

人型結核菌 INAH 耐性株の Population 構成

および耐性復帰に関する検討

三 浦 幸 二

国立療養所大府荘一指導一荘長 勝沼六郎博士

受付 昭和 31 年 5 月 14 日

Isonicotinic acid hydrazide- (以下 INAH と略) resistant mutants の *in vitro* における耐性度について, Pansy, F. ら¹⁾は, BCGにおいて, INAH への耐性は, *in vitro* で迅速に現われ, またあきらかに迅速に耐性復帰を認めたといっており, Szybalski ら²⁾は, *M. ranae* において, INAH の first step colonies は, morphology, growth rate においてことなるが, その後 INAH の存在しない培地にうえつた場合, resistant strains が sensible strains により overgrown され, reversibility を示す。しかし, これによりただちに, *in vivo* で reverse するということはいえぬといっている。これに反し Fisher³⁾は, 耐性度の消夫および低下をみぬとしている。臨床的には, わが国においても, 宝来ら⁴⁾, 上島ら⁵⁾, 石川ら⁶⁾は, 耐性復帰を認めている。佐藤⁷⁾, ⁸⁾は, 患者の排出喀痰について, INAH 耐性度に対する検討を行い, さらに, INAH 耐性結核菌 population の継代培養による変動をみ, 5代継代では, その耐性菌 population には変化がなく, 完全に INAH 耐性を保持したといっている。なお患者より分離した INAH 耐性菌では, INAH を加えぬ小川培地に継代すると, その耐性菌の population に大きな変動のおこる例もあつたといっている。さらに佐藤⁹⁾は, INAH 感性および耐性結核菌を, 人工的に混合した population の耐性度の動態について観察し, 混合 population に分布する耐性菌の比率は, 一定の割合で減少していくのを認めた

著者は, INAH の存在する培地に数代継代培養し, 高度純粋なる INAH 耐性菌を使用し, *in vitro* における耐性復帰を検討する目的にて実験した。

使用菌株および使用培地

菌株は, われわれ研究室の東村が, *Mycobacterium tuberculosis var hominis*, strain Aoyama B. (以下青山B株と略) より分離せる INAH 10 γ 耐性株で, INAH 10 γ /ml 含有せる 1%小川培地に, 8代継代培養せるもので, その population 構成は, 表1に示す通りである。

および, 同じく東村が, 青山B株より分離せる INAH 100 γ 耐性株を使用した。その population 構成は, 表1に示す通りである。

表 1 使用菌株の Population

INAH 10 γ 耐性菌株	
V.C.	65.8 \pm 3.55
IN 1 γ	38.4 \pm 7.09
IN 10 γ	16.9 \pm 2.95
INAH 100 γ 耐性菌株	
V.C	178.4 \pm 48.2
IN 10 γ	130.6 \pm 40.5
IN100 γ	73.3 \pm 32.4

使用培地は, 1%小川(辰次)培地で, その培地組成は, 第1 磷酸カリ, 1.0g; グルタミン酸ソーダ, 1.0g; 蒸溜水, 100ml; を基質とし, これに無精雞卵, 200ml; グリセリン, 6.0ml; 2%マラヒットグリーン, 6.0ml を加え, 85°C, 1時間凝固滅菌せるもので, pH は7.0であつた。

