

イソニコチン酸ヒドラジット耐性結核菌の ハツカネズミに対する菌力について

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 30 年 3 月 14 日)

イソニコチン酸ヒドラジット (INH) 耐性結核菌の菌力には、宿主として用いられる実験動物によつて異なる評価が与えられている。すなわちテンジクネズミに対しては、皮下感染法によつて親株である感性菌に比較して、その菌力は減弱しているとみられる^{1)~10)}。これに反して、ハツカネズミに対しては、静脈感染の場合には INH 感性菌とほぼ等しい菌力を示すという報告^{9)~11)}、ハツカネズミを倒すことはできても、その菌力は INH 感性菌より相当弱いという報告⁸⁾ などもあり、必ずしも一致していない。

一般にハツカネズミに対しては大量感染を行い、宿主の死亡もしくは肉眼的所見で菌力を批判しようとするために、真の菌力がおおわれてしまつて、その菌力は感性菌と等しいと判定されているのかもしれない。

ハツカネズミ体内臓器中の生菌数の消長を、結核菌の分裂増殖と体内生存という二因子から分析して、最近 Pierce らは¹²⁾、結核菌の有毒弱毒、無毒という菌力とハツカネズミ体内生菌数の動態とは相併行することを述べている。

また Mackaness らは¹³⁾、接種後 1 週間の臓器内結核菌の増殖率の差が実験室保存の結核菌株の菌力と併行するとしている。しかしこの 2 つの報告を比較すると菌力の強弱の評価になお不一致の点がみられる。とくに Pierce らが、臓器内で分裂増殖することなく生存するのみであるとした無毒結核菌 H 37 Ra 株については、筆者はそのしからざる例としての 1 反証を示しておいた¹⁴⁾。

しかしながら、ある結核菌々株の菌力を、宿主寄生関係と規定すれば、菌力の強弱は宿主の死亡日数の長短に反映されるであろうし、また臓器内生菌数の動態にも反映されると考えられる。現在わが国では宿主として感受性の強いハツカネズミが得られぬので、宿主の死亡を目的とする研究には大きな障害となつている。したがつてハツカネズミを宿主として結核菌の菌力を分析するためには、いきおい宿主体内の臓器中における生菌数の動態を追跡することから始めざるをえないのである。

本実験では INH 耐性菌の菌力を位置づけるために、有毒人型結核菌 H 37 Rv 株と無毒結核菌 H 37 Ra 株

とを対照として、ハツカネズミの臓器内における生菌数の動態を追求して、これら菌株の菌力を比較分析したので、その結果を報告しようと思う。

実験方法

1. 1 実験群に使用したハツカネズミは体重 20 g 前後の白色均一系の同じ系統のものである。しかし実験中必ずしも同一系統のもののみを使うことはできず、3 系統のネズミを用いた。

2. 使用菌株:

H 37 Rv 株 1951 年 Mayo Foundation の Karison, A. G. より分与された。

H 37 Ra 株 1952 年 Trudeau Laboratory の Steenken, W. Jr. より分与された。

H 37 Rv INH 耐性株: in vitro で 1% KH_2PO_4 培地上で分離したもの、異なつた 2 菌株を用いた。

0.05 r/cc INH 耐性株: INH 投与開始後 22 週時 (No. 29 株)

に 0.05 r/cc の 1% KH_2PO_4 培地上で分離したもの¹⁵⁾。

10 r/cc INH 耐性株: INH 投与開始後 14 週時に (No. 31 株)

5 r/cc の 1% KH_2PO_4 培地上で分離したもの¹⁵⁾。

これら菌株のうち H 37 Ra 株の凍結乾燥菌を除いて、他はすべて 1% KH_2PO_4 培地上の 2 週間後の培養菌か

表 1 実験群別の概要

静脈接種した菌株	ハツカネズミの系統	接種菌量	接種生菌単位数
H 37 Rv 株	sm	0.01 ^{mg}	8×10^4
H 37 Ra 株	dd	0.02	70×10^3
No. 29 0.05 r/cc 耐性株	dd	0.01	20×10^3
H 37 Rv INH 耐性株	sps	0.002	22×10^3
H 37 Ra 株	sps	0.002	13×10^3
H 37 Rv INH 耐性株			
局所分離菌	dd	0.002	29×10^3
" "	dd	0.0002	29×10^2
脾内分離菌	dd	0.002	27×10^3
" "	dd	0.0002	27×10^2
No. 31 10 r/cc 耐性株	sm	0.001	12×10^2

