

結核菌の薬剤耐性の研究. I

人病巣由来結核菌による不完全耐性の解析

田中徳満・角田光子

群馬大学医学部微生物学教室

(昭和50年11月4日受付)

細菌の薬剤耐性の研究はその疫学的調査を土台として、遺伝学的、生化学的研究はひじょうに進歩した。グラム陽性、陰性を問わず、その耐性を支配する遺伝子の多くは細胞質性に存在するプラスミド上にあるものが多いことが判明し、メンデル遺伝と異なる新しいタイプの遺伝学の進歩を促した¹⁻³⁾。

これに反し、結核菌における薬剤耐性の研究は、耐性値の測定に日数を要すること、および完全耐性、不完全耐性の問題が加わり、他の細菌の場合に比しその進歩が遅れているのが現状である。

今回我々は、人病巣由来結核菌を用いて耐性測定の基本的検討を行なったのでその結果について報告する。

実験材料および方法

使用菌株：結核菌耐性研究会(会長：河盛勇造先生)の会員によって分離された人病巣由来結核菌の新鮮分離株を材料として使用した。

培地：菌株の継代には小川培地を用い、実験における前培養には DUBOS 液体培地を使用した。薬剤耐性の測定には KIRCHNER 半流動寒天培地を使用した。

薬剤：耐性値測定には Kanamycin(KM), Rifampicin(RFP), 6-Amino-deoxykanamycin B (DKB), Lividomycin (LVDM) を使用した。

薬剤耐性の測定：送付されてきた菌株を型のとおり菌塊を砕いた後、ガラス玉を入れた DUBOS 培地に接種、1日に数回軽く振盪し培養した。菌量が 1 mg/ml 程度に増殖後、東洋濾紙 No.2 で濾過し、濾液 0.1 ml をガラス玉加 DUBOS 培地 5 ml に加えて再培養後、 10^5 個/ml および 10^2 個/ml の菌液を調製し、その 0.1 ml を種々の薬剤濃度を含む KIRCHNER 半流動寒天培地 5 ml 中に接種して各週毎に観察し、4 週を以て最終判定とした。MIC は結核菌の増殖が完全に阻止された濃度をもって表わし、MAC は薬剤を含まない対照培地と同程度に増殖した試験管中の薬剤の最高濃度を以て表現した。なお菌液の調整は硫酸バリウムを対照とする比濁による検量曲線から算出した⁴⁾。

結 果

結核菌の菌液調製で常に問題になるのは均一な菌液を

得ることであり、できるだけ顕微鏡的にも単個の菌浮遊液を得なくてはならないことは記すまでもない。今回我々の目的の1つである不完全耐性の解析には、とくに単個菌を以て検討する必要がある、ガラス玉を用いての培養を試みた。

1. 単個菌を得るためのガラス玉および濾紙濾過の意義

各施設から送付された菌株から2株を用い、濾紙濾過による単個菌分離を試みた。小川培地に培養され送付されてきた菌株を試験管の内壁でよく砕き、均一な菌液を得る目的で直径約 5 mm のガラス玉を加えた DUBOS 培地 5 ml に接種、時々振盪を加えて培養した。菌量が 1 mg/ml 程度に増殖した後、東洋濾紙 No.2 で菌液を濾過し、濾液 0.1 ml をさらにガラス玉加 DUBOS 培地 5 ml に接種し再培養を行なった。濾紙濾過の際、染色標本を作製し顕微鏡的に散在する菌数の分布を算定した。

菌株 MT 17 についての結果は Table 1 に示すとおりである。ガラス玉加 DUBOS 培地に培養された場合、単個菌として散在する結核菌は分布総数の 48.7% であった。菌液を濾過することによって菌数は $1/3 \sim 1/6$ に減少するが、染色標本によって観察される単個菌の分布は 76.1% となり、さらに濾過菌液の再培養によって 85.3% とその頻度は上昇した。観察された総菌数に対する単個菌の割合は、濾過前・後および再培養により 14.3%, 31.1% および 57.7% を示した。菌数分布の結果が即集落形成単位として断定できないまでも、ガラス玉および濾紙濾過によって単個菌が高頻度に得られることが判明した。従って以後の実験における DUBOS 培養にはガラス玉を加えて培養を行なった。

