

原 著

Mycobacterium smegmatis (獣調株) における Streptomycin,
Kanamycin 間の交叉耐性

— *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* Complex および
M. smegmatis 間の耐性形式の比較 —

束 村 道 雄

藤田学園保健衛生大学医学部微生物学教室
国立療養所中部病院呼吸器科

受付 平成2年4月24日

CROSS-RESISTANCE RELATIONSHIP BETWEEN STREPTOMYCIN AND KANAMYCIN
RESISTANCES IN *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* (STRAIN JUCHO)

— Comparison of the Development Patterns of Resistances to Streptomycin and
Kanamycin among *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium*
avium Complex, and *Mycobacterium smegmatis* —

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication April 24, 1990)

The resistance development pattern of *Mycobacterium smegmatis* strain 17023 (Jucho) to streptomycin and kanamycin was studied. The medium used was Ogawa egg medium, and the level of resistance was determined for each clone derived from single colony by the 'actual count' method. Hence, the resistance level was estimated as the highest concentration of drugs, in which small inocula consisting of 20 to 100 colony-forming units could grow after seven days incubation. Only one type of resistance mutants resistant to more than 1,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin was isolated and these mutants were also resistant to 8 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin. On the other hand, only one type of kanamycin-resistant mutants resistant to 8 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin was isolated and these mutants were also resistant to more than 1,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. Accordingly, there was a complete cross-resistance relationship between streptomycin and kanamycin resistances. Therefore, there existed only one phenotype, which is simultaneously resistant to streptomycin and kanamycin. The mutants occurred at a rate of about 2×10^{-8} per viable bacterial population of the parent strain. Streptomycin-dependent mutants occurred at a rate of about 2×10^{-9} .

The number of resistant phenotypes to streptomycin and kanamycin was only one in *M. smegmatis*, while it was five in *M. tuberculosis* and 2 or 3 in *M. avium* complex (Tsukamura, M. and Mizuno, S.: J. Gen. Microbiol. 88 : 269-274, 1975 ; Tsukamura, M.: Kekkaku 62 : 445-458, 1987). The simplicity of the resistance system of *M. smegmatis*

* From the Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-11, Japan.

suggests that this organism is evolutionally primitive in the world of mycobacteria.

Key words : *Mycobacterium smegmatis*, Cross-resistance, Streptomycin, Kanamycin, Pattern of resistance development

キーワード : *Mycobacterium smegmatis*, 交叉耐性, Streptomycin, Kanamycin, 耐性形式

緒 言

われわれは、前に *Mycobacterium tuberculosis* および *Mycobacterium avium* complex における抗結核剤耐性形式と交叉耐性について研究した^{1)~3)}。その結果、これらの抗酸菌の streptomycin (SM) および kanamycin (KM) 耐性の間には、交叉耐性がないことが明らかにされた。しかるに、今回、*Mycobacterium smegmatis* で同様の実験を行ったところ、SM 耐性と KM 耐性との間に完全交叉耐性があり、SM 耐性と KM 耐性とは同一遺伝子の変異によって起こることが示された。この所見は、*M. tuberculosis* および *M. avium* complex の場合と著しく異なっていた。

実験方法

Mycobacterium smegmatis 17023 株 (獣調株) を使用した。この株は、1947年に、当時の東京大学伝染病研究所長谷川研究室から *Mycobacterium avium* 獣調株として受領したが、その後行ったわれわれの分類学的研究により、当時 *M. avium* と分類されていた他の日本分離 "*M. avium*" 株とともに、*M. smegmatis* であることが判明した⁴⁾。被検株は単個集落由来である。

耐性発現形式

「1%小川培地」を使用し、既報¹⁾の方法によって研究した。小川培地に 37℃ 3日間培養して得た集落をガラス玉コルベン中で5分間振盪して均一化し、これを0.1% Tween 80水溶液に、湿菌量 10mg/ml に浮遊させて菌液を作った。これを 10⁻⁷まで希釈し、その各々の希釈菌液を、渦巻白金耳で 0.02ml ずつ、SM または KM を含む小川培地に接種し、37℃ 7日間培養した後に集落数を数えた。その結果から、種々の濃度における生残率 (survival fraction) = { (薬剤培地の発育集落数) ÷ (その培地に接種した colony-forming units) } を計算し、生残曲線 (survival curve) を作った。