ら蒸留水浮遊液をつくり、その 0.2 cc ずつをハツカネズミの尾静脈から注射した。INH 耐性菌の耐性度は、 10^{-5} 、 10^{-6} mg 培養によつて完全耐性度を決定した。

実験群を接種した菌株、ハツカネズミの系統、接種菌量、接種生菌単位数からみると表 1 のようになる。

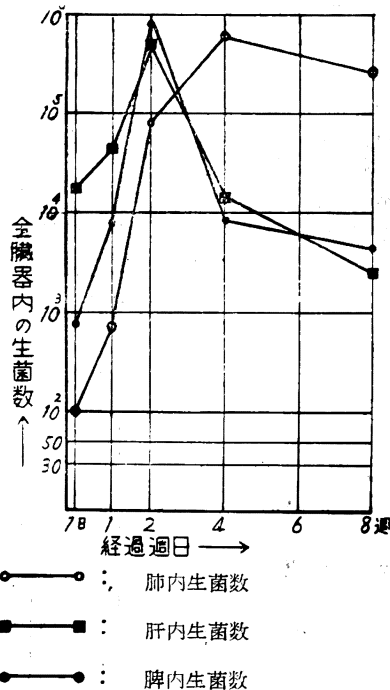
3. 培養方法：原則として静脈接種後 1 日、1 週、2 週、4 週、6 週、8 週後に各群 2 匹ずつを殺して剖検し、肉眼的に病変の有無を調べた後、肺肝脾の 3 臓器を培養して生菌数を測定した。肺と脾は全臓器培養を行い、肝のみは 200 mg 前後をとつて培養した。すなわち 1% NaOH 溶液で 100 mg/cc の臓器乳剤をつくり、蒸留水で 10 倍段階稀釈法によつて 1 mg/cc まで稀釈し、各稀釈段階のすくなくとも 2 段階を 0.1 cc ずつ 3 本の 1% KH_2PO_4 培地に流した。

なお INH 耐性菌を接種した群では、INH 含有培地にも流して分離生菌の INH 耐性度も検査した。37°C 培養 4 週後に数えられる集落数に基いて、臓器 10 mg 中の生菌数を決定し、これから全臓器中の生菌数を算出して 2 匹の平均値を図に示した。

実験成績

患者から分離した INH 0.05 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の耐性菌 (No. 29 株) と、H 37 Rv 株、H 37 Ra 株とをそれぞれ 10^4 order の菌数を静脈内に注射したときの、肺肝脾全臓器中の生

図 1 患者より分離した INH 0.05 $\mu\text{g}/\text{cc}$ 耐性菌株を接種したハツカネズミの臓器内生菌数の動態



以下たゞし書きしない限り、上の記号で全臓器内生菌数を示している。

図 2 有毒人型結核菌 H 37 Rv 株を接種したハツカネズミの臓器内生菌数の動態

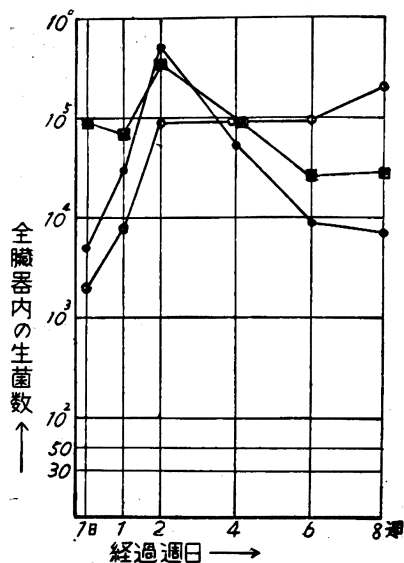
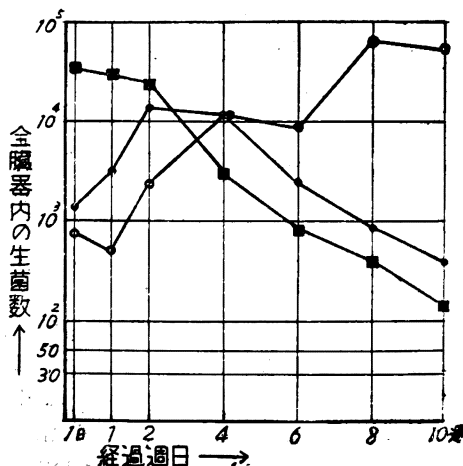


