

## 短 報

*Mycobacterium tuberculosis* (H37R<sub>v</sub> 株) の DL 8280 耐性形式

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 58 年 12 月 12 日

RESISTANCE PATTERN OF *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* STRAIN H37R<sub>v</sub> TO A NEW  
ANTIBIOTIC DL 8280

Michio TSUKAMURA\*

(Received for publication December 12, 1983)

The resistance pattern to a new antibiotic DL8280 was studied using the strain H37R<sub>v</sub> of *Mycobacterium tuberculosis* and the Ogawa egg medium. This organism showed two resistant phenotypes to DL8280, survival curves R1 and R2 (Fig. 1). Lowly resistant phenotype had the resistance level  $5\mu\text{g/ml}$ , when measured by the actual count method<sup>(6)7)</sup>, and the mutants with this phenotype appeared in the parent strain at a rate of  $10^{-6}$ . Highly resistant phenotype had the resistance level  $100\mu\text{g/ml}$  and the mutants with this appeared in the population of the lowly resistant strains at a rate of  $10^{-6}$ . The upper limit of resistance<sup>(2)</sup> was  $100\mu\text{g/ml}$ , which was ca. 300-times higher than the resistance level of sensitive organisms,  $0.32\mu\text{g/ml}$ . To reach the upper limit of resistance, two-step selections of mutants was needed. Hence, the pattern of resistance development is the obligatory two-step pattern. It was characteristic that the mutants grew eugonic colonies on initial isolation. This characteristic was observed previously only in isoniazid-resistant mutants<sup>(3)-5)</sup>. The resistance pattern to DL8280 was the same as that of the parent strain in a streptomycin-resistant strain, an isoniazid-resistant strain, a p-aminosalicylate-resistant strain and a rifampicin-resistant strain isolated from the H37R<sub>v</sub> strain.

**Keywords** : *Mycobacterium tuberculosis*,  
DL8280, Resistance pattern

**キーワードズ** : *Mycobacterium tuberculosis*, DL8280,  
耐性形式

DL8280 は第一製薬株式会社 (東京) によって開発された新しい抗菌物質で、次の構造式を持つ。(±)-9-fluoro-2, 3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido [1, 2, 3-de] [1, 4]benzoxazine-6-carboxylic acid. 分子式は  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ , 分子量 361.37, DL8280 の抗酸菌に対する抗菌力については前報した<sup>1)</sup>。本報では、*Mycobacterium tuberculosis* H37R<sub>v</sub> 株の DL8280 に対する耐性形式について報告する。

使用菌株は *Mycobacterium tuberculosis* H37R<sub>v</sub> 株およびそれから分離した streptomycin (SM), isoniazid (INH), p-aminosalicylate (PAS) および rifampicin (RFP) 耐性株である。(菌株番号, 05001, 05006, 05009, 05020, および 05059)。SM 耐性株は原株を SM1, 000  $\mu\text{g/ml}$  を含む 1% 小川培地に接種して得た。INH 耐性株および RFP 耐性株も、同じく原株を INH10  $\mu\text{g/ml}$  または RFP100  $\mu\text{g/ml}$  培地に接種して分離した。PAS 耐性株は、先ず原株を PAS 1  $\mu\text{g/ml}$  培地に接

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

種して低耐性株を分離し、次いでこれを PAS100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地に接種して分離した。使用した培地は1%小川培地である。DL8280は、先ず propylene glycol に10 mg/ml の割合に溶解し、これを更に蒸留水で希釈し、その1容を滅菌前の1%小川培地100容に添加して所要濃度を得た。培地は165 $\times$ 16.5mm の試験管に分注し、90 $^{\circ}\text{C}$ 60分滅菌して斜面培地とした。

