	0
	90	2	7	+	0	ND	ND	ND
	120	0	0	+	0	ND	ND	ND
MK 12	0	0	7	4	0	+++	+++	8
	5	19	50	20	0	+++	+++	+

Table 3. Decreased Phage Susceptibility of Mono-drug Resistant *M. tuberculosis* with Diluted PH-phage Suspension

Drug resistant ($\mu\text{g/ml}$)	<i>M. tuberculosis</i>	Decreased ratio	Lysis size by diluted phage									
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
			Parent					Resistant				
SM-1,000	M 3	1/1	3	3	3	2	1	3	3	3	1	1
	M 5		3	3	3	2	2	3	3	3	2	1
	MK 12	1/10	3	3	3	3	2	3	3	3	2	1
	M 4		3	3	3	2	1	3	3	2	2	1
	M 2		3	3	3	3	2	3	3	3	2	1
M 246	3	3	3	2	1	3	3	2	2	0		
M 1	1/100	3	3	3	2	1	3	2	2	2	0	
PAS-100	H ₃₇ Rv	1/1	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2
	M 8		3	3	2	1	0	3	3	2	1	0
	M 1	1/10	3	3	3	2	1	3	3	2	0	0
	M 246		3	3	3	2	2	3	3	2	1	0
	MK 12		3	3	3	3	2	3	3	3	2	1
M 6	1/100	3	3	3	3	2	3	3	2	1	0	
M 7		3	3	3	3	2	3	3	2	1	0	
INH-50	M 246	1/10	3	3	3	2	2	3	3	2	1	0
	MK 12		3	3	3	3	2	3	3	3	2	0
RFP-100	M 2	1/10	3	3	3	3	2	3	3	3	1	0
	M 5		3	3	3	2	2	3	3	2	1	0
	M 1	1/100	3	3	3	2	1	3	2	2	1	0
	MK 12	1/1,000	3	3	3	3	2	3	2	2	0	0

Lysis size; numeral "3" is the complete plaque on the cultured egg-medium plates of mycobacterium which is more than 11-12 mm in diameter, "2" is 5-10 mm in diameter, "1" is 2-4 mm in diameter, and "0" is a pinhole or unclear plaque, with no lysis.

加小川培地に移植し、INH-50 耐性とし、更にこれを PAS 加培地にうえつぎ PAS-100 耐性菌とした。このような単剤加培地ではそれぞれ表示濃度に発育を示したが、3 剤加培地では 10 $\mu\text{g/ml}$ に辛じて発育を示し、3R-50 まで耐性とすることができた。得られた菌株は MK12-3R50 1 株のみである。

これらに比べて PH フェージ不感受性の 4 株は同時混合法によつて、Y7-3R10, Y8-3R10, Y10-3R10, および Y12-3R10 が比較的容易に 3 剤耐性菌とすることができた。

NG 処理法による薬剤耐性菌：患者分離株、M55, M69, M246, MK12 の 4 株を用いた。NG 処理法としては、NG mutagen; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin(NG, SIGMA)を用いた。Dubos 液体培地で 37°C 7 日培養の結核菌を集菌し、M/20 トリス緩衝食塩水 (TBS pH 7.0) で洗浄、液体培養の 1/2 量の TBS に浮遊させた。これに NG を 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、

37°C で作用させた。作用時間 5, 30, 60, 90, 120 分ごとに一部をとり TBS で洗浄後、Dubos 液体培地に接種し、37°C 7 日培養後、充分に発育した菌液 0.1 ml ずつを薬剤加 1% 小川培地に流し込み、37°C 2 週間培養した。表 1 は SM 50 $\mu\text{g/ml}$ 加小川培地に接種した成績で、対照の SM 無添加培地には NG 処理時間に関係なく 4 株すべてが良好な発育を示した。NG 5 分処理で、M 246, MK12 は SM, PAS, INH および KM 耐性の集落が多く得られ、薬剤耐性菌を得るのには NG 処理時間は 5 分が至適と思われる。これら NG 処理によつて得た M55, M69, M246, MK12 の 4 株の耐性株は更に高濃度薬剤加培地に継代し、安定した NG 処理薬剤耐性菌を得た。

上記薬剤耐性菌は親株と同様に灰黄色、R 型、ナイアシン陽性であつた。MK12-3R10 のみはやや S 型化の集落であつた。走査電顕による所見は別に報告した⁹⁾。