図 3 無毒人型結核菌 H 37 Ra 株を接種したハツカネズミの臓器内生菌数の動態



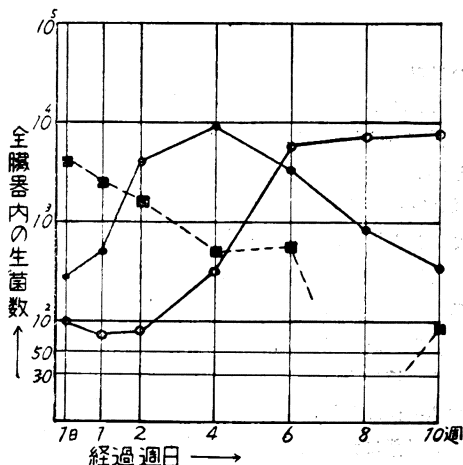
菌数の動態は、図 1, 2, 3 に示す通りである。接種後 1 日目に臓器中に証明される菌数（以下定着菌数と表現する）は、肝脾肺の順にすくなくつていく。単位重量 10 mg 中の定着菌数の差は、肝と脾とではそれほど大きくないが、全重量に換算すると 1 order の差が生じている。この定着菌数の臓器内の差は他の 7 実験群にも共通した現象である。

No. 29 株と H 37 Rv 株について臓器内生菌数の動態をみると、肝脾ともに 2 週後に生菌数の一頂点があり、4 週後から減少の経過を示している。肺では 2 週後までに脾内における増加率とほぼ等しい菌数の増加がみられ、さらに No. 29 株では 4 週後まで脾内菌数の増加をみとめ、両株ともに 4 週後には脾内生菌数より多くなり、

肺脾内生菌数の逆転が起つている。

1 日後の臓器内定着菌数が No. 29 株では H 37 Rv 株よりすくないことも考えねばならぬが、分裂増殖の程度を比較すると、前者が後者より約 1 order 高い値を示している。

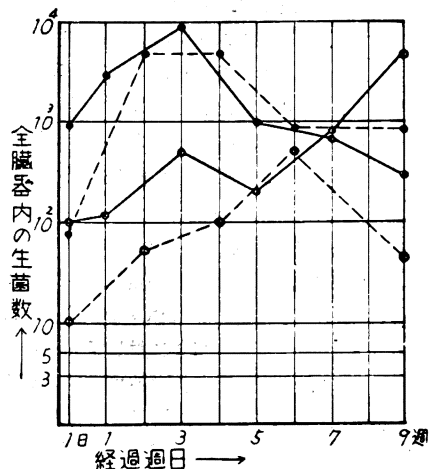
図 4 INH 耐性 H 37 Rv 株を接種したハツカナズミの臓器内生菌数の動態



注 肝のみ 10 mg 中の生菌数を 100 倍して示してある (破線)。

H 37 Ra 株では、脾内生菌数は 2 週後には定着菌数より 1 order の増加があり、4 週後にもほぼ等しい菌数を保持しているが、その後は減少している。肝内生菌数は 2 週後まで大きな変動がなく、4 週以後は減少の傾向のみをみとめた。肺では菌数の増加が徐々にあり、肺脾内生菌数に逆転が起るのは 6 週以後からとみられる。