2. KM 耐性の測定と完全および不完全耐性の解析

26 株を用いて KM に対する耐性値の分布を検討した。その結果は Fig. 1 に示すとおり、 10^4 個/ml の接種菌量では 0.4 $\mu\text{g/ml}$ および 100 $\mu\text{g/ml}$ にピークを示す2群と 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性値を示す第3のグループに分けられた。しかし接種菌量 10 個/ml では 0.1~0.4 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ および 1,600 $\mu\text{g/ml}$ の3つのグループとなり、100 $\mu\text{g/ml}$ のピークは 6.25 $\mu\text{g/ml}$ に移動

Table 1 Isolation of single bacterial cells in *M. tuberculosis* by filtration

Treatment	Distribution of beacterial cell aggregates (%)					No. of cell aggregates observed	No. of single cells in total number of bac- terial cells ^{b)} (%)
	No. of single cells	No. of bacterial cells in an aggregate ^{a)}					
		2~3	4~5	6~10	>10		
Before filtration	458(48.7)	234(24.9)	90(9.6)	98(10.4)	60(6.4)	940	458/3,200 (14.3)
After filtration	340(76.1)	44(9.8)	18(4.0)	22(4.9)	23(5.1)	447	340/1,095 (31.1)
Reincubation	1,126(85.3)	126(9.5)	40(3.0)	20(1.5)	8(0.6)	1,320	1,126/1,952 (57.7)

Incubation : DUBOS liquid medium containing glass beads. The culture was gently shaken 5 to 6 times in a day. Cultures were filtered by a filter paper (Toyo Roshi No.2).

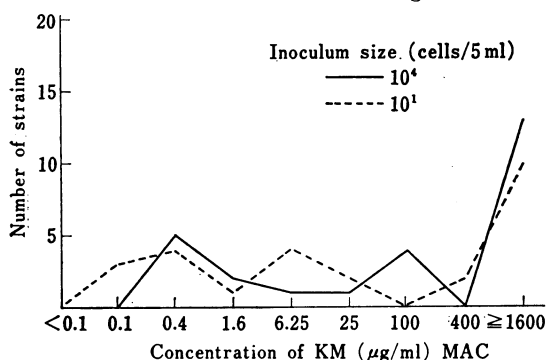
a) Number of bacterial cells in an aggregate was determined microscopically after staining.

b) Total number of bacterial cells was computed as the sum of each product of the number of aggregates and the number of bacterial cells in each aggregate.

Fig. 1 Distribution of the level of KM-resistance

Incubation time : 4 weeks

Medium : KIRCHNER's soft agar



したかのように観察された。しかしこの耐性値の変動は接種菌量だけによるものとしてはその差は著しく、他の細菌にみられない現象である。ここにも結核菌の耐性

検査に多くの検討を必要とすることを示唆している。

高度耐性、中等度耐性および不完全耐性と判定される5株についての検査結果を Table 2 に示した。

KM に対して高度耐性菌であり、しかも完全耐性と判定される菌株の MT 4 および MT 20 は、KM 1,600 µg/ml を含む KIRCHNER 半流動寒天培地内でも、薬剤を含まない対照培地内でも、接種菌量に関係なく同程度に発育した。薬剤を含まない対照培地から各々の菌株、3コロニーづつを採取し、再び KM 耐性値を測定したが、全く同一の結果が得られ、個々の菌はそれぞれ完全に高い KM 耐性値を有している純粋な菌集団であることが明らかになった。

耐性検査の結果から不完全耐性と判定される MT 2, MT 21 および MT 12 では接種菌量による耐性値の変動は著しいことが判明した。この著明な差は接種菌量の問題ではなく、耐性値の異なるクローンの集団であるこ

Table 2 Type of KM-resistance in *M. tuberculosis*

Type of KM-resistance	Strain	Inoculum size (cells/5 ml)	Degree of bacterial growth ^{a)}					
			Concentration of KM (μg/ml)					Control
			6. 25	25	100	400	1, 600	
Complete	MT 4	10 ⁴ 10 ¹	+++ ^{b)} +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
	MT 20	10 ⁴ 10 ¹	+++ +21	+++ +18	+++ +22	+++ +22	+++ +22	+++ +21 ^{c)}
Incomplete	MT 2	10 ⁴ 10 ¹	+++ +32	+++ +18	+++ —	+++ —	+++ —	+++ +32
	MT 21	10 ⁴ 10 ¹	+++ +14	+++ +15	+++ —	+++ —	+++ —	+++ +11
	MT 12	10 ⁴ 10 ¹	+++ +3	+++ +30	+++ —	+++ +3	+++ +10	+++ +10

a) Time of incubation ; 4 weeks in KIRCHNER's soft agar.

b) Degree of bacterial growth ; +++ : heavy, ++ : medium, + : slight, — : no growth.

c) Number indicates the countable number of colonies.

