

Streptomycin 耐性変異菌の選択による 結核菌の菌力の分析

第1報 分離時の SM- 耐性菌の菌力

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

橋本 達一郎・関 根 修

(昭和 29 年 6 月 14 日受付)

Streptomycin (SM) に対して結核菌が耐性を獲得すると、菌力 (Virulence) の低下又は喪失か或いは上昇が必ず附随するという証明は未だない。しかし耐性菌を排出する結核患者の病状の観察や分離耐性菌を用いて行つた動物実験からすると耐性菌のあるものは菌力が強いことを示唆しており^{1),2)}、又一方 BCG から菌力の弱い耐性菌を分離することは容易に行われている^{3),4)}。従つて結核菌においては、SM 感受性に関する変異は菌力についての変異とは無関係におこるものであらうと考えてよからう。

Steenken 等⁵⁾⁻⁷⁾は結核菌の菌力はその菌群を構成する弱毒菌と強毒菌の比率によつてきまり、その比率は自然分離のおこる程度によつて変動すると考え、弱毒菌として特に Ra 型の無毒菌を重視し、ある菌力を示す結核菌群の中にはこれが種々の比率に混在していることを考察している。要するに結核菌群においては菌力に関する突然変異が絶えずおこつており、Ra 型の変異菌への変異が最も重視すべきか否かは別としてこれら変異菌の菌力の総和がその菌群の示す菌力であるという考え方が行われていることは否定できない。この考えを裏づける証拠として患者から分離した強毒結核菌が人工培地継代によつて次第に初めの菌力を失つてゆく事実⁸⁾⁻¹²⁾や、その反対に安定な弱毒菌 (RI 株)がある場合には致命的な進行性結核症をひきおこしたという Webb 等の報告¹³⁾や、又極端な場合には解離変異を強く促進する環境を与えた例として Calmette 等の BCG¹⁴⁾、Steenken の Ra の分離⁶⁾その他これに類する多くの業績¹⁵⁾⁻¹⁹⁾をあげることができる。

ここにおいて長年月研究室で人工培地上に継代し比較的安定した菌力の均衡を保つていると思われる強毒結核菌群を高濃度の SM に曝露し、分布する耐性変異菌を選択的にとり出した場合、それらの菌力はいかなるものであらうか。この場合、高濃度の SM 含有培地を用いる一回の選択により耐性菌をとり出す方法は、SM の存在とは無関係に突然変異によつて菌群中に発生し、種々の程度の分裂を行つている菌を分離する方法で一種の単一菌分離培養法とも考えたいのである。そうすれば

SM 耐性という菌力とは無関係の変異を利用して菌力に関する変異菌を純粋な形でとり出すことになり、こうしてえた SM 耐性菌の菌力をしらべることによつてもとの菌群の菌力の構成を或程度うかがうことができるのではなからうか。しかしこの場合、もとの菌群の経歴、殊にその菌力の構成に影響を及ぼす分離又は継代の条件が最も問題になるのであるが、この実験では強毒保存菌株である H₂ 株をえらんだ。この比較的安定しているとされている菌株の菌力の様相については著者の一人橋本がすでに本誌に発表した通りである²⁰⁾。

以下分離時の耐性菌の菌力をてんじくねずみ皮下接種によつてしらべたものを第1報とし、分離菌を継代してその性質をしらべたものを第2報として報告したい。

実験 1

実験室保存の強毒人型結核菌 H₂ 株の Bouillon-potato 培地 14 日培養より 10 mg/ml の濃厚菌液をつくり、これを SM 100 γ/ml 含有の Kirchner 寒天平板 47 枚に 0.3 ml (3 mg) ずつ接種し 37.5°C に 5 週間培養して計 108 個の集落をえた。全平板に接種された生菌単位数は小川培地による定量培養では 43.5×10^8 であるので、分離の比率は $1 : 4.0 \times 10^7$ である。以上 108 個の集落は更に SM 100 γ/ml Kirchner 寒天培地ですべてが発育することを確かめた後 7 株を at random にとり出し、これを Sauton-potato 培地に移植増菌して第1代の培養 18—21 日の発育菌を菌力のテストに用いた。

