

イソニコチン酸ヒドラジット感性および耐性結核菌を 人工的に混合した菌群の耐性度の動態について

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

佐 藤 直 行

(受付 昭和 29 年 10 月 11 日)

イソニコチン酸ヒドラジット (INH) 耐性結核菌の安定性については、試験管内で分離した耐性結核菌と、患者の喀痰から分離した耐性結核菌について、感性化が起るとする成績と¹⁾²⁾³⁾、起らぬというものがある³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。しかしこれらの二つの異つた成績を通観してみると、感性化が起るとするものも、菌群の構成という点からみて実験しているものはない。

著者はこの点を追求して、純度の高い INH 耐性結核菌では、その耐性度は容易に変動しないことと、患者から分離した INH 耐性菌をふくむ混合菌群では、数代の継代培養で感性菌だけから構成されるような菌群となることを報告した⁸⁾。したがって耐性菌の安定性について実験考察するためには、実験に使用する菌群の構成が第一に問題となり、これを厳密に規定しなければならない。

ところで日常問題とされる、患者の検査材料中から分離される INH 耐性結核菌の多くは、感性菌と耐性菌とを種々の割合にふくんでいる混合菌群である。この混合菌群がある INH の濃度にいわゆる完全耐性を示したとしても、菌群を構成するほとんど全部の結核菌が、耐性菌であることを意味しているとは限らない。耐性菌の耐性薬剤濃度のみでなく、耐性菌の分布率まで示さねばならないはずの耐性検査方法が、なお不十分のために多くの誤解と混乱が生じているようである。

ここには INH 感性菌と耐性菌とを人工的に混合した結核菌群について、INH をふくまない小川培地に継代培養をかさね、その菌群の構成の変動を追求してみた。その結果、混合菌群の感性化への移行現象を観察することができ、さらに INH 耐性検査方法の実際に少しく参考となる所見を得たので、その成績を報告する。

実 験 方 法

1 使用した培地はすべて 1% KH_2PO_4 培地 (小川培地) であり、INH の濃度は 1cc について 10 τ , 1 τ として、90°C 1 時間凝固滅菌したものを用いた。

2 使用菌株は INH 感性菌として人型結核菌 H 37Rv 株、INH 耐性菌として H 37Rv 株より分離した変異株 No. 1 株を使った。No. 1 株は、10 τ /cc の INH を

ふくむ小川培地の平板上で分離した単一の集落から増菌した菌株である。この単一集落を小川培地に 2 代継代して増菌し、2 代目継代培養菌の全菌群が、10 τ /cc の INH 耐性結核菌からなっていることを確めた。さらに小川培地継代 3 代目の培養菌をソートン馬鈴薯培地にうえつた。

3 混合菌液はソートン馬鈴薯培地継代 25 代目の H 37Rv 株と、同じく 4 代目の INH 耐性変異株 No. 1 株の、ともに 16 日培養菌から手振り法によつてつくつた。この 2 つの菌液を 1cc ずつ、菌量で下のような割合に混合して感性菌対耐性菌の比率が 1:1, 10:1, 100:1 の混合菌群 A, B, C をつくつた。

A 菌群: H 37Rv の 1mg/cc の菌液
+ No. 1 株の 1mg/cc の菌液

B 菌群: H 37Rv の 2mg/cc の菌液
+ No. 1 株の 0.2mg/cc の菌液

C 菌群: H 37Rv の 2mg/cc の菌液
+ No. 1 株の 0.02mg/cc の菌液

このとき、10⁻⁶ mg の定量培養では、H 37Rv 株は 11.8 コ、No. 1 株は 10.6 コであつた。また後者は 15⁻⁶ mg 培養で対照培地に 39.3 コ、10 τ /cc の INH を加えた小川培地に 40 コの集落をみたので、No. 1 株は 10 τ /cc の INH 耐性菌からなつてるとした。なお H 37Rv は 0.1 mg を培養しても INH 10 τ /cc の小川培地上には集落の発生をみなかつた。したがって、H 37Rv 株中にある耐性変異株が、混合菌群中に迷入することはないと、完全に否定できないとしても、3 つの A, B, C 菌群は生菌数の点からみても、それぞれ感性菌対耐性菌の比率が、ほぼ 1:1, 10:1, 100:1 であると推定される。