図 6 INH 耐性菌 (H 37 Rv 株) を接種したハツカナズミの臓器内生菌数の動態
感染テングネズミの局所より分離した菌の場合

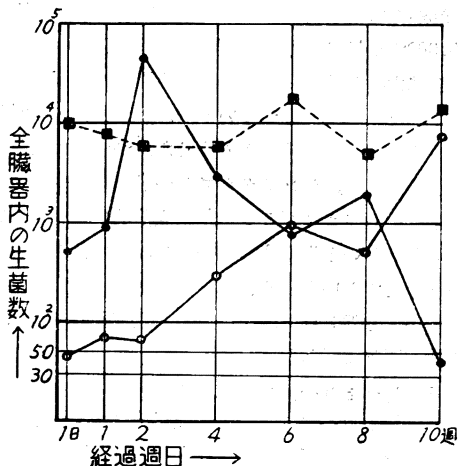


注 図 6, 7 とともに実線は 0.002 mg 接種群, 破線は 0.0002 mg 接種群の成績を示す。

つぎに H 37 Rv INH 耐性株と H 37 Ra 株の動態を比較してみると、図 4, 5 のようになる。

H 37 RvR INH 株では脾内生菌数は 2 週後に頂点があり、定着菌数の 2 order 近い増加を示すが以後減少している。肺では 2 週後まで菌数の増加がなく、4 週後か

図 5 無毒人型菌 H 37 Ra 株を接種したハツカナズミの臓器内生菌数の動態

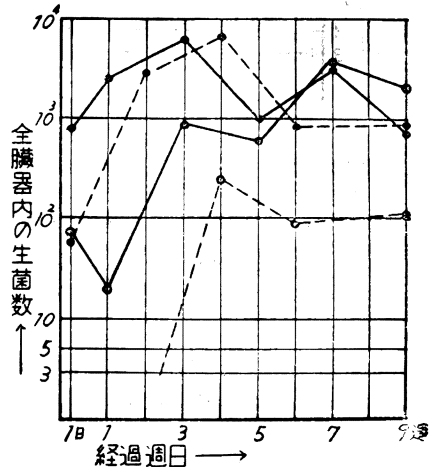


注 肝のみ 10 mg 中の生菌数を 100 倍して示してある (破線)。

ら徐々に増加して 10 週後に脾内生菌数より多くなっている。肝内生菌数は 10 mg 単位について 10 週後まで全く増減なく持続している。

これに対して H 37 Ra 株では図 3 の動態を再現しているというが、脾内生菌数のみは 4 週後に頂点を示している点が相違する。

図 7 INH 耐性菌 (H 37 Rv 株) を接種したハツカナズミの臓器内生菌数の動態
感染テングネズミの脾内より分離した菌の場合



これは1日後の定着菌数が、図8の場合にくらべて一層すくないことになると考えねばならぬであろう。

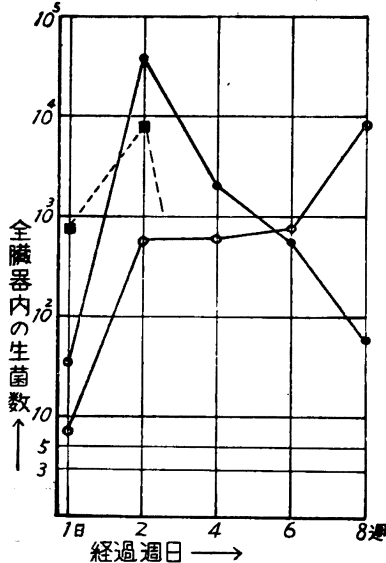
次に H 37 Rv INH 耐性株をテンジクネズミに皮下接種して7週後に殺して剖検し、接種局所の膿瘍と脾内からそれぞれ分離した菌株を 0.002 mg, 0.0002 mg ずつ4群のハツカネズミに接種した。その成績は図 6, 7 に示した。

これから脾内生菌数は、9 週後には 0.002 mg 接種群と 0.0002 mg 接種群とでは大きな差がない。

また脾内生菌数は、0.002 mg 接種群では7週以後に脾内のそれより多くなっているが、0.0002 mg 接種群では9週後まで脾内生菌数よりすくなかった。すなわち接種量をかえても、テンジクネズミの局所分離菌と脾内分離菌とは、ハツカネズミの肺脾内生菌数の動態においてほとんど等しいとみなすことができ、その菌力には差がないと考えてよいと思う。

