

原 著

## 結核菌の Ofloxacin 耐性に関する研究

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和60年4月6日

STUDIES ON THE OFLOXACIN RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI  
Michio TSUKAMURA\* and Shoji MIZUNO

(Received for publication April 6, 1985)

*Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and Aoyama-B and *Mycobacterium bovis* strains Ravenel and BCG (Japan) developed two phenotypes of mutants resistant to ofloxacin. Higher resistance was obtained only by inoculating lowly resistant strains on media containing high concentrations of ofloxacin. From parent strains, only lowly resistant mutants were isolated. Therefore, the pattern of resistance development of tubercle bacilli to ofloxacin is two step-pattern. Both lowly and highly resistant strains showed the same biological and biochemical characteristics as had the parent strains. Virulence to mice of the resistant strains were the same as that of the parent strains.

**Key words:** Ofloxacin, Ofloxacin resistance, Tubercle bacilli, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, Virulence to mice, Biological and Biochemical characteristics

**キーワード:** Ofloxacin, Ofloxacin 耐性, 結核菌, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, マウスに対する毒力, 生物学的生化学的性状

## 緒 言

東村他<sup>1)</sup>は、新抗菌物質 Ofloxacin (旧名 DL 8280, 以下 OX) が肺結核の治療に有効であることを報告したが、この OX を肺結核の治療に使用する時、治療開始後 2~3 カ月 (治療の第 3 または第 4 月) で OX 耐性結核菌集団が発現することがわかった。そこで、結核菌の OX 耐性について詳細な基礎的観察を行なうことが必要と思われた。本研究は、この目的で行なった。

## 研究 方法

使用菌株は、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株および青山 B 株、並びに *Mycobacterium bovis* Ravenel 株および BCG 日本株である。培地はすべて 1% 小川培地を使用した。

小川培地の組成は、原液 (1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  および 1% sodium glutamate), 100 ml; 全卵液, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% malachite green 水溶液, 6 ml で、これを 165 × 16.5 mm の試験管に 7 ml ずつ分注して、90°C 60分滅菌により斜面培地とした。菌液の接種は、1 白金耳接種で 0.02 ml を接種しうる渦巻白金耳で行なった<sup>2)3)</sup>。

結核菌の OX 耐性形式の研究は、既報の方法を用いた<sup>4)</sup>。使用菌株およびそれから分離した耐性株の性状検査の方法は既報した<sup>5)</sup>。

マウスに対する毒力の測定は次のごとくに行なった。使用したマウスは、dd-Y 系の SPF 雄性マウスで、実験開始時の平均体重は、 $24.5 \pm 1.1$  g であった。72匹のマウスを 24匹ずつの 3 群に分ち、各々に、*M. bovis* Ravenel の原株、OX 低耐性株、OX 高耐性株を湿菌

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

量1 mg ずつ腹腔内注射した。各株とも小川培地2週培養菌から2 mg/ml の菌液を作り、その0.5 ml ずつを注射した。注射された菌液に含まれる生菌単位数は、菌液を10倍希釈して $10^{-5}$  まで希釈し、各希釈液を小川培地に接種して測定した。接種生菌単位数は、原株 $3.0 \times 10^7$ 、OX低耐性株 $2.3 \times 10^7$ 、OX高耐性株 $2.0 \times 10^7$ であった。OX低耐性株は、原株をOX 1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有培地に接種して発育した単個集落に由来している。また、OX高耐性株は、OX低耐性株をOX 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地に接種して得た単個集落を分離し、これを更にOX 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  培地に接種して得た単個集落に由来するものである。マウスに対する毒力は、マウス1匹の肺および肝に含まれた生菌単位数で表示した。方法は1週の間隔で、各群3匹のマウスを殺し、その肺および肝を合わせて秤量し、各々に5倍量の水を加えて均一化した。これに臓器の5倍量の2% NaOHを加えて混合し、これを $10^{-4}$  まで希釈した。最初の臓器液およびその希釈液を渦巻白金耳で0.02 ml ずつ小川培地に接種し、37°C に培養した。1つの希釈液あたり3本の培地を使用した。集落数は3週培養後に数えた。しかし、マウス体内に4週以上生残した菌は培地での発育が遅かったので、4週培養後に集落数を数えた。マウスに対する毒力は、マウス1匹の肺内または肝内に含まれた生菌単位数で表わした。