次に、種々の濃度に発育した単個集落 (各濃度3集落) を取って小川培地に培養し、上記と同じ方法で生残曲線を作った。この方法を、もはや変わった生残曲線が得られなくなるまで繰り返した。

上述の方法で得た生残曲線は、単個集落由来株 (clone) の表現型 (phenotype) とみなしうる。しか

し、記載を簡単にするために、clones の表現型は、“actual count” 法⁵⁾⁶⁾で測定した“clone 耐性度”によって表示した。すなわち、20-100 colony-forming units の接種量を用いて1個以上の集落が発育できる最大薬剤濃度を、その clone の耐性度すなわち表現型とした。この耐性度は、被検 clone の bacterial population の 1%以上が耐性を示す濃度 (μg/ml) にほかならない。この耐性度は、生残曲線から直に読みとれる。

SM は streptomycin sulfate (明治製菓)、KM は kanamycin sulfate (明治製菓) を用い、滅菌前の培地 100 容に対して薬剤溶液 1 容を添加して所要濃度とした。培地は、16.5×165mm の試験管に 7ml ずつ分注し、90℃ 60分間滅菌して斜面培地とした。なお、本実験では、菌液の均等化のために、菌を 1% Tween 80 水溶液に浮遊させた。この水溶液では、48時間後でも生菌単位 (colony-forming units=CFU) に影響がないことを確かめた。また、小川培地を用いる限り、1%以下の Tween 80 の培地への添加は、耐性度 (感受性) の測定に、なんらの影響も与えなかった (未発表成績)。

交叉耐性

単個集落由来株の耐性度を“actual count” 法⁵⁾⁶⁾で測定して、交叉耐性の有無を観察した。本法は、上記の生残曲線の実験の場合と同じである。

SM 依存菌の分離

SM 250 μg/ml 培地に発育した単個集落を、SM 100 μg/ml 培地と対照培地 (SM なし) の両方に接種し、SM 依存性を調べた。SM なし培地で発育せず、SM 培地のみに発育する株を SM 依存菌株とした。

実験成績および考察

成績を Fig. 1, 2 および Table 1, 2 に示す。SM 16 μg/ml またはそれ以上の濃度の培地に発育した集落は、SM 1,000 μg/ml 以上耐性の高耐性菌であった。SM 4 μg/ml または 8 μg/ml に小集落を作る菌は、感性株と同じ生残曲線を作った。KM の場合は、KM 4 μg/ml 以下に発育した集落は、感性株と同じ生残曲線を作り、一方、KM 8 μg/ml または 16 μg/ml (小集落) に発育した集落は、KM 8 μg/ml 耐性であった。KM 8 μg/ml または 16 μg/ml に発育した集落を再び KM

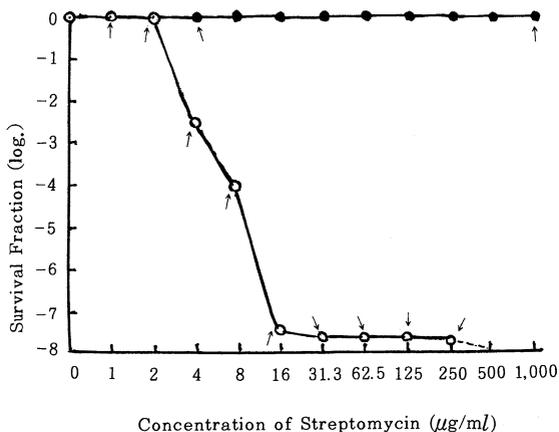


Fig 1. Pattern of resistance development of *Mycobacterium smegmatis* strain 17023 (Jucho) to streptomycin.

Open circles show the survival curve of the parent strain and closed ones that of the resistant strains isolated on the concentrations higher than 16 µg/ml streptomycin. Arrows show the concentrations, from which three isolates were taken for each concentration and examined for their survival curve. Dotted line shows that no growing colonies were observed after incubation for seven days.