被検菌株は1%小川培地に37 $^{\circ}\text{C}$  3週間培養し、これをガラス玉入りコルベン中で10分振盪して均一化し、0.1% Tween80 水溶液で希釈した。接種に使用した菌液濃度は、湿重量10mg/ml を原液(10 $^7$ )とし、以下10倍希釈して10 $^{-6}$ に至った。各菌液を種々のDL8280を含む培地に渦巻白金耳で0.02ml ずつ丁寧に培地にすり込むように接種し(菌の均一な分布を期待して渦巻白金耳で培地にすり込む)、ダブルゴム栓をかぶせて37 $^{\circ}\text{C}$  4週間培養した。発育した単個集落を各濃度から3個ずつとって培養し、これから菌液を作って上記と同様にDL8280培地に接種した。菌株には次のように記号をつけた。DL82801.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  に発育した集落3個に由来した株は各々DL1.25a, DL1.25b, DL1.25c と記号をつけた。次にDL1.25a株をDL8280 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地に接種して得た集落由来の株はDL1.25a-5aとなる。こうして得た各々の株について、種々のDL8280濃度における survival fraction (発育集落数対接種生菌数の比)をプロットして、生残曲線(survival curve)を作った。詳細は前に報告した<sup>2)</sup>。各株の生残曲線はその株

(clone) の表現型 (phenotype) とみなされる<sup>2)</sup>。

H37Rv株、そのSM耐性株、INH耐性株、PAS耐性株、RFP耐性株について得た成績は全く同一であったので、ここにはH37Rv株の成績だけを示す(図1)。

DL8280 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地に発育した集落由来株は原株と同じ生残曲線(P)を画いた。即ち、これらの集落は原株と同じ遺伝的性質を持っている。DL0.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地では、接種生菌数が少ないと全く発育が起こらないが、原液接種(生菌数約10 $^7$ )では薄膜発育となった。従って、単個集落の分離は不可能であった。1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地では感性菌の発育が全く抑えられて単個集落(本実験の場合14個)が得られた。この集落由来の株は、原株とは明らかに違う生残曲線R<sub>1</sub>を画いた。即ち、遺伝的変異を起こした菌の clone と考えられた。注目すべきことは、DL8280耐性菌の発育が4週間後に既に eugonic growth を示す集落として認められたことである。このような初代分離における耐性菌集落の eugonic growth は今まで INH 耐性菌だけで認められたものである<sup>3)~5)</sup>。

DL8280の1.25~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  で分離された集落は“actual count 法”<sup>6)7)</sup>で耐性度を測定すると、耐性度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示し、図1のR<sub>1</sub>の生残曲線を画いた。次にR<sub>1</sub>生残曲線を示す株からDL8280 10または20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  に発育した集落を分離培養した株は、耐性度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示し、R<sub>2</sub>の生残曲線を画いた。しかし、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  に発育した集落由来株(例えばDL2.5a-10a-100a)

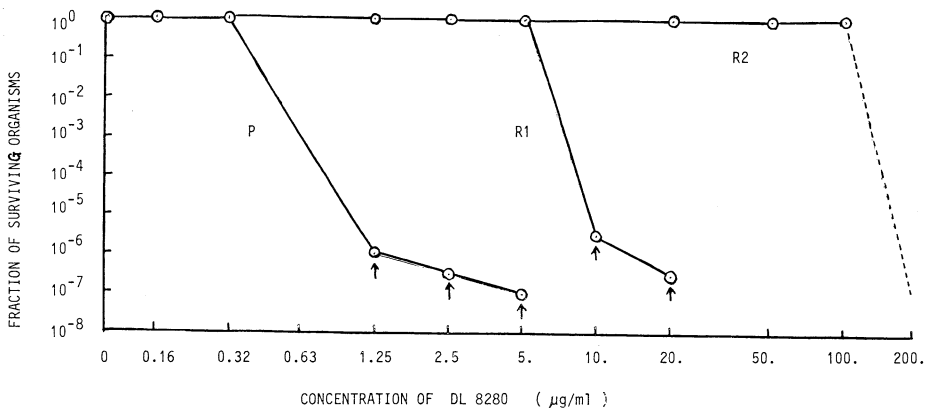


Fig. 1. Survival curves for *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv on various concentrations of DL 8280.