これら A, B, C 菌液の 0.1cc (菌量にして約 0.1 mg) を INH を加えた小川培地に培養し、この対照培地上の 4 週培養菌を、本実験に使用する混合菌群の出発菌とした。

4 継代培養は初代培養菌を小川培地に塗まつ培養し、継代 1 代毎に 13 代目まで A, B, C 3 菌群の INH 耐性度の検査を行つた。

5 INH 耐性度の検査は、各代とも 15 日培養菌 (6 代培養菌のみ 19 日) から菌液をつくり、10 倍稀釈

法によつて適宜 $10^{-5} mg$ まで培養した。

6 成績の判定は $37^{\circ}C$ 4 週間培養後に行つた。発生した集落数を数えることができないときには、肉眼的に小川培地斜面のほぼ全体、約 $3/4$, $1/2$, $1/4$ を發育した菌がおおつているにしたがつて、それぞれ +4, +3, +2, +1 と表現した。この表現は、小川培地 2 本の平均をとつて表示した。

また厚生省結核療法研究協議会のとりきめにならつて、INH $10 r/cc$ の培地上の發育量が、対照培地上のそれと肉眼的にほぼ等しいとき、INH $10 r/cc$ の完全耐性とした。

菌群中に分布する耐性菌の比率は、 $10^{-5} mg$ 培養で対照培地と INH $10 r/cc$ 培地上で集落数が計数できるときは、直接両者の集落数の比から出した $10^{-4} mg$ 以上の菌量を培養して、INH $10 r/cc$ 培地上で集落数が計数できるときは、対照培地上の集落数は、定量培養 $10^{-6} mg$ の集落数から逆算して、間接的に菌群中の耐性菌の分布率をみた。

実験成績

混合菌株 A, B, C 3 菌群の各継代毎の INH 耐性度の検査成績は、表 1, 表 2, 表 3 に示す通りである。ただし継代 6 代目と 13 代目の成績は除いた。

この成績から、 $10^{-1} mg$ を培養したときには、表 1 で

表 1 A 混合菌群の INH 耐性度の検査成績

継代数	菌量 $10^{-x} mg$	INH の濃度 (r/cc)			
		10	1	0	
3	1	+4	+4	+4	
	2	+3	+3	+4	
	(4) 3	+1.2	+1.5	+2.7	
5	5	16.5	19	63	
	5	1	+4	+4	+4
		2	+3	+2.7	+3.7
3		+1.5	+1.5	+3	
(4.2)	4	46	69	+1.5	
	5	8.5	7.5	37	
	7	1	+3.5	+3.5	+3.7
2		+2	+2	+3.2	
(8.5)		3	+1	+1	+2.5
		4	25	34	+1.5
		5	5	6.5	64
9	1	+3.5	+4	+4	
	2	+2.2	+2.5	+4	
	(5.2)	3	+1	+1	+3
		4	20	27.5	+1.5
11	1	+3.5	+3	+4	
	2	+2	+2	+3.5	
	3	+1	+1	+2.5	
	(19.5) 4	19	28	+2.2	

(註) $37^{\circ}C$ 4 週培養後の成績
カッコ内の数字は $10^{-6} mg$ の定量培養の平均値、表 2, 3 についても同じ。

表 2 B 混合菌群の INH 耐性度の検査成績

継代数	菌量 $10^{-x} mg$	INH の濃度 (r/cc)			
		10	1	0	
3	1	+3	+3	+4	
	2	+2	+2	+3	
	(6)	3	84	113	+2
		5	1.5	2	48
5	1	+3	+3	+4	
	2	+2	+2.7	+4	
	(11)	3	45	62	+3
		4	17.5	14.5	+1.5
7	1	+1.5	+1.2	+3.5	
	2	+1	+1	+3.5	
	(9)	3	24.5	24	+2.5
		4	2.5	4	+1
9	1	+1	+2	+4	
	2	+1	+1	+3.5	
	(21) 3	22	20	+2.7	
11	1	+2	+2	+4	
	2	+1	+1	+3.7	
	(39.5) 3	19	21	+3.5	