もとの SM 感受性菌及び 7 株の分離 SM 耐性菌の上記 Sauton-potato 培養より、それぞれ 0.1 mg ずつ各株毎に 1 群 7 匹のてんじくねずみ (体重 350 g 前後) の左下腹部皮下に注射して 8 週間放置した。なお接種直前に接種菌の生菌単位数は小川培地に $10^{-4} \sim 10^{-6}$ mg を培養して決定した。8 週後に 100 倍ツベルクリン液を用いてアレギーをみると同時に全部屠殺剖検しリンパ腺及び内臓の結核性病変を観察した。病変は佐藤秀三法に従い + より 卅まで区分した。すなわちリンパ腺は + : 米粒大, ++ : 大豆大, 卅 : えんどう豆大, 卅卅 : そら豆大, 内臓病変は + : 結節がようやく発見しうる程度, ++ : 結節が 10 個内外, 卅 : 結節かなり多数, 卅卅 : 結

節が極めて多数で殆んど臓器表面をおおっている状態、この+の数をもリンパ腺はひざ、そけい、後腹膜及び門脈リンパ腺のすべてについて、臓器は各臓器別に合計し動物1匹あたりの平均値を出し、これを便宜上結核症指標として皮下感染菌株の菌力の表示に用いた。なお剖検の際、1% NaOH 処理法により各動物の脾 10 mg の培養を小川培地によつて行い、その中の結核生菌数をかぞえた。

成績は表1に示す。接種生菌単位数はすべて同一菌重量であるにもかかわらず一定でない。感受性菌は高く耐性菌は一般に低い。耐性菌株間でも10倍以上の差はあ

るが、すべて 10^4 以上の生菌が皮下に接種されていることは確実である。

8週後の剖検所見では感受性菌接種群はリンパ腺、内臓共著しい結核症の進展を示しており、脾の培養によつても大多数の動物に著しい菌の侵入増殖があつたことを証明している。これに対し SM 耐性菌接種群では No.36 を除いてリンパ腺及び内臓の結核症を殆んど認めず、いずれの菌株においても肝、脾に肉眼的に結核結節様の変化を示している動物は1匹もなかつた。脾の培養によつても菌が全く証明されない動物が多い。No.36 株接種群もリンパ腺系にやや強い病変を示し脾に結節を漸く

表1 SM-感受性菌及びそれから分離した SM-耐性菌のてんじくねずみに対する菌力(皮下感染後8週)

感染菌株 No.	皮下接種生菌単位数 (0.1 mg)	動物数	ツベルクリンアレルギー (mm)	結核症指標				各動物の脾 10 mg 中の結核生菌数
				リンパ腺	肺	肝	脾	
SM-感受性菌	1,170,000	6	19.5	8.8	0.3	0.7	3.0	∞ , ∞ , ∞ , 193, 172, 2.3
SM耐性菌	5a 485,000	7	14.9	0.4	0	0	0	0.4, 0, 0, 0, 0, 0, 0
	10a 78,300	7	15.1	0	0	0	0	10.3, 5, 0, 0, 0, 0, 0
	15a 187,000	5	16.4	0	0	0	0	0.3, 0, 0, 0, 0, 0, 0
	15f 220,000	7	18.3	0.1	0	0	0	2.3, 1.7, 1.0, 0, 0, 0, 0
	18a 37,300	7	17.1	0	0.1	0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
	35b 76,300	7	20.7	0	0.1	0	0	0.3, 0, 0, 0, 0, 0, 0
	36 350,000	7	19.7	2.4	0.3	0	0.1	87.7, 0.3, 0, 0, 0, 0, 0

註(1) SM 耐性菌株 No. の数字は平板番号, a, b, ... は同一平板上に発生した集落に附したものである

(2) ツベルクリン・アレルギーは感染8週後の測定値、硬結の縦横径の平均値であらわす

(3) 各動物の脾 10 mg 中の菌数は、小川培地3本の平均値

表2 SM-感受性結核菌 2.5×10^8 から分離した53株の SM-耐性菌のてんじくねずみに対する菌力(接種生菌量及び発育様相と菌力との関連)