PH フェージ感受性試験：フェージ感受性試験の直前

Table 4. PH-phage Susceptibility (RTD) of Tri-drug (SM·INH·PAS) Resistant Strains of *M. tuberculosis*

Strains	Parent	PH-phage susceptibility (RTD)		
		3R-10		3R-50
		Gradually*1	NG-treated*2	Crossed*3
MK 12	5	0	4	5
M 246	5	0	4	ND
Y7, Y8, Y10, Y12 0		0		

Tri-drug resistant strains produced by different methods :

*1...Resistant bacilli grown in media involving SM, INH, and PAS; the concentration of each drug in it was gradually increased from 0.01 to 10 μ /ml in range. *2...NG-treated organisms were selected for media involving three-drugs. *3...SM-1,000 resistant organisms inoculated on culture media, to which PAS was added and then to INH-culture media; and in the next step these resistant bacilli were cultured in a tri-drug containing media, from 3R-10 to 3R-50.

に薬剤耐性株およびそれぞれの親株を1%小川培地に移植し、37°C 2週間培養し、いずれも発育の良好のものを被検菌として用いた。SM等の薬剤がファージ増殖に影響を与える¹⁰かも知れないと考慮したからである。なお薬剤耐性はこれによつて消失しないことも確認した。

ファージ感受性試験は先に報告したスポット法¹¹⁾により、成績の判定は溶菌の程度の差を0, 1, 2, 3で表し、一部比較を容易にするためRTD法を用いた。1%小川平板培地に菌液を塗布したあと、37°C 3日培養後、希釈ファージ液 ($10^0 \sim 10^{-5}$) を滴下し、封じたあと更に11日培養した結果、平板上の完全溶菌野の直径をはかつた。溶菌野の直径が約12mmのものを3とし、小溶菌野数個集合するものを1とし、3から1までを溶菌陽性とした。

溶原化株の薬剤感受性試験：薬剤耐性菌にPHファージをスポットして生じた溶菌野は培地面が明瞭に現れる完全溶菌を示すものが多いが、増量法による耐性菌では時に溶菌野の中央にPHファージ不感受性の集落を認め、NG処理によつて得た耐性菌では溶菌野を薄く覆う lawn, あるいは halo を認める場合があつた。このうち比較的明瞭な発育を示した集落について、ファージ耐性菌か、immunityによる溶原化株かをしらべた。すなわちこのような菌集落を1%小川培地にて増菌した後、希釈して小川平板培地にまき、その単個集落の数個について交叉培養法¹⁶⁾を参考として試験を行ない、溶原化株であることを確認した。得られた菌株は4株 (Ly-W5, Ly-W3, Ly-W6 および Ly-246) である。これらのうち以降の実験には W5-SM 2000 (近年の表示法に従つて培地 1 ml 中に含有せしめた SM 量をそのまま表示した) より得られた1株 (Ly-W5) を用いた。W5-SM 2000 および Ly-W5 の両株はそれぞれ SM を含まぬ小川培地に2代継代後、各種抗結核剤含有培地 (日水) を用い、

Table 5. Sensitivity to Other Drugs of a Lysogenic Mutant Strain Maintained on SM-resistant Tubercle Bacilli

Drugs	(μ g/ml)	Parent (W5-SMR)	Lysogenic strain (Ly-W5)
SM	0	卅	卅
	200	卅	卅
	2,000	卅	±
SF	10	+	±
PZA	3,000	+	卅
PAS	1	-	+
	10	-	+
KM	25	-	卅
	100	-	±
VM	25	-	卅
	100	-	+
EM	2.5	-	卅
	5	-	+
CPM	25	-	卅
	100	-	卅
RFP	10	-	+
	50	-	-
INH	0.1	-	卅
	5	-	卅
CS	20	-	±
TH	25	-	-

-...Negative colony, ±...thin colonies, +...countable colonies or grown on a 1/3 slant surface, and 卅...2/3 slant surface, and 卅...many colonies covering the slant of egg-medium after three weeks at 37°C incubation.