表 3 C 混合菌群の INH 耐性度の検査成績

継代数	菌量 $10^{-x} mg$	INH の濃度 (r/cc)		
		10	1	0
3	1	+2	+2.7	+4
	2	+1	+1	+3.5
	(6.7) 3	27	24.5	+2
5	1	+1.2	+1.5	+4
	2	59	71.5	+3
	(5.7) 3	6.5	10.5	+2.7
7	1	+1	+1	+4
	2	50	54	+3.5
	(7.2) 3	8	4.5	+2.5
9	1	+2	+1.5	+4
	2	73	81	+4
	(19.2) 3	18.5	10.5	+3
11	1	+1.5	+1.5	+4
	2	54	52	+3.5
	(27.5) 3	5.5	8	+3

は 3, 5, 7 代の菌群が $10 r/cc$ の INH 完全耐性を示しており、判定の読み方をゆるめれば、9, 11 代の菌群もほぼ完全耐性に近くなる。しかし $10 r/cc$ の INH 完全耐性を示している表 1 の 3 つの菌群についても、 $10^{-2} mg$ 以下の菌量を培養したときには、完全耐性とは読みえなくなり、すべて不完全耐性 $10 r/cc$ ということになっている。

表 2, 3 の菌群中には、完全耐性を示すものはなく、すべて $10 r/cc$ の不完全耐性となっている。

次に混合菌群中に分布している耐性菌の比率と、混合菌群 $0.1 mg$ を培養したときの INH 耐性値を $10 r/cc$ の INH 完全耐性 (R. と略す) と、不完全耐性 (r. と略す) とに分けて対比してみると、表 4 のようになる。

これから耐性菌を 10% 以上ふくんでいる菌群は、その 0.1 mg だけを培養すれば、10 r/cc の INH 完全耐性を示している。

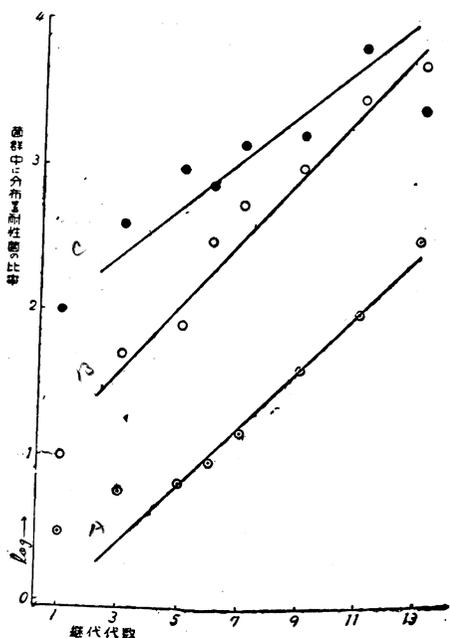
それとともに、A, B, C 3 菌群中に分布している耐性菌の比率は、継代培養をくりかえすとともに、次第に減少していくことが知られる。すなわち A 菌群では、継代 11 代目にその中に分布している耐性菌の比率は、100:1、B 菌群では 2000:1、C 菌群では 5000:1 となっている。

いまこれら A, B, C 3 混合菌群中に分布している耐性菌の比率の変動を、図に示すと図 1 のようになる。

図 1 の縦軸には、菌群中に分布している耐性菌の比率を常用対数でとり、横軸には継代代数をとつてある。

図 1 から初代菌群中に分布している耐性菌の比率が 2:1 であつた A 菌群では、菌群中に分布している耐性菌の比率の減少と、継代代数との間には、ほぼ直線関係をみとめることができる。すなわち、混合菌群中に分布している耐性菌の比率は、ほぼ一定の割合で減少しているということが出来る。