患者から分離した INH 10 γ /cc の耐性菌 (No. 31 株) の成績は図 8 に示した。

図 8 患者より分離した INH 10 γ /cc 耐性菌を接種したハツカネズミの臓器内生菌数の動態



注 肝のみ 10 mg 中の生菌数を 100 倍して示してある (破線)。

脾内生菌数は、2 週後には定着菌数の約 3 order の増加を示して頂点となつてゐるが、4 週以後は急激に減少している。肝では 2 週後まで菌を証明しえたけれども、その後は 3 回とも組織 10 mg 中に菌を証明することができなかつた。脾内生菌数は、2 週後には定着菌数より約 2 order 高くなつてゐるが、4, 6 週後にも変動がなく、8 週後にはさらに 1 order の増加があつて、脾内のそれより 2 order 多くなつてゐる。

以上図に示したところから No. 29 株と H 37 Rv 株の場合を除いてその他の菌株では、接種 1 日後の定着菌

数と 1 週後の臓器内生菌数との間には著しい増加がないといえる。

また肉眼的に結核性病変と判定される所見は No. 29 株接種群で、4, 8 週時に肺にみられ、H 37 Rv 株接種群でも 4 週以後の剖検毎に肺にみとめられた。しかし H 37 Ra 株と INH 耐性菌感性群では肉眼的にならぬ所見もみることができなかつた。

考 察

ハツカネズミの実験的結核症では、その死亡を目標とする場合比較的大量の結核菌すくなくとも 0.1 mg 以上を接種するのが通例である。

しかし臓器内生菌数の動態を知るためには、方法的に 0.01~0.001 mg の中等量の結核菌を接種するのが妥当であると思う。これよりさらに少量の接種では、1 日後の臓器内生菌数が証明できない場合もあるので、本実験では 10⁴~10³ の生菌単位がはいるように接種を行った。実験成績に示したように、同一菌株を接種した場合でも、接種生菌数に差があると 1 日後の臓器内生菌数にも差が現われ、しかもその差がそれ以後の臓器内生菌数の動態に大きな影響を及ぼし、動態曲線の修飾を起している。また一方肺、肝、脾内生菌数の動態曲線をみると、臓器を異にするにしたがつてそれぞれ異なつた曲線を示し、定着後の菌の分裂増殖の速度が臓器によって異なることがわかる。それゆゑ単一臓器内の菌の動態から分裂増殖の程度を計り、これと菌力の程度を関係づけるのも一方法であるが、2臓器以上の動態の相互関係をもつことも正当な評価をするために必要であると考えた。

ところで有毒結核菌について、ハツカネズミ体内臓器中の生菌数の動態をみている報告は多いが^{16)~18)}、無毒ないし弱毒結核菌についての報告はすくない。特に無毒結核菌 H 37 Ra 株の動態は、実験成績に示す通りその特異性を再現しえたので、Pierce¹²⁾ らのべている菌力分類の根拠はそのままとめるわけにはいかない。また Mackaness¹³⁾ らのいうように、接種後 1 週間内の菌数の増加率も大きくない。ここで考察すべきことは実験に使用した宿主の差であり、H 37 Ra 株それ自体の問題である。本菌株はテンジクネズミの脾内でも菌数の増加があるとみとめられてゐるが、接種後 8 週では組織 10 mg 中に 1~0 と減少している¹⁹⁾。また本実験中には、1% KH₂PO₄ 培地上のその特異な集落を目標として生菌数をみたので、その純度については問題外と確信する。

したがつて、テンジクネズミに対して皮下接種によつて弱毒菌である、INH 耐性菌のハツカネズミに対する菌力の評価は、H 37 Rv 株と H 37 Ra 株のいずれに近いということになると思う。これを分析するためには、宿主体における生菌の持続時間と結核性病変の有無ということも、もちろん結核菌株の菌力の判定には必要な因

子である。

しかし静脈接種後8週までの動態から判定せんとし、弱毒菌を主としたために標準菌株の示した生菌数の動態を基礎として、肺、脾内単独臓器中の生菌数の動態と、両者の相互関係特に肺脾内生菌数の逆転期とを菌力判定の基準として、菌力の強弱を考察してみようと思う。

ハツカネズミ体内に入れられた有毒結核菌は、脾内では接種後2週で1日後の定着菌数の2 order 以上の増加を示し、1 頂点をなしている。肺内でも早期から強く増殖するため4週後には脾内生菌数より多くなっている。