一般臨床検査法に従つて培養し、37°C 3週間の培養成績を比較した。耐性検査用培地は、ストレプトマイシン (SM), パス (PAS), イソニアジド (INH), カナマイシン (KM), パイオマイシン (VM), サイアジン (SF), ピラマイド (PZA), エタンブトール (EB), カブレオマイシン (CPM), リファンピシン (RFP), サイクロセリン (CS), およびエチオナマイド (TH) である。

実験成績

漸次増量法による単剤耐性菌のPHファージ感受性成績を表3に示した。大部分の親株では3プラスの完全溶菌を示すファージ希釈濃度は $10^{-4} \sim 10^{-3}$ のオーダーであつた。この3プラス溶菌を示す希釈濃度を親株とその耐性株について比較すると、菌株によつて差があつたが、各薬剤とも耐性株は親株の1/1, 1/10 または 1/100 の感受性の低下を示した。RFP耐性菌ではMK12の1株だけであつたが親株の1/1,000の低下を示した。

NG処理による単剤耐性菌のPHファージ感受性をRTD法によつて比較した。M55 (SM-1000), M69 (SM-1000), MK12 (SM-1000) および M246 (SM-

1000, PAS-100, INH-50, KM-1000) の NG 5分処理耐性菌は、それぞれの親株の1/10~1/100のファージ感受性の低下を示し、漸次増量法によつて得た単剤耐性菌とはほぼ同様の結果であつた。NG 処理時間を30, 60, 90, 120分と延長して得た耐性株でもほぼ同様で、NG 処理時間による耐性株のファージ感受性の影響は認められなかつた。

3剤耐性菌は漸次増量法によつて得た2株 MK12-3R10 と M246-3R10 はいずれも親株に比べて全くファージ感受性を示さなかつた(表4)。同じく漸次増量法によつて交叉耐性菌とした MK12-3R50 は親株と同様 RTD 5 を示し、感受性の低下は著明でなく、それぞれの単剤耐性菌のファージ感受性(表3)と同程度の感受性を示した。NG 処理による MK12 と、M246 の 3R-10 はそれぞれの親株のファージ感受性の約1/10で RTD 4 を示した。

溶原化株(Ly-W5)は SM 2000 耐性菌から得られ、PH ファージ不感受性であつて、下記の各薬剤に対して耐性を示した。表5に示すように親株の W5-SMR は SM のみならず SF (10 µg/ml) および PZA (3,000 µg/ml) にも耐性を示した。Ly-W5 はこれらの薬剤に耐性を示すばかりでなく、アミノ糖抗生物質 KM にも耐性を示し、その他 PAS (10 µg/ml), VM (100 µg/ml), EB (5 µg/ml), CPM (100 µg/ml), RFP (10 µg/ml), INH (5 µg/ml), CS (20 µg/ml) にも耐性を示した。TH (25 µg/ml) のみには感受性であつた。

考 察

M. tuberculosis の薬剤耐性菌は先に述べたようにファージタイピングに関係がないという多くの報告がある。もし同一患者からファージタイプの異なる菌が検出された場合は再感染と考えてよいという報告もある⁷⁾¹²⁾。著者らも *in vitro* の実験を通して特殊な菌株(漸次増量法による 3R-10)を除いて通常の臨床検査においては充分のファージ濃度であれば(少なくとも 10^3 PFU 以上)、ファージタイピングに薬剤耐性株の影響はないと考える。しかし上記成績に示したように、SM・PAS・INH を同時に混合した培地で耐性となつた3剤耐性株はそれぞれ 10 µg/ml という低い濃度の耐性であるにもかかわらず PH ファージ(約 10^6 PFU)に溶菌を示さず、SM-1000 耐性菌より PAS-100, 次いで INH-50 と交叉耐性によつた3剤耐性菌は3剤それぞれ 50 µg/ml 加培地に発育を示したが、それぞれの単剤耐性菌とはほぼ同様の溶菌態度を示したことは興味あることと考える。遺伝子変異の差¹³⁾によるものかどうかは研究は行なっていない。先に報告した多剤耐性患者分離株が PH ファージに不感受性であり、またその後追加した多剤耐性患者株が PH ファージ感受性であつたことと考え合わせると、同じ多剤耐

性菌でも臨床上的薬剤投与方法などと関係があるかも知れない。

ファージ感受性はまずファージの吸着にはじまるが、抗酸菌におけるファージ吸着は菌体表面の脂質にあると報告されている¹⁴⁾。また H₃₇Rv の INH-50 耐性菌は総脂質が減少し、lipid metabolism と同一作動し、INH の耐性は chromosomal に位置していることが明らかとなつたが、他の PAS, EB, RFP では変化がないと報告¹⁵⁾されている。本実験では耐性菌の表層脂質についても総脂質についても実験を行なっていないが、総脂質で変化がないとされている RFP 耐性菌が本実験ではファージ感受性の低下を示すものがあつて、薬剤耐性菌の脂質とファージ感受性との関係は興味あることと考える。

