

人型結核菌 INAH 耐性菌の viability について

三 浦 幸 二

国立療養所大府荘一指導 勝沼六郎博士

受付 昭和 31 年 5 月 29 日

Middlebrook¹⁾および、Morse²⁾らにより、Isonicotinic acid hydrazide-(以下 INAH と略) resistant Mycobacterium tuberculosis は、guinea pigs に対し、通常中等度、または高度に病原性がないといっている。また、Middlebrook³⁾は、かくの如き INAH 耐性菌は、試験管内では、カタラーゼ反応陰性または、弱陽性であるといっている。さらに、ある菌株の INAH 耐性菌は、発育因子として hemin を必要とし⁴⁾、または alpha-Keto 酸あるいは無機鉄を感性株以上に、必要とするといっている。INAH 耐性菌は明らかに、上述の如く、感性菌とは異なつた性質を持つている。東村⁷⁾らは Mycobacterium avium において、INAH 耐性菌の生菌数の減少を認めた。

佐藤⁸⁾は、INAH 耐性菌を継代し、その population の構成に変化をみとめなかつたが、患者より分離した INAH 耐性菌を継代した場合、耐性度の減弱を認め、感性菌が混入し、それによる overgrown によるものであろうといっている。また INAH 感性および耐性結核菌を、人工的に混合した population の耐性度をしらべ、その減弱を認めている。

著者¹¹⁾は、1%小川培地を使用し、INAH 10 γ 耐性菌を 8 代、INAH 100 γ 耐性菌を 4 代継代培養したが、population の構成には変化を認めなかつたが、population の動揺をみとめ、この動揺は、individual cells の耐性度の減弱によるものであるとし、INAH 耐性菌は、本来の性質として不均一であると考えた。

上述の如く、見かけ上の耐性度の減弱は、INAH 耐性菌の本来の性質としての不均一性¹¹⁾によるものと思われるが、さらに、viability および、generation time とも関係があると思われる。

人型結核菌における INAH 耐性菌の耐性復帰の問題を、明らかにする目的にて、viability を検討するため実験をした。

実験材料

使用菌株：

- (1) 人型結核菌青山 B 株の感性株。
- (2) 青山 B 株より one step により分離した INAH 1 γ 耐性菌株。以下 AINR と記載。
- (3) 青山 B 株より分離し、INAH 10 γ/ml を含有せる

1%小川培地に、10代継代せる INAH 10 γ 耐性株。INR 10 と以下略。

(4) 青山 B 株より分離し、INAH 100 γ/ml を含有せる 1%小川培地に、4代継代せる INAH 100 γ 耐性株。INR 100 と以下略。

(5) 青山 B 株より分離し、streptomycin (以下 SM と略) 100 γ/ml を含有せる 1%小川培地に、9代継代せる SM 100 γ 耐性株。SMR 100 と以下略す。

なお、(3)、(4)、(5)は、われわれ研究室の東村が分離せるものである。

培地：

1%小川(辰次)培地を使用した。その組成は、第 1 磷酸カリ.1.0 g. ; グルタミン酸ソーダ 1.0 g. ; 蒸溜水 100 ml を基液となし、これに卵液 200 ml ; グリセリン 6.0 ml ; 2%マラヒット緑 6.0 ml を加え、各中試験管に 10 ml 分注、85°C 1 時間凝固滅菌した。

なお凝固滅菌に先だち、薬剤が、その所定の濃度に培地に加えられた。ただし SM のみは、凝固後の力価を γ として、所要濃度の倍量に加えられた。

INAH は、田辺製薬会社製のもので、streptomycin は、Dihydrostreptomycin Sulfate を使用した。

実験方法

(1) 青山 B 株を 1%小川培地に(生えた菌株を A と以下略)、(2) 青山 B 株を、INAH 1 γ/ml 含有培地に接種(生えた菌株を、AINR と略)。(3) INR 10 を、薬剤を含まぬ培地(生えた菌株を INR 10 aq と略)と、INAH 10 γ/ml を含有する培地(生えた菌株を、INR 10 IN と略)。(4) INR 100 を、薬剤を含まぬ培地(生えた菌株を、INR 100 aq と略)と、INAH 100 γ/ml を含有する培地(生えた菌株を、INR 100 IN と略)。(5) SMR 100 を、薬剤を含まぬ培地(生えた菌株を、SMR 100 aq と略)と、SM 100 γ/ml を含有せる培地(生えた菌株を、SMR 100 SM と略)に接種し、37°C で培養した。

(注。接種は、保存菌株を、それぞれ、ナス型コルベンにて、ガラス玉とともに振盪、生理的食塩水にて均等浮游液となし、大型渦巻白金耳にて、原液を INAH 1 γ/ml 含有培地に接種、one step selection にて AINR をとつた。その他の場合には、10進法による稀釈液を、それぞれ 200 コロニー前後に接種した。)