INAH は, 田辺製薬会社製の新しきものを使用した。なお薬剤は, 凝固滅菌に先立ち, その所定の濃度に, 培地に加えられた。

実験方法および実験成績

(1) INAH 10 γ 耐性株について

図1に示すごとく, INAH 10 γ 耐性株を, INAH を含有しない1%小川培地と, INAH 10 γ /ml を含有せる1%小川培地に培養せる菌株を, それぞれ, ガラス玉とともに, ナス型コルベンにて, 10分間振盪, 生理的食塩水にて, 均等菌浮遊液となし, その10進法による稀釈液を, INAH を含有しない培地と(生菌数), INAH 10 γ /ml を含有せる培地 (INAH 10 γ 以上耐性菌数) に, 大型渦巻白金耳にて, 一白金耳ずつ等量接種し, 37°C 4週培養し, 生菌数当りの INAH 10 γ 耐性菌の 100 分率をもとめて, population の構成をしらべた。以下同様にして, 3代目まで population の構成をしらべたが, その結果は, 図2のごとくである。すなわち, 薬剤を含有しない培地に継代した場合にも, 薬剤を含有する培地に継代した場合にも, その他の継代条件(たとえば INAH を含有する培地 \rightarrow INAH を含有しない培地 \rightarrow INAH を含有する培地)においても, population 構成に変化はないが, 耐性度の不均一が予想される。

図1 INR 10 γ 継代方法

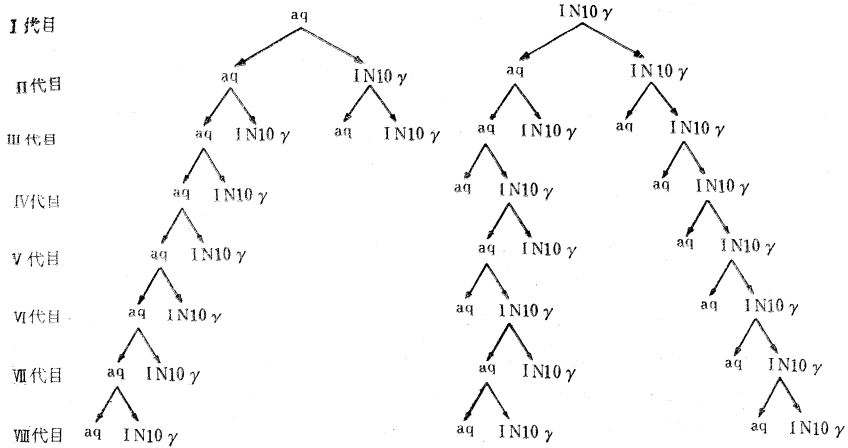
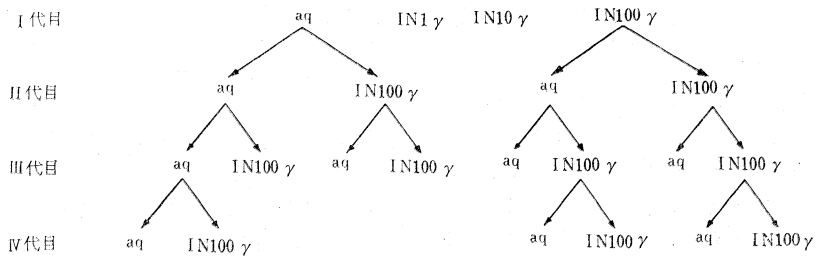


図2 INR 100 γ 継代方法



4代目以下は、(1) INAH を含有しない培地に継代せる場合、(2) INAH を含有する培地と、INAH を含有しない培地に交互に継代せる場合、(3) INAH をつねに含有せる培地に継代せる場合と、3つの場合に限定して、

継代培養を行った。その結果は、表2、3に示すごとく、その結果は、3代目までと同様に、population 構成の不変と、不均一性が予想された。

表2 INR 10 γ 継代せる場合における生菌数当り INAH 10 γ/ml を含有せる培地の INAH 10 γ 耐性菌百分率 (I~IV代目)

I 代 目	無				有			
	31.06				69.3			
II 代 目	無	有	無	有	無	有	無	有
	52.7		93.5		84.8		23.7	
III 代 目	無	有	無	有	無	有	無	有
	80.5	69.9	61.3	86.1	100.0	39.8	96.7	55.1
IV 代 目	無				無			
	62.4				85.4			
								102.8

(ただし 無：INAH を含有しない場合、有：INAH 10 γ/ml を含有せる場合)

すなわち、表2、3にて、INAH を含有しない培地のみに継代した場合は、1代目以下8代までの、INAH 10 γ 耐性菌の生菌数に対する100百分率は、31.06%、52.7%、80.5%、60.4%、50.2%、44.9%、25.3%、37.3