SM 耐性菌のファージ溶菌野に出現した菌集落は形態学的変化はなく、ナイアシン陽性、PH ファージ不感受性で、昭和50年本菌分離以来これらの性状は一定で安定した結核菌の溶原化変異株であると考えられる。多剤耐性であることを証明したが、更に研究を重ねている。

結 論

試験管内で得られた単剤耐性結核菌(SM, PAS, INH, RFP および KM), および3剤耐性結核菌(SM・PAS・INH)についてスポット法により PH ファージ感受性をそれらの親株の成績と比較を行なつた。その結果単剤耐性菌では完全溶菌を示すファージの希釈濃度は親株と全く同じものから1/10~1/1,000の感受性の低下を示すものがあつた。薬剤では SM 耐性菌は最も影響が少なく、RFP 耐性ではかなり感受性の低下(1/1,000)するものがあつた。しかし RTD 法をもつて比較するとその差は非常に少ない。3剤耐性菌では耐性獲得の方法の差によつてファージ感受性に差がみられた。すなわち3剤(SM・PAS・INH)を同時に加えた培地で漸次増量法で得た耐性株はファージ不感受性を示したが、交叉耐性によつて得た3剤耐性菌では著明な低下を認めず、それぞれの単剤耐性菌とはほぼ同じ程度の感受性であつた。また NG 処理によつて得た耐性菌においても著明な変化は認められなかつた。SM 耐性菌より得られた PH ファージに対して溶原化した菌集落は SM のみならず多剤耐性を示した。

文 献

- 1) Rada, T.A. et al.: World health organization studies on bacteriophage typing of mycobacteria. Subdivision of the species *Mycobacterium tuberculosis*, Am Rev Respir Dis, 111: 459, 1975.
- 2) 須子田キヨ・長田富香: 患者から分離したヒト型結核菌の PH ファージ感受性について, 結核, 51: 13, 1976.
- 3) Takeya, K. et al.: Studies on the biologic properties of mycobacteriophage, Am Rev Respir Dis, 80: 543,

- 1959.
- 4) Bates, J. H. and Fitzhugh, J. K.: Subdivision of the species mycobacteriophage typing, *Am Rev Respir Dis*, 96:7, 1967.
 - 5) Bates, J. H. and Mitchison, D. A.: Geographic distribution of bacteriophage types of *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Respir Dis*, 100:189, 1969.
 - 6) Mankiewicz, E.: Bacteriophage types of mycobacteria, *Canadian J Pub Health*, 63:342, 1972.
 - 7) 北原康平: フェージ型別を利用した家族内結核の感染源追求(第1編)人型結核菌をフェージ型別するための実験的研究, *結核*, 48:9, 1973.
 - 8) Mankiewicz, E. and Livak, M.: Phage types of *Mycobacterium tuberculosis* in cultures isolated from patients, *Am Rev Respir Dis*, 111:307, 1975.
 - 9) 荒明美奈子・須子田キヨ: 抗結核剤耐性結核菌の走査電子顕微鏡的観察, *結核*, 54:325, 1979.
 - 10) Tokunaga, T. and Sellers, M. I.: Streptomycin induction of premature lysis of bacteriophage infected mycobacteria, *J. Bacteriol*, 89:537, 1965.
 - 11) Sushida, K. and Hirano, N.: Isolation from media of two bacteriophage protamylase-H₃₇Rv (PH) active against *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Respir Dis*, 106:269, 1972.
 - 12) Raleigh, J. W. and Wichelhausen, R.: Exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* confirmed by phage typing, *Am Rev Respir Dis*, 108:639, 1973.
 - 13) 渡辺 力: 化学療法と耐性菌, p. 166, 朝倉書店, 1979.
 - 14) Tokunaga, T. et al.: Phage inactivation by an ethanol-ether extract of *Mycobacterium smagmatis*, *Am Rev Respir Dis*, 101:309, 1970.
 - 15) Alberghina, M.: Relationship between lipid composition and antibiotic-resistance to isoniazid streptomycin, p-aminosalicylic acid, ethambutol, rifampicin in mycobacteria, *Italian J Biochemistry*, 25:127, 1976.
 - 16) 富沢純一: バクテリオフェージの実験, p. 101, 岩波書店, 1970.