上述の如く接種培養せる菌株を、それぞれ別々に、接種後29日、33日、41日、48日後に、ナス型コルベンにて、ガラス玉とともに振盪、生理的食塩水にて均等浮游液となし、その10進法による稀釈液を、薬剤を含有しない培地に、大型渦巻白金耳にて、等量ずつ、10本ずつに接種、1 mg 湿菌量当りの生菌数を算定した。

別に、菌浮游液の濃度は、Leitzの Rouy-Photometer (610 m μ) を使用、予かじめ調製せる標準曲線により湿菌量 mg/ml を決定した。

実験成績

(1) AINR について

図1に示すごとくであるが、感性株に比して、生菌数の減少の傾向を認めるが、有意の差を認めることはできなかった。

(2) INR 10 aq, INR 10 IN について

図2に示すごとくで、INR 10 aq, INR 10 IN ともに、Aに比して、減少の傾向は認めるが、AINRの場合と同じく、48日まででは有意の差を認めることはできなかった。

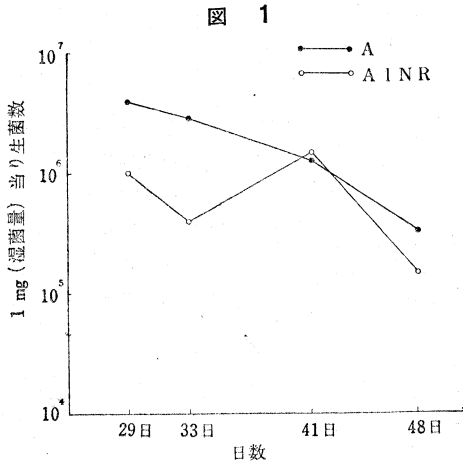


図 2

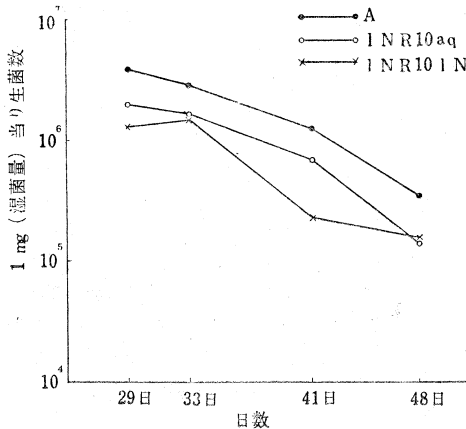


図 3

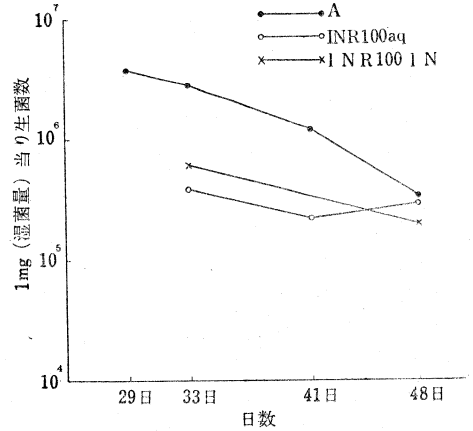
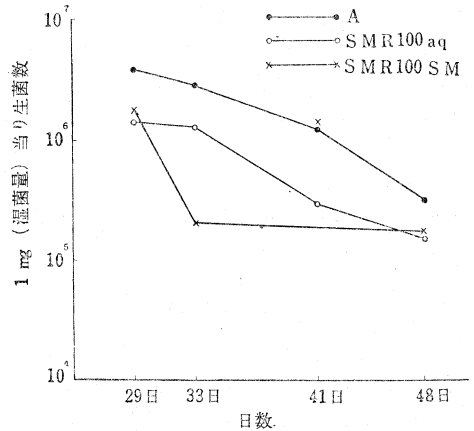


図 4



(3) INR 10 aq, INR 10 IN について

図3に示すごとく、INR 10 aq, INR 10 IN ともに、Aに比して減少の傾向を認めるが、同じく、48日まででは有意の差を認めることはできなかった。

(4) SMR 100 aq, SMR 100 SM について

図4の如くである。やはりAに比して、生菌数の減少の傾向は認めるが、48日まででは生菌数の減少に有意の差をみとめることはできなかった。

考案

青山B株は、SM, INAH に対しても感性であり、INR 10, INR 100, SMR 100 ともに、それぞれの薬剤を含有せる培地に継代し、充分 selection してあり、感性菌を混入していないと推定される菌株を使用した。

(1) AINR の場合には、one step selection であり、当然感性菌の混入も考えられるし、耐性復帰もあるかも知れない。したがって、Aに比して、生菌数の減少の傾向をみとめるが、しかし有意の差を見出すことができなかったのは、ありうることと思われる。

(2) のINR 10 aq, INR 10 IN の場合、やはり、Aに

比して有意の差をみとめることはできなく、かつ、INR 10aq と INR 10IN の曲線は、ほぼ一致している。これは、INAHの存否により、stationary phase, logarithmic Death phase において、INR 10の viability の duration が、なんらの影響を、受けないことを示している。