## 研究結果

### 結核菌の Ofloxacin 耐性形式

*M. tuberculosis* H37Rv 株のOX耐性形式は前に報告したので<sup>4)</sup>、ここには示さない。*M. tuberculosis* 青山B株および *M. bovis* Revenel 株およびBCG株の耐性形式は、Fig. 1~3に示してある。いずれも、H37Rv株と同じ形式である。即ち、耐性表現型(原株と異なる生残曲線の型)<sup>6)</sup>は2つであり、低耐性と高耐性ととの2段階がある。single colonies に由来する“clones”の生残曲線のみを限り、耐性表現型は2型しかなく、この間の中間型はない。高耐性株は原株から one step-selection で得ることはできない。一旦、低耐性株を分離し、これを更に高濃度のOXを含有する培地に接種してはじめて高耐性株を得ることができる。即ち、耐性形式は、最高度の耐性菌を分離するのに2回の selectionが必要な形式、“two step-pattern”である。

### Ofloxacin耐性菌の生物学的、生化学的性状

*M. tuberculosis* H37Rv 株および *M. bovis* Ravenel 株の原株、OX低耐性株およびOX高耐性株の性状を比較検査したが、OX耐性株は原株の特徴を保有していて、原株との相違点を見出すことができなかった。(Table 1)。

**Table 1.** Comparison of Biological and Biochemical Characteristics between Parent Strains and Ofloxacin-Resistant Strains

	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv			<i>M. bovis</i> Ravenel		
	Parent	Lowly resistant	Highly resistant	Parent	Lowly resistant	Highly resistant
Growth at 28°C	-	-	-	+	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	+
Growth at 42°C	-	-	-	-	-	-
Resistance to $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
Resistance to thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>a</sup>	+	+	+	-	-	-
Resistance to sodium salicylate, 0.5 mg/ml <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
Resistance to p-nitrobenzoic acid, 0.5 mg/ml <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
Arylsulfatase (14 days)	-	-	-	+	+	+
Nitrate reduction (24 hours)	+	+	+	-	-	-
$\alpha$ -Esterase	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Esterase	+	+	+	+	+	+
Niacin	+	+	+	-	-	-
Nicotinamidase	+	+	+	-	-	-
Pyrazinamidase	+	+	+	-	-	-
Glucose as C source (glutamate-N)	+	+	+	+	+	+
Growth on Sauton agar medium	+	-	-	-	-	-
Cord formation	+	+	+	+	+	+

\* Scanty growth. a Tested in Ogawa egg medium.

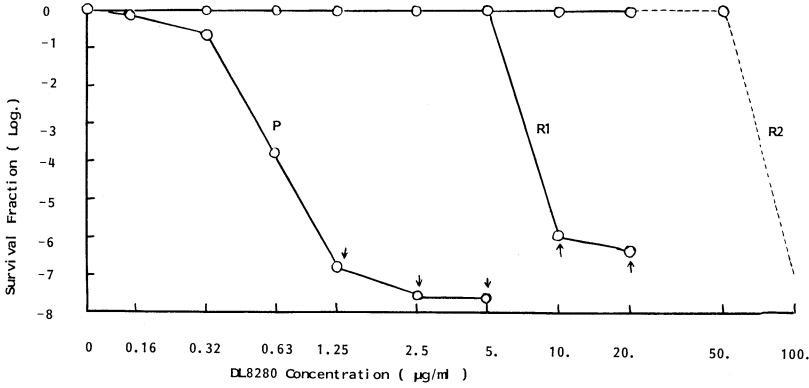


Fig. 1. Pattern of resistance development to ofloxacin (DL 8280) of *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama-B.

P is the survival curve of the parent strain, R1 is the survival curve of lowly resistant strains, which were isolated from single colonies growing on the concentrations indicated by arrows on P, and R2 is the survival curve of highly resistant strains, which were isolated from lowly resistant strains on the concentrations indicated by arrows on R1. Dotted line shows that no higher resistant mutants have not been isolated. Growth of highly resistant strains on the concentration 50 µg/ml was unstable.