この生菌数の動態は、この研究分野において多くの報告が一致している^{18)~19)}。

これに対して、無毒菌 H 37 Ra 株では2~4 週後に脾内生菌数の頂点があるが、その期間中には1 order 前後の増加しかない。肺内での増殖も有毒菌のそれに比べて、時期がおくれかつ緩徐である。そのために接種6 週以後になつて脾内生菌数より多くなっている。

これら2 菌株の体内における動態から No. 29 の0.05 γ /cc の INH 耐性菌は、有毒菌として至当な生菌数の動態を示しており、H 37 Rv 株に比較してより強い菌力を持つとしてよいであろう。この事実はテンジクネズミに対する菌力の評価とも一致している。

また H 37 Rv 株の INH 耐性菌は、肺脾内生菌数の動態特にその逆転期のおそいことからすると、H 37 Ra 株の動態に近い。しかし同時実験の成績からすると、脾内生菌数の増加率は2 週後で H 37 Ra 株より高くなっている。

No. 31 株の場合には、1 日後の定着菌数を度外視すれば2 週後までに著明な増加率を示している。したがって脾内生菌数の動態だけを比較すれば、INH 耐性菌特に No. 31 株は、H 37 Ra 株より強い菌力を持つものとみなされるであろう。

さらに No. 31 株の1 日後の臓器中の定着菌数は図6~7 の0.0002 mg 接種群のそれとほぼ等しいが、この場合には肺脾内生菌数の逆転が6 週以後に起つており弱毒菌と評価すべきであろう。

H 37 Ra 株を微量接種した場合の観察がないため、図6~7 に示した脾内生菌数が肺内のそれより多いという現象は吟味の材料に乏しいが、Pierce¹²⁾ らは微量接種した BCG の場合に同様の所見をみている。

また実験室保存菌株としての有毒菌 H 37 Rv 株と無毒菌 H 37 Ra 株の間には、種々の菌力の段階があるわけであるが、その比較研究を試みていないためここでは考察できない。

Pierce らの報告に基いて、H 37 Ra 株と INH 耐性菌のハツカネズミ体内の生菌数の動態を比較しようとした本実験の成績は、前述の通りである。その結果から、強いといえば INH 耐性菌は弱毒菌といいえようが、そ

の程度は H 37 Ra 株をもつて代表される菌力の段階より強く、有毒菌 H 37 Rv 株をもつて代表される菌力よりは相当弱いというのであろう。

最近 Middlebrook^{20), 21)} らは、INH 耐性菌は Catalase test の陽性、陰性とテンジクネズミに対する菌力の強弱とは相併行するとしている。

しかし H 37 Ra 株と BCG が Catalase test 陽性であることを考えると¹⁹⁾、INH 耐性菌とこれら弱毒、無毒菌株との菌力弱化的機序が同じであるとは思われない。

さらに Catalase test 陰性の INH 耐性菌に対してハツカネズミは感受性があり、宿主が倒れるという事実は宿主が感作されぬからであると彼は述べている。感作されぬということ免疫体の形成がない現象と解釈しているようである。しかしハツカネズミでも免疫実験は可能であり^{22), 23)}、結核菌を接種してもやがて細菌の破壊現象はみとめられるのであるから、広義の免疫という現象はあるものと考えられるのである。Morse⁹⁾ らは INH 耐性菌を0.5 mg 接種したとき肺の所見は INH 感性菌と等しく、0.2 mg 接種したときは感性菌と差のあることをみている。この成績は、大量接種によつて INH 耐性菌の真の菌力がおおわれてしまうことのある可能性を示唆するものと思う。

これまで INH 耐性菌の菌力は、有毒菌との対比において検討されて来たが、大量の INH 耐性菌と H 37 Ra 株を感受性の高いハツカネズミに接種した場合、いかなる現象がみられるか興味ふかい点であろう。

また肉眼的に肺に病変がみられぬにもかかわらず、接種後相当長期間 H 37 Ra 株が一定菌数を保持していることは組織学的にも検討しなければならない。

結 論

実験室保存菌株である有毒結核菌 H 37 Rv 株と、無毒結核菌 H 37 Ra 株を、ハツカネズミに一定菌数静脈接種して臓器内生菌数の動態を追跡し、その動態曲線を基準にして INH 耐性菌の動態を比較しその菌力の評価を試みた。