Table 3 Level of KM-resistance in each clone

Type of KM-resistance	Strain	Clones from	Level of KM-resistance (MAC : $\mu\text{g/ml}$)
Incomplete	MT 2	control KM 400	100~25*, 100~25, 100~100, 100~100, 100~100 400~400, 400~400, 400~400, 400~400
	MT 21	control KM 100	100~25, 100~25, 25~6.25, 25~6.25 400~100, 400~100, 100~100, 100~100
	MT 12	control KM 100	0.4~0.4, 0.4~0.4, 1.6~0.4, 1.6~1.6, 1.6~1.6 400~400, 400~400, 400~400, 400~400, 400~400

Each colony was incubated in DUBOS medium for 2 weeks.

The level of KM-resistance was determined in KIRCHNER's soft agar.

* (a-b) indicates the level of KM-resistance.

The inoculum size ; a : 10^4 cells/5 ml, b : 10^1 cells/5 ml.

とが推定される。そこで MT 2, MT 21 および MT 12 株の各々を用い, KM 加培地および KM を含まない対照培地中に発育したコロニーを採取し, DUBOS 培地で前培養後各コロニーについて KM 耐性値の再検査を試みた (Table 3)。

MT 12 について考察すれば, KM 100 $\mu\text{g/ml}$ の培地から得たコロニーの耐性値 (MAC) は接種菌量に関係なく 400 $\mu\text{g/ml}$ で, 完全耐性を示しているが, 薬剤を含め対照培地から得た 5 コロニーの KM 耐性値は 0.4 $\mu\text{g/ml}$ および 1.6 $\mu\text{g/ml}$ の MAC 値であった。MT 2 および MT 21 も同様に不完全耐性と判定される菌株は耐性値の異なる 2 種またはそれ以上のクローンの集団であるという結果が示された。

KM 耐性と DKB および LVDM 耐性との関係を 9 株について検討した結果を Table 4 に示した。KM 耐性と DKB 耐性とは交叉耐性を示すとともに, DKB 耐性

Table 4 Cross resistance relationship among KM, DKB and LVDM resistance in *M. tuberculosis*

Strain	Level of drug sensitivity (MIC, $\mu\text{g/ml}$)		
	KM	DKB	LVDM
MT 4	$\geq 3,200$	$\geq 3,200$	25
14	$\geq 3,200$	$\geq 3,200$	25
1	$\geq 3,200$	$\geq 3,200$	25
20	$\geq 3,200$	$\geq 3,200$	100
23	400	$\geq 1,600$	25
25	400	400	25
3	6.25	25	1.6
5	1.6	25	1.6
120	6.25	50	1.6

Inoculum size : 10^4 cells/5 ml in KIRCHNER's soft agar medium.

Incubation time : 4 weeks

値は KM 耐性値と同程度もしくはそれ以上の値を示していた。LVDM 耐性値は KM 耐性値の上昇とともに高い値を示したが, 相対的にはその値は低く, MIC3, 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の KM 値を示す 4 株中 3 株は LVDM 25 $\mu\text{g/ml}$, 1 株が 100 $\mu\text{g/ml}$ の MIC 値であった。

3. RFP 耐性の測定と完全および不完全耐性の解析

の解析

RFP 10 $\mu\text{g/ml}$ 感受性 (10^0) 9 株, 10 $\mu\text{g/ml}$ 不完全耐性 (10^1) (i, incomplete) 1 株, 50^1 7 株, 50 $\mu\text{g/ml}$ 完全耐性 (50^0) (c, complete) 5 株, 100^1 2 株, 100^0 5 株の計 29 株を用いて RFP 耐性値を測定した。

$50^1 \sim 100^0$ の耐性とされる 19 株についての耐性測定の結果は Fig. 2 a に示すとおり, 薬剤加 KIRCHNER 半流動寒天培地への接種菌量により RFP 耐性値の分布にも変動がみられ, $10^4/5$ ml の接種菌量での MAC は 100 $\mu\text{g/ml}$ を示す菌株が, $10^1/5$ ml の接種では 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と著しい低下がみられた。また MAC と MIC 値にも大きな差を示すことが明らかであり, これらは不完全耐性と判定される菌株に著明であった。 10^0 および 10^1 の 10 株についての耐性分布を Fig. 2 b に示した。前者は著明ではないが接種菌量によってその耐性値分布に変動が認められた。