図 1 A, B, C 3 混合菌群中に分布する耐性菌の比率の変動



しかし B, C 両混合菌群では、やや直線関係からずれて、直線関係には少しく遠いようである。これは菌群中に分布する耐性菌の比率が小さくなるとともに、耐性菌の比率を求める実験上の誤差が大きくなつてくるためであろう。

B, C 両菌群についても、A 菌群の場合と同様な、継代代数と耐性菌の分布率の変動との間に直線関係がみられるものとはいいがたいが、A 菌群の直線関係からは、混合菌群中の耐性菌の分布率は、複利の法則

$$P = K \times (1+r)^n$$

に従つて変動減少しているものと考えられる。

考 察

Lecocq³⁾ は INH 感性 BCG と耐性 BCG とを 1:1 9:1 に混合した菌群について、Tween-albumin 培地に継代培養し INH 耐性の有無を見ている。5 代継代後の 2 つの菌群は INH 耐性を示していたが、9 代後には INH 感性を示し、耐性 BCG のみを継代培養したものは耐性を保持していたという。

Dissmann⁹⁾ は slide culture 法によつて、培養 1 日後から 4 日後まで 1 日毎に発育菌数を数え、INH 感性菌の発育速度が耐性菌のそれより速いことを報告している。すなわち感性菌、耐性菌ともに初め 100 培養して、4 日後には感性菌では平均 4000 の、耐性菌では 1500 の発育菌をみたといつている。

著者の実験成績は、Dissmann のように直接感性菌と耐性菌の growth cycle の経過中の発育速度の差をみたものではない。混合菌群中に分布する耐性菌の比率の減少経過から、INH 感性菌と耐性菌の間には、発育速度に少ないながら相当の差があることを推察するものである。

しかし Lecocq の成績と対比すれば、菌群の構成の変動が少ないようである。それは実験条件の差によるものと考えられるが、特に Lecocq の場合には、液体深部培養によつて INH 耐性をみているため、混合菌群中の少数の耐性菌の存在が、肉眼的に読みとれなかつたのではないかと考えられる。

しかし既報⁸⁾ の患者喀痰から分離した、新鮮な INH 耐性菌をふくむ混合菌群では、数代の継代培養によつて 10 r/cc の INH 耐性菌が消失した現象と比較すると、本実験に使用した H 37 Rv 株と、INH 耐性変異株 No. 1 株との間には、新鮮分離結核菌の場合ほど両者の間に大きな発育速度の差があるとは考えられない。これは小川培地に継代し、さらに INH 耐性変異株の発育に不利なソートン馬鈴薯培地に 4 代も継代培養したため、その発育速度に相当の修飾が起つたためではないかと考えられる。

注目すべきことは、混合菌群内に分布する耐性菌の比率が、ほぼ一定の割合で、すなわち複利の法則に従つて変動している事実である。この事実は、あくまで INH 感性菌と耐性菌の菌独自の分裂速度の差によるものと解釈され、混合菌群内ではその発育の経過中に、感性菌と耐性菌の両者相互間には発育への干渉はなく、また変異の誘導も起つていないものと推察される。

さらに表 4 に示した成績から、対照培地上に無限の結核菌発育をみるほどの 0.1 mg を培養したとき、10% 以上の耐性菌が分布している菌群は 10 r/cc の INH 完全

表4 混合菌群中に分布するINH耐性菌の比率と $0.1mg$ を培養したときの $10r/cc$ INH耐性値の完全,不完全性との関係

継代 代数	A 菌群	B 菌群	C 菌群
1	2:1 R.	11:1 R.	100:1 r.
3	9.8:1 R.	32:1 r.	250:1 r.
5	4.6:1 R.	62:1 r.	880:1 r.
6	8.4:1 R.	205:1 r.	540:1 r.
7	12.8:1 R.	360:1 r.	1200:1 r.
9	26:1 r.	1000:1 r.	1870:1 r.
11	102:1 r.	2000:1 r.	5000:1 r.
13	214:1 r.	3400:1 r.	1900:1 r.