皮下接種 8 週後のてん じくねずみ 脾の結核症 指標	菌力及び接種生菌数を異にする各菌株数						菌力の 分 類	各菌株の Potato 培地における 発育様相
	0.1mg 接種量中の生菌単位数							
	0~10 ³	~10 ⁴	~10 ⁵	~10 ⁶	~10 ⁷	計		
0	8	6	3	1		18	無 弱	dysgonic
0.1~0.9	2		1			3		
1.0~1.9				2	2	4	中等度 強	eugonic
2.0~2.9			3	4	12	19		
3.0~4.0				1	8	9		

発見しうる程度の動物は7匹中1匹のみで、対照としたもとの SM 感受性菌にくらべれば菌力の低下は明瞭である。

ツベルクリン・アレルギーの進展は上述の病変の程度とは殆んど無関係に SM 耐性菌接種群もすべて強いアレ

ルギーを獲得しており、全く無毒と考えられる 35b のような菌株でも著しく菌力の強いもとの感受性菌株と同程度のアレルギーを示していた。

実験2

実験1と同じ H_2 株をてんじくねずみ1代通過後、

Bouillon-potato 培地に継代し第8代目の 15 日培養より 10 mg/ml の菌液をつくり 31 枚の SM 100 Y/ml 含有 Kirchner 寒天平板に 3 mg ずつ接種, 37.5°C に 5 週間培養して計 53 個の集落をえた。集落数は培養 3 週目では 44, 4 週目では 52 であった。全平板に接種された生菌単位数は 2.5×10^9 であるので, 集落の分離率は $1 : 4.7 \times 10^7$ となり, 実験 1 とほぼ同率である。

上述のように分離した 53 個の集落は培養 5 週目にす

べて平板より釣菌して, SM を含有する(100 Y/ml) Kirchner 寒天と含有しない同培地及び小川培地に塗抹培養し各培地上の発育状態をみたが, 6 株は SM 含有培地の方が非含有培地より発育が旺盛であり, 他の 47 株はいずれの培地にもほぼ同じ程度の発育を示していた。

このように 53 株すべてが SM 100 Y/ml の存在で充分発育することを確かめてから, SM 含有培地上の発育菌を Sauton-potato 培地に移植し継代第 2 代目の培養

表 3 分離 SM-耐性結核菌の各菌力代表菌株が, てんじくねずみに皮下接種後 8 週目に薙起したツベックリン・アレッキー並びに結核性病変

菌力の 分類	菌株 No.	皮下接種 生菌単位数 (0.1 mg)	動物 No.	ツベル クリン アレ ギー (mm)	結 核 性 病 変								剖検時の脾10 mg 中の結核生菌数	
					接 種 局 所	リ ン パ 腺	後 腹 膜	門 脈	内 臓			脾 重 量 (g)		
						ひ ざ	そ け い			肺	肝	脾		
無	11a	554,000	1	18	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	0
			2	18	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	0
			3	9	—	—	—	—	—	—	—	—	1.6	0
			4	18	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	0
			5	16	—	—	—	—	—	—	—	—	1.3	0
			6	18	—	—	—	—	—	—	—	—	1.3	0
			7	18	—	—	—	—	—	—	—	—	1.2	0
弱	9	1,000	1	18	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8	0
			2	13	—	—	—	—	—	+	—	+	1.0	0
			3	19	—	+	—	—	—	+	—	—	1.2	0
			4	25	—	—	—	—	—	+	—	+	1.3	27
			5	19	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	0
			6	20	—	—	—	—	—	—	—	—	1.2	0
中等度	10b	3,680,000	1	22	K	+	—	+	+	—	+	—	1.5	9
			2	22	K	+	—	+	+	+	+	+	1.0	168
			3	20	K	+	—	+	+	—	+	+	1.1	31
			4	21	G	+	—	+	+	—	+	+	1.1	172
			5	10	A	—	+	+	—	—	—	—	1.2	3
			6	21	—	+	+	+	+	+	—	+	2.5	114
			7	20	K	+	+	+	+	+	+	+	2.5	225
強	6	371,000	1	19	K	+	—	+	+	+	+	+	3.8	∞
			2	16	A	+	—	+	+	+	+	+	1.5	34
			3	20	G	+	+	+	+	+	+	+	7.4	∞
			4	21	K	+	+	+	+	+	—	+	2.4	∞
			5	20	G	+	+	+	+	+	+	+	3.6	∞