RFP 完全耐性および不完全耐性と判定された菌株 MT 8 および MT 5 について KM 耐性菌を用いて解析した方法に従って検討を加えた。完全耐性と判定される MT

Fig. 2 Distribution of the level of RFP-resistance

Incubation time : 4 weeks

Medium : KIRCHNER's soft agar

Inoculum size (cells/5 ml) ; — : 10^4 , ---- : 10^1

a : Result of 19 strains of RFP $50^1 \sim 10^0$ resistant strains

b : Result of 10 strains of RFP 10^1 resistant and 10^0 strains

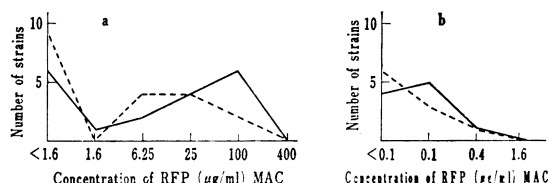


Table 5 Type of RFP-resistance in *M. tuberculosis*

Type of RFP-resistance	Strain	Inoculum size (cells/5 ml)	Degree of bacterial growth					Control
			Concentration of RFP ($\mu\text{g/ml}$)					
			1.6	6.25	25	100	400	
Complete	MT 8	10^4 10^1	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	— —	+++ +
Incomplete	MT 5	10^4 10^1	+ +2	+ +8	+ +3	+10 —	— —	++ +90

See Table 2.

Table 6 Level of RFP-resistance in each clone

Type of RFP-resistance	Strain	Clones from	Level of RFP-resistance (MAC: $\mu\text{g/ml}$)
Incomplete	MT 5	Control RFP 25	0.025~0.025, 0.025~0.025 100~100 100~100

See Table 3.

8 については、 $10^4/5$ ml を接種した薬剤を含まない対照培地から得た数コロニーを用い再検査しても全く同様の結果を示した。つまり接種菌量と関係なく同一の耐性値を示した。MT 5 から得たコロニーでの再検査の結果は MAC 100 $\mu\text{g/ml}$ を示すクローンと 0.025 $\mu\text{g/ml}$ を示す 2 つのクローンの混ざりであることが証明された。

MT 5 から得られた RFP 耐性のクローンと感受性のクローンを人為的に混ぜ合わせ、再び前と同様に耐性値測定を行なうと、MT 5 の元株が示したように接種菌量の差による耐性値に大きい変動を示す、いわゆる不完全耐性の形をとった。

討 論

腸内細菌の薬剤耐性検査を行なう場合、薬剤によっては接種菌量によって生ずる耐性値に著明な差異が認められるが、接種菌を希釈し被検菌の薬剤加平板への菌量を $10^6/\text{ml}$ の白金耳を接種することによって、一定の値が

得られることを、すでに報告した^{5,6)}。ブドウ球菌等においても同じ結果を得ている。また耐性菌研究の目的から、我々は MIC よりむしろ薬剤を含まぬ対照培地と同程度に発育の認められた薬剤の最高濃度を以て表現する MAC 値を採用してきた。これは結核菌の耐性検査結果の表現として用いられる完全耐性に相当するものと思われる。

結核菌を取扱う場合、腸内細菌と異なり特有のコード形成により顕微鏡的にも均一な菌液を得ることはむづかしく、界面活性剤である Tween 80 を培地中に添加した培地を用いても、相当数の菌は顕微鏡的には数個の塊まりとして存在していることは衆知の事実である。今回我々は DUBOS 液体培地中にガラス玉を入れ、時々振盪を加えて培養するとともに、汚紙汚過後、再培養することによって顕微鏡的にも単個菌が高頻度で得られることを確認した。遺伝学的研究には 1 個の細胞の示す性状の解析が必要であって、漸くにして今後人型結核菌の遺伝学的解析が行なえる段階に到ったものと思われる。

これまで知られておるとおり、結核菌の薬剤耐性には完全耐性、不完全耐性の表現が慣用されていた。

KM および RFP に対する結核菌の耐性検査に際し、接種菌量を変えることにより、完全耐性と不完全耐性の検査結果に明確な差が生じ、KM および RFP 不完全耐

Table 7 Reconstruction of incomplete type of RFP-resistance in *M. tuberculosis* by mixing RFP^r and RFP^s clones