%であり、INAH 10 γ/ml を含有する培地に継代した場合は、69.3%、23.7%、55.1%、102.8%、62.4%、89.7%、130.2%、74.0%であり、INAH を含有する培地と、INAH を含有しない培地に交互に継代した場合に

表3 I N R 10 γ を継代せる場合における生菌数当り各薬剤濃度を含有せる培地の生菌数百分率 (V~VIII代目)

継代条件			INAH を含有しない場合			INAH を交互に含有する場合			INAH をつねに含有する場合		
			0.1 γ	1 γ	10 γ	0.1 γ	1 γ	10 γ	0.1 γ	1 γ	10 γ
V	代	目	55.3	41.2	50.2	71.3	78.3	66.6	77.7	72.9	62.4
VI	代	目	102.0	82.0	44.9	102.9	107.0	97.5	90.0	97.5	89.7
VII	代	目	57.6	57.1	25.5	66.6	72.6	81.3	91.9	144.1	130.2
VIII	代	目		81.2	37.5		98.8	26.0		75.1	74.0

は、1代目より3代目までは、31.06%、93.5%、61.3%、または、69.3%、84.8%、39.8%で、4代目より8代目までは、83.4%、66.6%、97.5%、81.3%、86.0%、であり、population 構成の動揺が認められた。

なお1代目より3代目までは、継代条件を変えた場合、なにか一定の関係が見出されるかもしれないと考えたので、種々な組合せにしたが、一定の関係を見出すことはできなかつた。

(2) INAH 100 γ 耐性株について

図2に示すごとく、INAH 100 γ 耐性株も、INAH 10 γ 耐性株と同様に、ナス型コルペンにて、均等浮游液となし、その稀釈液をもつて、薬剤を含有しない培地 (生菌数)、INAH 1 γ/ml 含有培地 (INAH 1 γ 以上耐性菌数)、INAH 10 γ/ml 含有培地 (INAH 10 γ 以上耐性

菌数)、INAH 100 γ/ml 含有培地 (INAH 100 γ 以上耐性菌数) に、大型渦巻白金耳にて、一白金耳ずつで等量接種し、37°C 6週培養し、生菌数当りの、INAH 1 γ 培地の耐性菌数、INAH 10 γ 培地の耐性菌数、および INAH 100 γ 培地の耐性菌数の 100 分率を出し、それをもつて、継代の第1代目とし、2代目は、1代目の薬剤を含まぬ培地に生えた INAH 100 γ 耐性菌と、INAH 100 γ/ml 培地に生えた INAH 100 γ 耐性菌の population を、上述とまつたく同様の操作により、その population 構成をしらべ、3代目以下は、同一の実験操作にて、(1) INAH を含有しない培地ばかりに継代する場合、(2)交互に継代する場合、(3)つねに、INAH を含有する培地に継代する場合にわけて、population の構成をしらべた。その結果は、表4のごとくで、INAH 10 γ 耐性菌

表4 I N R 100 γ 継代における population

I 代目	INAH 1 γ			INAH 10 γ			INAH 100 γ																						
	48.6			73.1			41.1																						
II 代目	無						有																						
	1 γ			10 γ			100 γ			1 γ			10 γ			100 γ													
	74.5			74.3			56.9			63.3			49.8			45.7													
III 代目	無			有			無			有																			
	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100																	
	46.8			20.6			53.6			33.4			89.0			126.2			112.5			126.2			116.0			75.3	
IV 代目	無			有			有			有																			
	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100																	
	111.8			106.2			73.4			86.2			68.5			43.9			141.8			83.4			87.9				

の場合と、全く同様に、population 構成の不変と、不均一性を予想せしむる結果をえた。

すなわち、INAH を含有しない培地にのみ継代した場合には、1代目より4代目までの生菌数に対する INAH 100 γ 耐性菌の 100 分率は、41.1%、56.9%、20.6%、73.4%、であり、INAH 100 γ/ml をつねに含有する培地にのみ継代した場合には、41.1%、43.7%、75.3%、