註(1) 接種部位は左側下腹部, リンパ腺病変は左側のみ記載

(2) アレッキー(感染 8 週後の値)は硬結縦横径の平均値

(3) 接種局所変化: K; 痼疾, G; 潰瘍, A; 膿瘍, —; 無変化

(4) リンパ腺及び内臓の肉眼的病変度は佐藤法による

(5) 脾 10 mg 中の結核生菌数は小川培地 3 本の平均値 ∞ ; コロニー計算不能をあらわす

を菌力のテストに用いた。菌力テストはてんじくねずみ(体重約 350 g)について実験 1 と全く同様に行い, 53 株すべてを各株について 7 匹のてんじくねずみの左下腹

部皮下に 0.1 mg ずつ注射し 8 週間放置してアレッキー, リンパ腺及び内臓の結核症の進展及び剖検時の脾の培養についてしらべた。その方法は実験 1 と全く同じで

ある。

実験2の成績は綜括して表2に示す。皮下接種の場合てんじくねずみに対する菌力の強さを最も鋭敏にそして明瞭に示すものとして脾の結核症指標をとり、これを表2の如く区分して菌力の強弱の段階をつけた。すなわち指標0はその菌株を接種した全動物の脾に結核結節が全くないことを示し、3.0~4.0では全動物の脾に最も著しい結核結節の発生が観察され、菌力をこれらの指標区分に相応させて無・弱・中等度・強の4段階に分けた。

表に示すように53株の中21株は菌力が無又は弱の群に属し、他の32株は中等度以上の菌力を示している。この菌力の相違に相応して21株はSauton-potato上の発育がわるく培養20—30日の所見では、微細顆粒状のうすい菌苔がpotato上をおおい所々に暗緑色の色素を生じてdysgonicな発育様相を呈していたのに対し、菌力の強い32株はpotato上の発育が極めて旺盛で培養14—17日の観察では黄白色の菌苔がしわをつくってpotato全面をおおい、もり上つてeugonicな発育様相を示していた。dysgonicな菌株では収量が少ないので動物接種には4週間後の培養を用いたが、eugonicな菌株は2~3週の培養を用いた。接種生菌量は表に示すように変動が甚しく、一般にdysgonicな菌株は0.1mg中の生菌数が低く、eugonicな菌株は多かつた。dysgonicな菌株の定量培養は特に7週目で集落計算を行つた。菌力の強い菌株はすべて 10^4 以上の生菌が皮下に接種されているが、弱い菌株では 10^4 以上接種されたものは少なく21株中5株にすぎない。

表3は表2において分類した菌力の無、弱、中等度及び強の群の中から1株ずつえらび出して接種生菌数、アレルギー及び結核性病変の関連を詳細に示したものである。表からNo.11aは強毒のNo.6よりも接種生菌数は多いのにも拘らず菌力は無であり、接種局所、リンパ腺系及び内臓に肉眼的には全く病変をおこさず、脾もすべての動物が培養陰性である。中等度の菌力を示す菌株は強い菌力のNo.6より10倍の接種生菌数であるにも拘らず、病変、脾の培養からみて菌力が弱い。又弱い菌力のNo.9は、無のNo.11a及び中等度のNo.10bと余りにも接種生菌量の差が大きく、弱菌力という位置づけは困難なように思われる。ツベルクリン・アレルギーは実験1と同じく8週目では53株すべてに強く発現していた。

考 察

菌力という言葉は常に感染にさらされる特定の宿主、並びにその感染試験が実施される厳密な条件という観点から規定されなければならないとDubosはのべているが²¹⁾、この実験において宿主がてんじくねずみであり、感染経路が皮下接種であることは分離菌の菌力を表現する上に最も重要な条件である。