P is the survival curve for the parent strain. R<sub>1</sub> is the survival curve for lowly resistant strains isolated from the parent strain on the concentrations of 1.25 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and R<sub>2</sub> is the survival curve for highly resistant strains, which were isolated from the lowly resistant strains on the concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Arrows indicate the concentrations of DL8280, on which the mutants that show a different survival curve from that of the parent strain (P), were isolated. Dotted line shows that no more mutant has been obtained on the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Table 1. Resistance Pattern of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv to a New Antibiotic DL8280

Number of resistant phenotypes <sup>2)</sup>	Two phenotypes: Lowly resistant phenotype (survival curve R1) and highly resistant phenotype (survival curve R2)		
Rate of occurrence in total viable population	Lowly resistant mutants with phenotype R1: $10^{-6}$ in the parent strain. Highly resistant mutants with phenotype R2: $10^{-6}$ in the lowly resistant strain		
Pattern of resistance development <sup>2)</sup>	Obligatory two-step pattern		
Upper limit of resistance <sup>2)</sup>	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ca. 300-times higher than the resistance level of sensitive bacteria, 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Resistance level, measured by the actual count method ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Ratio of the resistance level	Rate of occurrence estimated* or possible occurrence rate** in viable population of the parent strain
Sensitive bacteria	0.32	1	1
Lowly resistant bacteria	5	15	$10^{-6}$ *
Highly resistant bacteria	100	300	$10^{-6} \times 10^{-6}$ **

から DL8280 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  に発育する集落を得ようとしても不可能であった。即ち、耐性上限<sup>2)</sup>は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  と考えられる。

以上の結果から、*M. tuberculosis* H37Rv 株の DL8280 耐性形式をまとめると次のごとくなる(表1)。

1. H37Rv 株の DL8280 耐性表現型は生残曲線 R<sub>1</sub> と R<sub>2</sub> の2種である。低耐性菌(表現型 R<sub>1</sub>)の耐性度は“actual count 法”測定で5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、高耐性菌(表現型 R<sub>2</sub>)の耐性度は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  である。なお、感性菌(表現型 P)の耐性度は0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$  である。2. DL8280 の耐性上限は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり、これは感性菌の耐性度0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の約300倍である。3. 高耐性菌は原株から直接分離することは出来ないで、一旦、低耐性菌を分離し、これから更に高耐性菌を分離しなければならなかった。従って、DL8280 に対する *M. tuberculosis* H37Rv の耐性発現形式 (pattern of resistance development) は two-step pattern である。two-step pattern は INH 耐性および PAS 耐性で認められている<sup>2)</sup>。4. DL8280 耐性菌は初代分離の際でも eugonic growth を示す。この性質は、これまで INH 耐性菌についてだけ認められている<sup>3)4)</sup>。5. SM 耐性株、INH 耐性株、PAS 耐性株、RFP 耐性株も原株と同じ耐性形式を示した。

## 文 献

1) Tsukamura, M.: *In vitro* antimycobacterial

activity of a new antibacterial substance DL-8280. Differentiation between some species of mycobacteria and related organisms by the DL 8280 susceptibility test, *Microbiol Immunol*, 27: 1129-1132, 1983.

- 2) Tsukamura, M.: Variation and heredity of mycobacteria with special reference to drug resistance, *Japan J Tuberc*, 9: 43-64, 1961.
- 3) Tsukamura, M.: Mutations and inactivation of mycobacteria induced by ultraviolet irradiation, *Japan J Tuberc*, 10: 1-14, 1962.
- 4) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Cross-resistance relationships among the aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis*, *J Gen Microbiol*, 88: 269-274, 1975.
- 5) Tsukamura, M.: Loss of hexuple resistance to aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) by mutation to isoniazid resistance and by incubation in high temperature, *J Gen Microbiol*, 98: 611-614, 1977.
- 6) 東村道雄: Kanamycin の耐性検査, *医学と生物学*, 49: 87-90, 1958.
- 7) Tsukamura, M.: “Actual count” method for the resistance test of tubercle bacilli, *Japan J Tuberc*, 12: 46-54, 1964.