87.9%であり、INAH を含有しない培地と、INAH 100 γ/ml をつねに含有する培地に交互に継代した場合には、41.1%、43.7%、112.3%、43.9%であり、INAH 10 γ 耐性菌の場合と同じく、population 構成の動揺が認められた。

考 察

INAH 10 γ 耐性株, および INAH 100 γ 耐性株について, 上述の実験成績よりして, population 構成の不変と, 不均一性が考えられるが, ここで第1に問題となることは, 使用菌株に感性菌を混入していなかつたかということである。すなわち, 感性菌を混入していれば, 感性菌の overgrown により, 不均一を思わせる実験成績ができることは, 当然考えられるからである。この点, 使用した菌株は, INAH 10 γ 耐性株の場合には, count できる程度, すなわち, 200 コロニー前後に接種し, さらに, その全培養をとり, 均等浮遊液をつくつて, またそれを, count できる程度に接種し, 同様の操作により, INAH 10 γ /ml 含有せる培地に8代継代せるものであつて, 1つの clone と考えられるべき性質のもので, 感性菌は充分 select してある。

INAH 100 γ 耐性株の場合は, 同様の操作にて分離して, 2代継代したものを使用した。しかし, この場合にも, 継代を重ねて, select を重ねて行けば, もちろん継代の初期においては, 感性菌または, 耐性度の低いものを含んでいることがあつたとしても, 継代を重ねれば充分 select される筈である。

次に, 使用菌株は, 人型結核菌青山B株を使用したものであるが, 他の菌株については, 行わなかつたことを附記する。

第2に, population 構成の不変は, 佐藤りの成績と一致して, INAH 10 γ 耐性株, INAH 100 γ 耐性株においても, 継代条件を(1) INAH を含有しない培地に継代した場合, (2) INAH を含有する培地と, INAH を含有しない培地に交互に継代した場合, (3) INAH を常に含有する培地に継代した場合と変えても, population の構成に変化を認めなかつたが耐性度が, 不均一性 (INAH 耐性菌の本来の性質として) のために, 動揺するものと思われる。

ここで問題となるのは, 実験誤差により, 100分率が動揺するのではないか, ということである。しかし, 本実験においては, 全培養をとり, ナス型コルベンにて振盪し, 均等浮遊液となし, その稀釈液を厳密に等量ずつ接種し, colony count による, 生菌数にたいする, 耐性菌の率で, 試験管1本当り100~200のcolony数であり, 平均誤差よりみても充分信頼のおける数字で, 実験誤差であるとは思われぬ。

表5に示すごとく, 4代目 INAH 100 γ 耐性株の, V.C.=67.6 \pm 9.8 と, IN 100=29.7 \pm 5.36 の間には, 統計的に有意の差を認めた。同様に, 2代目 INAH 10 γ 耐性株の V.C.=525.4 \pm 61.8 と, IN 10=163.2 \pm 59.7の間にも, 有意の差を認めた。

したがつて, 上述の結果より, 100分率の動揺は, INAH 10 γ 耐性菌, INAH 100 γ 耐性菌ともに, 本来の性質としての不均一性のためと, 考えられる。

表5 統計的観察

VI代目 INR 100 γ		
○ V.C.		67.6 \pm 9.8
IN 1		58.3 \pm 17.2
IN 10		46.4 \pm 17.5
○ IN 100		
		29.7 \pm 5.36
II代目 INR 10 γ		
○ V.C.		525.4 \pm 61.8
IN 10		163.2 \pm 59.7
VII代目 INR 10 γ (薬剤を含みぬ培地に継代)		
○ V.C.		350.4 \pm 82.0
IN 1		200.6 \pm 56.3
○ IN 10		89.7 \pm 22.6