Woodruff等²²⁾及びSoltys等²³⁾はてんじくねずみに有毒結核菌を皮下注射した場合、脾又は他の臓器に菌が出現する速さは接種菌量が多い程早く、早い場合には皮下接種後1時間目に臓器内に菌が証明できることを報告している。

著者等の実験では接種菌量はすべて0.1mgとして大量を用い、8週間の長い感染期間をおいたのであるから侵入力の強い強毒菌は、臓器培養迄行えば充分に把握できる筈である。

実験1の成績では耐性菌群の接種生菌数は同じ0.1mgでももとの感受性菌よりはいずれも著しく少ないが、すべて 10^4 以上の生菌接種をうけており半数は 10^5 以上の生菌接種をうけている。しかしリンパ腺系及び内臓に肉眼的に結核症を進展させているものは殆んどなく、脾の培養からも菌の臓器への侵入が殆んど行われなかつたことを示している。108個の分離集落中、at randomにとり出した7集落がすべて菌力の著しく低いものであつたということは、表面上強い菌力を示したもとのSM感受性菌群において菌力の低い菌が高い比率を占めていることを考えさせるのである。しかしこの成績のみでは H_2 菌群は圧倒的に弱毒菌の比率が高いと考えない場合は、純粋な耐性菌群では耐性の獲得と菌力の低下が伴うようにもみられるので、実験2ではSM-耐性の強毒菌が同じ方法で分離されないかに注意した。

分離集落はKirchner寒天又は小川培地上での発育様相には相互に差異を認めないが、potato培地に移植するとかかなり顕著に発育様相がわかるので、実験2ではpotato培地第2代迄継代して実験に用いた。しかし発育様相の差異は継代2代の間不変であつた。実験2の菌力テストでは極めて強毒な株と菌力の甚だ低い菌株が存在することが認められ、弱毒菌の比率が依然として高いことを推測させる外に耐性の獲得と菌力の変異が独立に変化する因子であろうということが立証できたのであるが、表2に示すように菌力の低い菌株は必ずpotato培地上の発育がdysgonicであり、一般に一定菌重量中の生菌単位数が低い。 10^{-4} mgを小川培地に接種しても集落の発生しないものが7株あつた。

ある結核菌の示す菌力はいくつかの異つた独立の属性の総和であり、菌力の発現にはそれらの諸因子のすべてが関与することが要求されるのはいうまでもないが、その菌の培地上の経歴によつて規定されるVitalityや、接種生菌量は菌力の比較の際にはまず第一に規定されねばならぬものである^{24),25)}。その点、この実験において菌株の発育様相に顕著な相違があり、しかも接種菌重量は同一でもこれに含まれる生菌量が甚しく異つてゐることは菌力の質的な差異を大きく修飾しているかもしれないという懸念を残すのである。しかし表3に示す如く無毒菌株No.11aと強毒菌株No.6とは少なくとも接種

生産数が同じ order とみてよいにも拘らず、両株の菌力の差異は極めて顕著である。この無、強の菌力を示す菌株の中間に位置する弱及び中等度の菌力の菌株は数が少なく、その接種生菌量からみて、無及び強の菌力の菌の混合菌群としてもよいであろう。菌力は結核菌においても系統的な内在的の性質をもつものではなく、ある条件に応じて動いてゆくものであらうと考えられるので、実験2のような培地継代の経歴をもつ菌群では当然おこりうることである。

なお実験1, 2を通じて分離耐性菌は全く菌力がないと認められるものでも1例の例外もなく動物にツベルクリン・アレルギーを与えることができたことは興味深いことである。表1又は表3に示すようにリンパ腺及び内臓に全く肉眼的病変をつくらぬ菌株が強いアレルギーを与えている様子は Ra や BCG のような無毒、弱毒の菌株には常に認められることである。