Ratio of mixing r : s	Inoculum size (cells/5 ml)	Degree of bacterial growth									
		Concentration of RFP ($\mu\text{g/ml}$)									Control
		0.006	0.25	0.1	0.4	1.6	6.25	25	100	400	
1 : 10	10^4 10^1	+++ +80	+++ +80	++ +60	++ +6	++ +5	+++ +6	++ +5	++ +4	+	+++ +80
1 : 100	10^4 10^1	+++ +60	+++ +60	++ +40	++ —	+	+	+	+	—	+++ +60

RFP-resistant (r) or RFP-sensitive (s) clone was isolated from MT 5 strain.

Each clone was incubated in DUBOS medium and the bacterial suspension was adjusted to 1 mg/ml. After mixing the RFP^r and RFP^s clones, the level of RFP-resistance was determined in KIRCHNER's soft agar.

性菌のあるものは、耐性値の異なる2つまたはそれ以上のクローンの混ざりであることが明らかになった。

結核菌以外の細菌の耐性検査の場合、その菌が同一クローンに属する集団であることの決定は比較的容易であるが⁹⁾、結核菌の場合、その決定は容易でなく、すでに古くから完全耐性、不完全耐性の言葉の示すように、結核菌の示す耐性の遺伝学的性状は複雑な問題のあることが指摘され、これまでに多くの解析が行なわれてきた⁷⁻¹⁰⁾。

今回我々の行なった解析から不完全耐性菌の中には、異なった耐性値をもつ2種または2種以上のクローンの集団があることをKMおよびRFP耐性菌を用いて証明した。

結 論

1. 結核菌の菌液調整においてDUBOS液体培地にガラス玉を加えて培養後、汙紙汙過により顕微鏡的にも高頻度に単個菌を含む菌液を調製することができた。

2. KMおよびRFP耐性菌を用いて完全耐性、不完全耐性の問題を検討し、完全耐性菌は個々の菌が高い耐性値を示す純粋の菌集団であり、不完全耐性菌とは異なった耐性値をもつ2種または2種以上のクローンの集団であることを証明した。

謝 辞

稿を終るに当たり、結核菌の分与および御指導をいただいた結核菌耐性研究会(班長:河盛勇造先生)の諸先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) MITSUHASHI, S.: *In* Transferable drug resistance factor R, University of Tokyo Press, 1971
- 2) MITSUHASHI, S.; S. IYOBE & M. INOUE: *In* Drug resistance in bacteria, pp.143~179, Karger, Basel, 1975
- 3) MITSUHASHI, S.; M. INOUE, H. KAWABE, H. OSHIMA & T. OKUBO: *In* Staphylococci and staphylococcal infections, pp.144~165, Karger, Basel, 1973
- 4) 室橋豊穂, 他: 結核菌検査指針, 56, 1972
- 5) 三橋 進, 永井 裕, 田中徳満, 福本 一: *Chemotherapy* 17: 1956, 1969
- 6) 三橋 進: 薬剤と耐性菌, 南江堂, 77, 1970
- 7) TSUKAMURA, H.: *J. Antibiotics*, Ser. A 10: 219, 1957
- 8) PYLE, M. M.: *Proc. Staff Meet., Mayo Clin.* 22: 465, 1947
- 9) 小酒井 望: 結核 25: 320, 1950
- 10) MITCHSON, K. K.: *Thorax* 5: 144, 1950

DRUG RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. I

Genetic Analysis of the Incomplete Resistance to Kanamycin and Rifampicin

TOKUMITSU TANAKA and MITSUKO TSUNODA

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

Mycobacterium tuberculosis was cultured in DUBOS liquid medium containing glass beads to obtain a bacterial suspension containing single cell at a high percentage for genetic studies of the microorganism. The culture was gently and manually shaken 5 to 6 times a day, resulting in the increase of single cell in the population. By repeated cultures in the same medium after filtration of the culture through filter paper (Toyo Roshi No.2), about 85 percent of the population exhibited to consist of single cell by microscopic observation.

Complete or incomplete resistance to kanamycin (KM) and rifampicin (RFP) was investigated by changing the inoculum size of bacterial cell suspension containing single cell at a high percentage. The complete resistance was found to reflect the pure population of cell with the same resistance to the drugs. By contrast, the microorganisms showing incomplete resistance were found to consist of two (or more) clones with different resistance levels of the drugs.