INAH-耐性菌の population 構成が, 不均一であるということは, population を構成する individual cells の耐性度の低下が起ることを示している。したがつて, individual cells の耐性度は, 不均一性のために動揺するけれども, population としての耐性度が, 低下するとは思われぬ。INAH-耐性菌に, population としての back mutation が, 起るのであれば, INAH 耐性菌を, INAH を含有せぬ培地に継代することにより, population の耐性度が低下する筈であるが, 上述のように, population としての耐性度は, 低下を示さなかつた。したがつて, individual cells の耐性度の低下は, あつても, 感性菌への back mutation ではなく, INAH 耐性菌を生ずる性質を保持しているものと思われぬ。

ここで, さらに考えられるのは, population を構成する individual cells の中で, 耐性度の低下した individual cells と, 高い耐性度の individual cells との間の発育速度に, 相違がある場合には, 耐性度の低い individual cells の overgrown による reverse が, 考えられる。1%小川培地における, INAH 100 γ 耐性菌と, INAH 10 γ 耐性菌の, growth rate と, generation time については, 現在検討中にて, 別報に譲るが, single cells を接種して, colonies を肉眼でみとめるまでの期間を検討するに, INAH 耐性菌, 感性菌ともに, 同一であつた。したがつて, 両者の間に, 大きな差があるとは思われぬ。これから考えると, 低い耐性度の individual cells の overgrown による reverse は, 今直に考えることはできないものと思われる。

結 論

(1) INAH 10 γ 耐性菌を, INAH 10 γ /ml を含有する培地で, 8代継代しても, また INAH を含有しない培地で8代継代しても, population 構成は変らなかつた。

(2) INAH 100 γ 耐性菌を, INAH 100 γ /ml を含有す

る培地で、4代継代しても、また INAH を含有しない培地で、4代継代しても、population 構成は変らなかつた。

(3) INAH 耐性菌の population 構成は、本来の性質として、不均一であると考えられる。

(4) INAH 耐性菌の population 構成の不均一性は、population を構成する individual cells の耐性度の低下がおこることを示している。したがつて、individual cells の耐性度は、不均一性のために、動揺するけれども、population としての耐性度が、低下するとは思われない。

(5) INAH 耐性菌に、population としての、back mutation が、おこるのであれば、INAH 耐性菌を、INAH を含有せぬ培地に継代することにより、population の耐性度が低下する筈であるが、上述のように、population としての耐性度は低下しない。したがつて、individual cells の耐性度の低下はあつても、感性菌への back mutation ではなくて、INAH 耐性菌を生ずる性質を保持しているものと思われる。

御指導および御校閲を賜つた、国立療養所大府荘荘長勝沼六郎博士、名古屋大学医学部内科第一講座日比野進教授に感謝します。なお本研究を行うに当り、御助言を賜つた大府荘の、東村道雄博士、君野徹三博士に

感謝します。なお御協力を賜つた、大府荘研究室加藤千代女史、鈴木礼枝氏に感謝します。

本論文の要旨は第31回日本結核病学会にて発表した。

参考文献

- 1) Pansy, F., Stander, H. & Donovan, R.: Am. Rev. Tuberc., 65 (6) : 761—764, 1952.
- 2) Szybalski, W. & Bryson, V. : Am. Rev. Tuberc., 65 (6) : 768—770, 1952.
- 3) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 66 (5) : 626—628, 1952.
- 4) 宝来他 : 日本臨床結核, 13 : 672—677, 1954.
- 5) 上島・稿本・石田・八坂 : 日本臨床結核, 14 : 501—511, 1955.
- 6) 石川他 : 結核, 30 : 183—189, 1955.
- 7) 佐藤 : 医学と生物学, 31 : 250—254, 1954.
- 8) 佐藤 : 結核, 30 : 310—314, 1955.
- 9) 佐藤 : 結核, 30 : 119—122, 1955.
- 10) Johnston, R.N. and Riddell, R.W. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 442—452, 1954.
- 11) Steenken et al. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 754, 1952.