以上のような分離時の耐性菌の菌力テストでは菌力の低い菌株は、その皮下からの侵入力及びツベルクリン・アレルギー賦与力においてあたかも BCG や Ra のような性質をもつことが認められ、従つて強毒の保存菌株 H₂ はその菌群の中に相当量の弱毒菌を含むことが推測されるのであるが、このような弱毒菌は果して Ra や BCG と同じものであらうか。もし同じとすれば甚だ簡単に弱毒結核菌の分離が行えることになるのである。しかしこの点については、分離弱毒菌の菌力の性質、安定性について更に詳細な追求を進めなければ結論することはできない。

結 論

SM 耐性変異と菌力に関する変異は互に独立に変化する因子と考え、比較的菌力の安定している実験室保存の強毒人型結核菌株 H₂ から高濃度に SM を含有する培地によつて選択的に耐性変異菌をとり出し、その菌力をもつてんじくねずみ皮下接種法によつて測定することにより、もとの SM 感受性菌群の菌力の構成を推定しようとした。その結果、分離時の菌力テストでは表面上強毒と考えられる菌群の中には BCG や Ra に類似した極めて菌力の低い菌が多数に混在していることを推測させる成績をえた。又純粹の耐性菌群で甚だ菌力の強いものを多数解離することができた。これらの成績から SM 耐性に関する変異と菌力についての変異とは互に無関係であらうという仮定が証明されたと思う。

終りに柳沢部長、室橋博士の御指導、御校閲に感謝すると共に本研究の一部は文部省科学研究費によつたことを附記する。なお本論文の要旨は第27回日本細菌学会で演説された。

文 献

- 1) 小酒井望・坂口弘：医学と生物学，19：93—95，1951.
- 2) 村田太郎：結核，28：453—458，1953.
- 3) 橋本達一郎：結核，26：238—243，1951.
- 4) 金井興美・志賀康夫・伊藤文子：結核，27：42—46，1952.
- 5) Steenken, W. Jr., Oatway, W.H. Jr. & Petroff, S.A.: J. Exp. Med., 60: 515—540, 1934.
- 6) Steenken, W. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 38: 777—790, 1938.
- 7) Steenken, W. Jr. & Gardner, L. U.: Am. Rev. Tuberc., 54: 62—66, 1946.
- 8) Saenz, A. & Canetti, G.: C.r. Soc. Biol., 133: 200—202, 1940.
- 9) 小宮山四郎：結核，22 (9, 10): 1—27, 1947.
- 10) 染谷四郎・川村達・重松逸造・平山雄・林久子・張仲鑑：結核，24：11—17，1949.
- 11) 染谷四郎・林治・田島嘉雄・遠藤元清：結核，26：74—78，1951.
- 12) 今村荒男・伊藤実・桜井宏：大阪大学医学雑誌，3：269—292，1951.
- 13) Webb, G.B., Ryder, C. T. & Boissevain, C. H.: Am. Rev. Tuberc. 11: 247—249, 1925.
- 14) Calmette A., Boquet, A. & Nègre, L.: Ann. Inst. Pasteur, 35: 561—570, 1921.
- 15) 中谷繁一：結核，12：274—277，1934.
- 16) Deinse, F. van: Ann. Inst. Pasteur, 66: 191—203, 1941.
- 17) Boquet, A. & Grolhier, A.: Ann. Inst. Pasteur, 68: 5—30, 1942.
- 18) 今村荒男・吉井馨：大阪大学医学雑誌，3：81—97，1951.
- 19) Boquet, A.: Ann. Inst. Pasteur, 63: 531—553, 1939.
- 20) 橋本達一郎・吉田幸之助：結核，29：221—224，1954.
- 21) Dubos, R. J.: The Bacterial Cell, Haruard University Press,.
- 22) Woodruff, C. E., Kelly, R. G. & Leaming, M. A.: Am. Rev. Tuberc., 51: 574—581, 1945.
- 23) Soltys, M. A. & Jennings, A. R.: Am. Rev. Tuberc., 61: 399—406, 1950.
- 24) Stewart, G. T.: Lancet, 261: 562—566, 1951.
- 25) Stewart, G. T. & Tamargo-sanchez, M.: J. Hyg. 50: 37—52, 1952.