有毒菌 H 37 Rv 株の臓器内生菌数の動態については、すでに報告されている現象を認めた。

しかし無毒菌 H 37 Ra 株については、肺脾では軽度の菌数の増加があるけれども、肺内での増加は脾よりおくれ起り、肺脾内生菌数の逆転は接種6 週以後に起こることをみとめた。

この2 つの菌株の生菌数の動態と比較して、患者から分離した0.05 γ /cc の INH 耐性菌は有毒菌であつて、むしろ H 37 Rv 株の菌力より強いと評価した。

また in vitro で分離した10 γ /cc の INH 耐性菌と患者から分離した10 γ /cc の INH 耐性菌は、弱毒菌であるが H 37 Ra 株よりは脾内における増殖率が大きく、

それらの菌力も少しく強いと評価した。

皮下感染したテンジクネズミの局所膿瘍と脾内から分離した INH 耐性菌の間には、臓器内生菌数の動態にも差がなく、ほぼひとしい弱毒菌とみとめられた。

柳沢部長の御校閲を深謝する。岡本茂広君の実験上の助力に感謝する。

文 献

- 1) Barry, V. C., Conalty, M. L., & Gaffney, E.: *Lancet* 264: 978~979, 1953.
- 2) Steenken, W. Jr. & Wolinsky, E.: *Amer. Rev. Tuberc.* 68: 548~556, 1953.
- 3) Middlebrook, G. & Cohn, M. L.: *Science* 118: 297~299, 1953.
- 4) Meissner, G.: a) *Beitr. Klink. Tuberk.* 110: 219~226, 1953. b) *ibid.* 110: 538~546, 1953. c) *Dis. Chest.* 26: 15~26, 1954.
- 5) Mitchison, D. A.: *Brit. Med. T. No.* 4854: 128~130, 1954.
- 6) Karlson, A. G.: *Amer. Rev. Tuberc.* 70: 531~532, 1954.
- 7) Peizer, L. R., Minkin, A. & Widelock, D.: *Amer. Rev. Tuberc.* 70: 728~733, 1954.
- 8) Earnett, M., Bushby, S. R. M. & Mitchison, D. A.: *Brit. J. Exp. Path.* 34: 568~581, 1953.
- 9) Morse, W. C., Weiser, O. L., Kuhns, D. M., Fusillo, M., Dail, M. C. & Evans, J. R.: *Amer. Rev. Tuberc.* 69: 464~468, 1954.
- 10) Karlson, A. G. & Ikemi, Y.: *Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic* 29: 119~124, 1954.
- 11) Bloch, H., Widelock, D. & Peizer, L. R.: *Amer. Rev. Tuberc.* 68: 734~738, 1953.
- 12) Pierce, C. H., Dubos, R. J. & Schaeffer, W. B.: *J. Exp. Med.* 97: 189~205, 1953.
- 13) Mackaness, G. B., Smith, N. & Wells, A. Q.: *Amer. Rev. Tuberc.* 69: 479~494, 1954.
- 14) 佐藤直行: *医学と生物学* 34: 90~94, 1955.
- 15) 佐藤直行: *結核*, 29: 393~397, 1954.
- 16) 小川辰次, 工藤祐是, 高倉廉, 岩崎竜郎, 橋本芳郎, 村瀬貞男: *結核*, 25: 647~655, 1950.
- 17) 染谷四郎, 林治, 田島嘉雄, 遠藤元清: *結核*, 26: 75~78, 1951.
- 18) 水之江公英: *日本細菌学雑誌*, 7: 195~197, 1952.
- 19) 橋本達一郎: *医学と生物学*, 31: 115~119, 1954.
- 20) Middlebrook, G.: *Amer. Rev. Tuberc.* 69: 471~472, 1954.
- 21) Cohn, M. L., Kovitz, C., Oda, U. & Middlebrook, G.: *Amer. Rev. Tuberc.* 70: 641~664, 1954.
- 22) Dubos, R. J., Schaefer, W. B. & Pierce, C. H.: *J. Exp. Med.* 97: 221~233, 1953.
- 23) Swedberg, B.: *Acta Med. Scand. Suppl.* 254: 3~120, 1951.