(註) R. $10r/cc$ INH 完全耐性)であることを示す。
r. $10r/cc$ INH 不完全耐性)す。

耐性を示している。

ここでは、対照培地上に肉眼的に +3, +2 と読まれる発育菌量と対比して、 $10r/cc$ のINH完全耐性と判定される菌群はなかつたので、こうした場合耐性菌の分布率がどれくらいになるかは明らかでない。ただ対照培地上の発育菌量が +3, +2 となるに従つて、これと対比して完全耐性とよまれるような菌群中の耐性菌の分布率が高くなることは推定される。

ところで患者の喀痰中から分離される結核菌中のINH耐性菌の分布率は、直接法による検査では50%をこえることがなく¹⁰⁾、また間接法によつて30%或いはこれをこえても少しという報告⁷⁾がある。もつとも例外的に $10r/cc$ のINH耐性菌が90%以上を占めている、患者分離結核菌1例だけを経験している⁹⁾。このような事実と、この報告の成績を合せて考えると、対照培地上にみる集落数の数えられないような発育菌量と対比して、肉眼的に完全耐性と表現しえたとしても、その菌群の構成は全く不明であるといつてよいであろう。

特にINH耐性結核菌の場合には、その生物学的特性からして、完全耐性菌を喀出しているということが、臨床的所見ないしは細菌学的所見を追跡する際の一条となつていようである。故に劃一的にINHの耐性検査を行つて、ある菌群のINH耐性値が完全耐性とよまれたとしても、その結果の解釈には慎重でなければならないし、さらにその菌群の構成について考慮するところが必要ではないかと思ふ。

また耐性検査の方法も、耐性菌の分布状態まで大略明らかにするためには、間接法による場合には菌量として $10^{-4}mg$ ぐらゐを培養すべきである。しかし検査材料中の分離結核菌の場合には、直接法による方が菌群構成の

変動がさけられるから、より正確に検査が行われるといえる。ただ直接法には簡単で以上の目的に合う方法がない故、今後この点を追求考案する必要がある。

結 論

INH感性のH37Rv株とその耐性変異株とを、人工的に1:1, 10:1, 100:1の割合に混合した3つの混合結核菌群について、継代培養1代毎に小川培地上でINH耐性度の検査を行い次のような結論をえた。

1) 人工混合菌群においても、その中に分布している耐性菌の比率は、継代培養をかさねるとともに小さくなり、菌群中に感性菌の占める率が大きくなる。しかし継代13代目においても、3つの菌群中の $10r/cc$ INH耐性菌は、INH感性菌群より変異した耐性菌よりなお多数存在していて、完全な感性化をみることはできなかった。

2) 混合菌群中に分布する耐性菌の比率は、一定の割合で減少していく。これは混合菌群中のINH感性菌と耐性菌の発育速度の差によるものと考えられる。

3) 対照培地上に無限の結核菌の発育をみる所見と対比してみれば、10%以上に耐性菌の存在している菌群のINH耐性値は、完全耐性と読むことができる。

柳沢部長の御校閲を深謝する。実験上多くの助力を上野一恵、岡本茂広両君からえたことを感謝する。

文 献

- 1) Pansy, F., Stander, H., & Donovan, R.: Amer. Rev. Tuberc., 65:761~764, 1952.
- 2) Szybalski, W., & Bryson, V.: Amer. Rev. Tuberc., 65:768~770, 1952.
- 3) Lecocq, E.: Compt. rend. soc. biol. 147:522~525, 1953.
- 4) Barnett, M., Bushby, S. R. M., & Mitchson, D. A.: Lancet 1:314~320, 1953.
- 5) Fisher, M. W.: Amer. Rev. Tuberc. 66:626~628, 1952.
- 6) Steenken, W. Jr.: Transaction 13th Conference Chemotherapy Tuberculosis. 161~163, 1954.
- 7) Tompsett, R.: Amer. Rev. Tuberc. 70:91~101, 1954.
- 8) 佐藤直行: 医学と生物学, 31:250~254, 1954.
- 9) Dissmann, E.: Naturwissenschaften 41:218~219, 1954.
- 10) 佐藤直行: 結核, 29:398~397, 1954.