8 または 16 µg/ml 培地に継代しても、それ以上耐性の株は得られなかった。

“actual count” 法で耐性度を見ると、感性株の耐性度は、SM, KM ともに 2 µg/ml, SM 耐性株の耐性度は、1,000 µg/ml 以上, KM 耐性株のそれは 8 µg/ml であった。これらの SM 耐性株および KM 耐性株の KM または SM に対する耐性度を調べると、SM 耐性株は KM 8 µg/ml 耐性, KM 耐性株は SM 1,000 µg/ml 以上耐性であり、両者の間に完全交叉耐性が見られた。SM 耐性菌または KM 耐性菌の出現率は、2 ~ 3 per 10⁸ CFU であった。SM 依存菌は、SM 耐性菌 10 個に対し 1 の比率で認められたので、感性株中の出現頻度は約 2 ~ 3 per 10⁹ CFU であると計算された。

以上のように、この株の SM 耐性表現型は SM 1,000 µg/ml 耐性の 1 種類のみであり、KM 耐性の表現型も KM 8 µg/ml 耐性の 1 種類だけである。しかも、SM 耐性菌は KM 耐性であり、KM 耐性菌は SM 耐性であるから、SM で選択した場合も KM で選択した場合も、得られる耐性菌は SM 1,000 µg/ml 以上耐性かつ KM 8 µg/ml 耐性の 2 重耐性菌 1 種類だけということになる。この SM-KM 2 重耐性菌は、SM または KM による “one step-selection” で約 2 × 10⁻⁸ の率で得られ

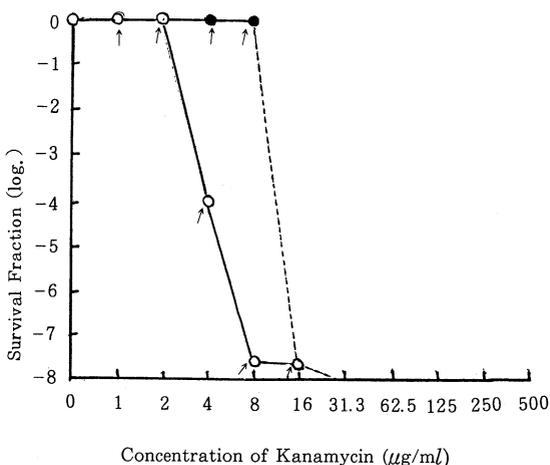


Fig 2. Pattern of resistance development of *Mycobacterium smegmatis* strain 17023 (Jucho) to kanamycin.

Open circles show the survival curve of the parent strains and closed ones that of the resistant strains isolated on the concentrations 8 or 16 µg/ml. The colonies growing on the concentration 16 µg/ml were small.

る。すなわち、同一遺伝子の “single gene-mutation” による表現型の変化が、SM 1,000 µg/ml 以上および KM 8 µg/ml 同時耐性であると考えられる。

われわれは、前に、*M. tuberculosis* と *M. avium*

Table 1. Comparison of the Susceptibilities to Streptomycin and Kanamycin between Strains Isolated on Streptomycin and Those on Kanamycin

Strain*	Level of resistance determined by the actual count method (µg/ml)	
	Streptomycin	Kanamycin
SM 16 R	>1,000	8
SM 32 R	>1,000	8
SM 62.5 R	>1,000	8
SM 125 R	>1,000	8
SM 250 R	>1,000	8
KM 8 R	>1,000	8
KM 16 Ra	>1,000	8
KM 16 Rb	>1,000	8

* For example, SM 125 R shows the strain isolated on 125 µg/ml streptomycin, and KM 8 R the strain isolated on 8 µg/ml kanamycin.

Table 2. Isolation of Streptomycin-Dependent Mutants

Experiment	Isolation rate of SM 250 R in parent viable population	Isolation rate of streptomycin-dependent mutants in SM 250 R strain	Isolation rate of streptomycin-dependent mutants in parent viable population
1	2.6×10^{-8}	(3/23)=0.13	3×10^{-9}
2	2.0×10^{-8}	(3/32)=0.10	2×10^{-9}

Table 3. Comparison of the Resistance System for Streptomycin and Kanamycin among *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium smegmatis*

	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.avium</i> complex	<i>M.smegmatis</i>
Phenotype of resistance	SM ^h SM ^m SM ^l KM ^h KM ^l	SM ^h SM ^l KM ^h	SM ^h -KM ^l

SM^h: Highly streptomycin-resistant mutants (resistant to more than 1,000 $\mu\text{g/ml}$).