(3) INR 100aq, INR 100IN について

INR 100の場合にも同様で、ともにAに比し、INR 10よりは生菌数減少の傾向は大であるが、やはり有意の差は認められなかつた。同様に、INAH 100 γ/ml の存否により、INR 100の viability の duration が影響されないことは、INR 100ag と INR 100IN の曲線のほぼ一致することにより、うかがうことができる。

(4) SMR 100aq, SMR 100SM について

SMRの場合にも、SMの存否により、viability の duration に有意の影響を及ぼすとは思われない。

INRの場合、Aに比して、生菌数の減少の傾向はみとめられるが、有意の差はなかつた。

われわれの1%小川培地を用いた実験においては、INR 10, INR 100, A, ともに visible colonies を発見するまでの期間に、著差があるとは思われなかつたが、これより考えると、それぞれの generation time の間に著差があるとは思われない。

著者¹¹⁾は、青山B株より分離せるINR 10 γ , INR 100 γ を、それぞれ、(1) 薬剤を含有しない培地のみ継代した場合、(2) 薬剤を含有しない培地と、薬剤を含有する培地に交互に継代せる場合、(3) 薬剤を常に含有する培地のみ継代した場合とにわけて、INR 10 γ は8代、INR 100 γ は4代継代実験を行つたが、populationの構成には、なんらの変化なく、population構成に動揺を認めた。(注、INAH耐性菌の不均一性とは、population構成の動揺を意味する。) population構成の動揺には、individual cellsの耐性度の低下が考えられる。

臨床的に、INAH耐性菌の back mutation を認めたのは、第1に、接種菌数が極めて少なくある程度以上の耐性菌が、selectionされたことが考えられる。第2に、INR 10 γ またはINR 100 γ 耐性菌の viability durationの減少のために、おこるかもしれない。第3に、感性株と、INR 10 γ , INR 100 γ の generation time に相違があり、すなわち、INR 10 γ およびINR 100 γ の発育速度が、感性株とかなり相違し、感性菌の overgrownにより、耐性復帰がおこるのか、第4に、INAH耐性菌が、本来の性質として、上述の如き不均一性により、耐性度が低下し耐性復帰したと認められたところが、たまたま、耐性度が低下したところであつたかもしれない。

著者は、第4のINAH耐性菌の不均一性が、見掛け上のINAH耐性復帰をきたすと、考えているが、第3は佐藤¹⁰⁾により、認められているが、われわれは、この点 generation time の面よりさらに検討する予定である。

結局、少なくとも第2の場合の、生菌数の減少により、耐性度が低下することはないものと思われる。

なお、本紙に附記して置きたいのは、東村⁷⁾らによる Mycobacterium avium における INAH 耐性菌の生菌数の減少は、単なる INAH耐性菌の生菌数の減少は、単なる INAH 耐性菌の生菌数の減少であつたか、あるいは、INAH耐性菌の代謝産物により、耐性菌がいわゆる死んでいたのであつたかも知れないと考えている。

結 論

1%小川培地を使用し、人型結核菌青山B株の感性株、one step selection による INAH 1 γ 耐性菌株、INAH 10 γ 耐性菌株、INAH 100 γ 耐性菌株、SM 100 γ 耐性菌株の viability について、検討したが、少なくとも接種後48日までにおいては、stationary phase, logarithmic Death phase において、感性株に比し、それぞれの耐性株は、生菌数 (mg/cc 当り) の減少の傾向をみとめたが、有意の差を認めることはできなかつた。なお INR 10, INR 100 ともに、培地に INAH 10 γ/ml , INAH 100 γ/ml の存在により、生菌数になんらの影響も受けなかつた。SMR 100の場合にも、培地に SM 100 γ/ml の存在により生菌数に、有意の差があるとは思われなかつた。

御指導を賜つた国立療養所大府荘勝沼六郎博士、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、御校閲を賜つた国立療養所大府荘東村道雄博士、君野徹三博士に感謝します。また終始実験に当り、御助力を賜つた大府荘研究室加藤千代女史、鈴木初枝氏に感謝します。

参 考 文 献

- 1) Middlebrook, G. and Cohn, M.L. : Science, 118 : 297, 1953.
- 2) Morse, W.C., Weiser, O.L., Kuhns, D.M., Fusillo, M., Dail, M.C. and Evans, J.R. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 464~468, 1954.
- 3) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 4) Cohn, M.L., Oda, V., Kovitz, C. and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 465, 1954.
- 5) Cohn, M.L., Kovitz, C., Oda, V. and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 6) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954.
- 7) Tsukamura, M., Miura, K. and Suzuki R. :

- A study on the viability of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium avium*. (J. Antibiotics, Seri. A in press)
- 8) 佐藤：医学と生物学，31：250～254，1954.
 - 9) 佐藤：結核，30：310～314，1955.
 - 10) 佐藤：結核，30：119～122，1955.
 - 11) 三浦：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。第31回日本結核病学会発表。(結核掲載予定)