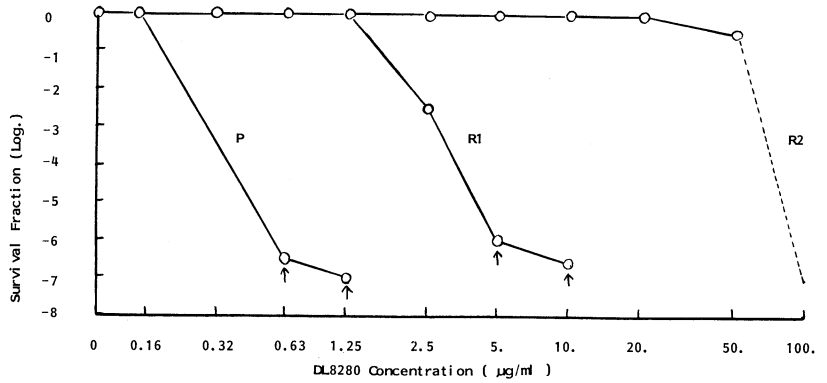


Fig. 2. Pattern of resistance development to ofloxacin (DL8280) of *Mycobacterium bovis* strain Ravenel.

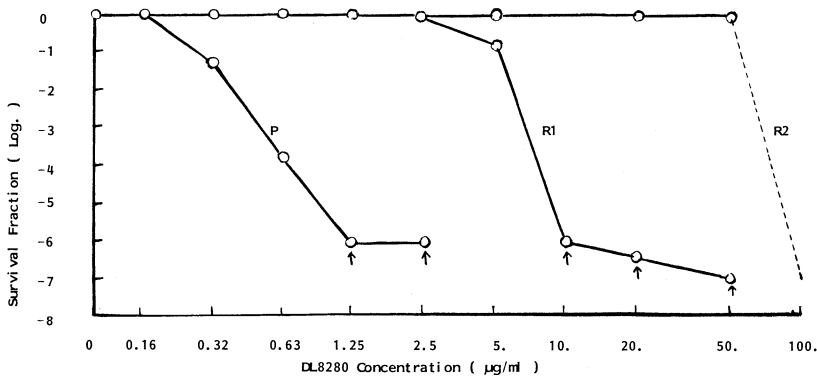


Fig. 3. Pattern of resistance development to ofloxacin (DL8280) of *Mycobacterium bovis* strain BCG (Japan).

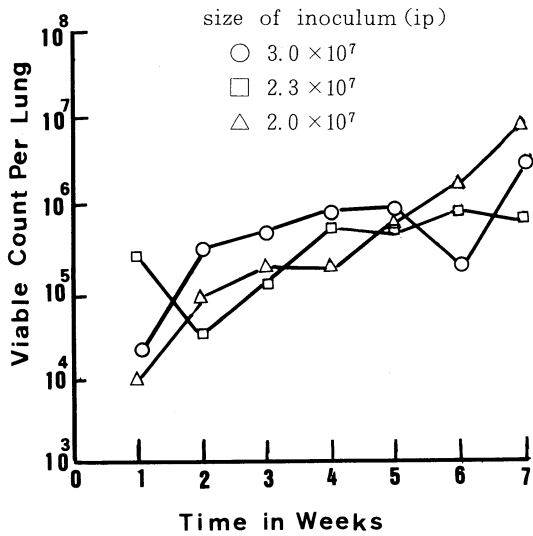


Fig. 4. Virulence in mice of the parent strain (○—○), lowly ofloxacin-resistant strain (□—□), and highly ofloxacin-resistant strain (△—△) of *Mycobacterium bovis* strain Ravenel expressed as the viable number of bacteria recovered from the lungs.