SM^m: Moderately streptomycin-resistant mutants (resistant to 200 $\mu\text{g/ml}$).

SM^l: Lowly streptomycin-resistant mutants (resistant to 3-50 $\mu\text{g/ml}$).

KM^h: Highly kanamycin-resistant mutants (resistant to more than 1,000 $\mu\text{g/ml}$).

KM^l: Lowly kanamycin-resistant mutants (resistant to 8-200 $\mu\text{g/ml}$).

complex の SM 耐性および KM 耐性形式を研究した。*M. tuberculosis* 05001 株 (H₃₇ Rv 株) の SM 耐性と KM 耐性の間には交叉耐性はなかった。そして SM 耐性突然変異菌には 3 種類の表現型があった。すなわち、50 $\mu\text{g/ml}$ 耐性、200 $\mu\text{g/ml}$ 耐性、1,000 $\mu\text{g/ml}$ 耐性の 3 種である。また、KM 耐性については、KM 200 $\mu\text{g/ml}$ 耐性と、1,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上耐性の 2 つの表現型があった²⁾。したがって、*M. tuberculosis* の SM 耐性および KM 耐性に関する表現型は合計 5 種である。

これに対し、*M. avium* complex の SM 耐性表現型は 1 または 2、KM 耐性表現型は 1 であった³⁾。また、SM 耐性と KM 耐性の間には、交叉耐性はなかった⁷⁾。したがって、*M. avium* complex (3 株) の SM 耐性および KM 耐性に関する表現型数は合計 2 または 3 である。これに対して、*M. smegmatis* のそれは、本報に示すように、ただ 1 型のみである (Table 3)。

結 論

Mycobacterium smegmatis 17023 株 (獣調株) の感性菌は、SM 2 $\mu\text{g/ml}$ または KM 2 $\mu\text{g/ml}$ に発育するが、それ以上の濃度には発育しない。この株から分離される SM 耐性菌の表現型は SM 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 耐性の 1 種だけである。一方、KM 耐性菌の表現型も 8 $\mu\text{g/ml}$

耐性の 1 種だけである。しかも、SM 耐性菌は KM 耐性、KM 耐性菌は SM 耐性で、SM 耐性と KM 耐性の間には完全な交叉耐性がある。したがって、この株の SM 耐性、KM 耐性に関する表現型は、SM 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 耐性であり、同時に KM 8 $\mu\text{g/ml}$ 耐性の 1 種類だけということになる。前に研究した *M. tuberculosis* の SM および KM 耐性の表現型数は 5 型であり、*M. avium* complex のそれは 2~3 であった。*M. smegmatis* はただ 1 型の表現型しかもたない。

文 献

- 1) Tsukamura, M.: Variation and heredity of mycobacteria with special reference to drug resistance, Jpn J Tuberc, 9 : 43-64, 1961.
- 2) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Cross-resistance relationships among aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis*, J Gen Microbiol, 88 : 269-274, 1975.
- 3) 東村道雄 : *Mycobacterium avium* complex の抗結核剤に対する耐性形式, 結核, 62 : 445~458, 1987.
- 4) 東村道雄, 外山春雄, 水野松司 : *Mycobacterium* 獣調株及び竹尾株の分類, 日本細菌学雑誌, 19 :

- 469~471, 1964.
- 5) 東村道雄 : Kanamycin の耐性検査, 医学と生物学, 49 : 87~90, 1958.
- 6) Tsukamura, M.: "Actual count" method for the resistance test of tubercle bacilli, Jpn J Tuberc, 12 : 46-54, 1964.
- 7) 東村道雄 : *Mycobacterium avium* complex の抗結核剤に対する交叉耐性, 結核, 64 : 1~5, 1989.