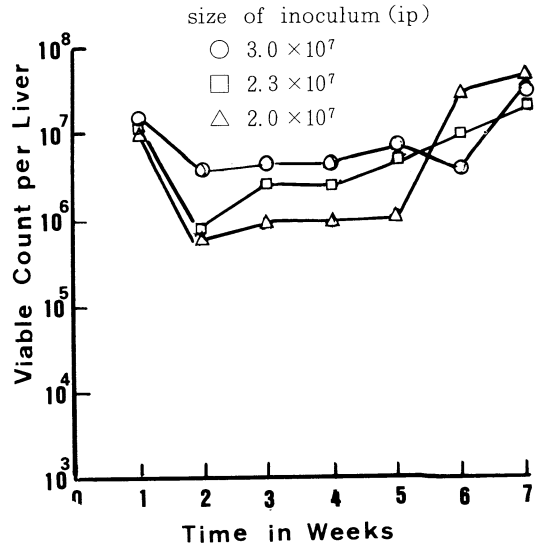


Fig. 5. Virulence in mice of the parent strain (○—○), lowly ofloxacin-resistant strain (□—□), and highly ofloxacin-resistant strain (△—△) of *Mycobacterium bovis* strain Ravenel expressed as the viable number of bacteria recovered from the liver.

#### Ofloxacin 耐性菌のマウスに対する毒力

マウスの肺および肝に含まれる生菌単位を指標として、*M. bovis* Ravenel 株の原株と OX 低耐性株と OX 高耐性株のマウスに対する毒力を観察したが、OX 耐性株と原株の間に毒力の差を見出すことはできなかった (Fig. 4 および 5)。

#### 考 察

*M. tuberculosis* および *M. bovis* の Ofloxacin 耐性形式は、すべて two step-pattern であり、耐性表現型は 2 型であった。耐性度の段階としては、低耐性 (1.25~5 µg/ml 耐性) と高耐性 (20 µg/ml 以上耐性) の 2 段階が見出されるだけで、連続的な耐性の段階はない。このような two step-pattern は前に *M. tuberculosis* の INH 耐性で見出されている<sup>6)</sup>。しかし、INH 耐性の場合、*M. bovis* の耐性形式は single step-pattern であって、*M. tuberculosis* と *M. bovis* とで形式が異なっている<sup>6)</sup>。Ofloxacin に関しては、*M. tuberculosis* も *M. bovis* もともに two step-pattern である点で特異的である。

我々は前に Ofloxacin による肺結核治療の 1 年間観察の成績を報告したが<sup>1)</sup>、その際、1 症例で奇異な現象が認められた。即ち、一旦 Ofloxacin 耐性菌が少量喀痰中に排泄され、これが間もなく消失して菌が陰性化した症例があった。このような現象は、今までの化学療法

剤で経験されなかったもので、あるいは Ofloxacin 耐性菌の毒力の減弱が起こっているのではないかと考えた。本報の研究は、このために実施したのであるが、その結果は、Ofloxacin 耐性菌の生物学的・生化学的性状は原株と変わっていないし、また、マウスに対する毒力も変化してはいなかった。

#### 結 論

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株および青山 B 株並びに *Mycobacterium bovis* Ravenel 株および BCG (日本) 株の Ofloxacin 耐性形式は two step-pattern であり、耐性表現型は 2 型であった。高耐性株は、直接、原株からは分離されず、低耐性株からのみ分離された。Ofloxacin 耐性株は、低耐性株も高耐性株も、原株と同じ生物学的、生化学的性状を示した。また、マウスに対する毒力も、原株と Ofloxacin 高、低耐性株の間に差はなかった。

#### 文 献

- 1) 束村道雄他：新抗菌物質 Ofloxacin (DL8280) の肺結核に対する臨床効果 (1 年間投与の成績), 結核, 60: 365—369, 1985.
- 2) 束村道雄・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—642, 1957.

- 3) 束村道雄・外山春雄・深谷勇二：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—513，1979.
- 4) 束村道雄： *Mycobacterium tuberculosis*(H37Rv株)のDL 8280耐性形式，結核，59：337—339，1984.
- 5) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, p. 1—75, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, 1975.
- 6) Tsukamura, M.: Variation and heredity of mycobacteria with special reference to drug resistance, Japan J Tuberc, 9: 43—64, 1961.