

結核菌の INAH 耐性に関する知見補遺

第3編 SM耐性株における INAH 耐性菌出現率および INAH 耐性株における SM 耐性菌出現率について

三 浦 幸 二

国立療養所大府荘 (指導一荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 31 年 5 月 29 日

Miller and Bohnhoff¹⁾ (1947) は, meningococcus より, type B variants を分離した。この variant B は, in vitro および in vivo において, 増殖するために streptomycin (以下 SM と略) に依存性をもつもので, SM 5 γ/ml 以下含有培地では生えなく, SM 100~400 γ/ml で, もつともよく発育した。そして, mice が, SM を投与されなければ, mice に対し毒性を有しなかつた。すなわち, SM を投与された mice では, meningococcal sepsis を生じたと, 始めて報告している。その後依存性菌は, 結核菌以外の細菌について, 多く報告されている。

Mycobacterium tuberculosis var hominis については, Yegian et²⁾, Lennert⁵⁾, Owen⁴⁾ らの報告があり, Mycobacterium ranae については, Yegian²⁾⁵⁻⁷⁾ の報告がある。Mycobacterium avium については, 矢坂, 山村⁸⁾ が報告している。

依存菌は, SM 以外には, Emerson⁹⁾ は, Neurospora の sulfonamide 依存株について, また Bryson et¹⁰⁾ は, Mycobacterium ranae の isoniazid 依存株について報告している。

君野¹¹⁾ は, Sulfathiazole 500 γ/ml ~100 γ/ml と, 接触増殖した SM 耐性菌が, SM 依存菌に推移する現象をみとめている。

Demerec¹²⁾ は, Escherichia coli において, SM 耐性のうち 60% が, その発育にとって, SM に依存性をもつものであつた。すなわち, それらは, SM を含有する培地においてのみ充分発育できたが, SM を含有しない培地においては, 僅かに数回分裂するのみであつたといひ, SM 耐性菌には, 依存菌が相当量含まれていることを示している。

しかしながら, Miller¹⁾ は, 依存菌はもとの株の population 10^{-10} に 1~3 個位の割合であつたといひ, Newcombe¹¹⁾ らは, Escherichia coli について, SM 耐性菌および, SM 依存性菌への mutation rate を測定し, 1×10^{-10} per bacterium per division cycle であつたと報告している。

病原性については, 橋本¹³⁾ が, 18-b を使用し, てんじくねずみに皮下または静脈に大量接種し, 肉眼的病変

をつくらず, 無毒化が著明であつたといひ, またこれに対し, SM の投与を試みた場合も, 感染経過に大きな影響を, 与えることはできなかつたと報告している。頻度, 病原性の点より, SM 依存菌は臨床的には, 兎角軽視されがちであるが, 著者は, Mycobacterium avium の SM 高耐性菌の, SM 使用時における生菌数について, 興味ある所見を得たので, 本紙にこれを報告する。

実験材料

使用菌株:

Mycobacterium avium 獣調株より, われわれ研究室の君野が分離した, SM 耐性菌 (SMR-3a, 20,000 γ 以上耐性, 以下 SMR と略) および当研究室東村が, 同様に分離した INAH 耐性菌 (その population 構成は, IN 1=42.5%, IN 10=28.4%, IN 50=17.8% であつた) を使用した。

培地:

Sauton 培地を使用した。その組成は, グルタミン酸ソーダ 4.0 gm, グリセリン 6.0 ml, クエン酸 2.0 gm, 第 1 磷酸カリ 0.5 gm, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 gm, クエン酸鉄アンモン 0.05 gm, 蒸溜水 1,000 ml で, pH は 7.4 に修正された。そして, 50 ml ずつ 200 ml の Erlenmeyer のフラスコに分注, 115°C, 20 分 autoclav により滅菌された。生菌数を決定するためには, Sauton 寒天培地 (その組成は, Sauton 培地に, 3% の割合に, 寒天が加えられた。) を使用し, 各平板に, 20 ml ずつ分注した。

使用薬剤:

SM は, Dihydro-streptomycin Sulfate で, 協和製薬会社製を使用した。INAH は, Isonicotinic acid hydr-azide で, 田辺製薬会社製のものを使用した。

実験方法

(1) Sauton agar Slant に保存せる SMR を, Sauton 培地にて, 培養し, 接種後, 3, 6, 8, 14, 24 日目に, 菌をとりナス型コルベンにて, ガラス玉とともに 10 分間振盪, 生理的食塩水に懸濁し, 均等浮游液となし, その菌液を 0.1 ml ずつ, INAH 50 γ/ml , および INAH 50 γ/ml + SM 200 γ/ml を, それぞれ含有する 3% Sauton

agar 平板に接種し、またその菌液の10進法による稀釈液を、SM 200 γ /ml を含有する培地と、薬剤を含有せぬ培地に接種し、接種菌数当りの SM 200 γ 耐性菌数、INAH 50 γ 耐性菌数、および SM 200 γ /ml 併用時における INAH 50 γ 耐性菌数を比較した。

(2) 上記の実験により、SM 200 γ /ml 含有培地に生じた SMR の colonies を、1個ずつ釣り、1個の colony を、SM 200 γ /ml 含有 3% Sauton agar Slant (小試験に 2 ml ずつ分注) および、薬剤を含まぬ 3% Sauton agar Slant に、それぞれ接種し、37°C 4日間培養し、SM dependent mutant をしらべた。

(3) 実験(1)と同じく、保存せる INR を Sauton 培地にて培養し、同様な方法により菌液を調製し、5, 7, 12, 30日目に、SM 200 γ /ml および SM 200 γ /ml + INAH 10 γ /ml を含有する 3% Sauton agar に、0.1ml ずつ接種し、その稀釈液を、INAH 10 γ /ml 含有する培地と、薬剤を含有しない培地とに接種し、生菌数当りの INAH 10 γ 耐性菌数、SM 200 γ 耐性菌数、INAH 10 γ /ml 併用時における SM 200 γ 耐性菌数を比較した。

実験成績

(1) SMR より SM 併用および INAH 単独使用において出現する INAH 耐性菌数について。

表1の如き成績を得た。すなわち、接種菌数に対する SM 200 γ 耐性菌数の100分率は、3日目は110.3%、6日目は166.7%、8日目は131.6%、14日目は148.2%で、24日目を除き 100%以上であった。それを図示すると、図1の如くであるが、明らかに、薬剤を含有しない培地の生菌数に比し、SM含有培地における生菌数の増大をみとめた。

生菌数当りの、出現する INAH 50 γ 耐性菌数と、SM 200 γ /ml 併用時において出現する INAH 50 γ 耐性菌数をみると(表1)、明らかに、SM 200 γ 併用時に増大をみとめた。これを図示すると、図2の如くなる。

表1 SMR より、SM 併用および INAH 単独使用において出現する INAH 耐性菌数

	平板当り 接種菌数	接種菌数に 対する SM 200 γ 耐性菌 数の百分率	平板当り INAH 50 γ 耐性菌数	SM 200 γ 併 用における INAH 50 γ 耐性菌数
3日目	195.2 \times 10 ⁶	110.3	72.2	165.2
6日目	"	166.7	22.8	202.1
8日目	"	131.6	42.6	346.6
14日目	"	148.2	10.3	430.9
24日目	"	86.3	7.0	18.5

(2) 実験(1)において、SM含有培地における生菌数の増大は、SM-dependent mutant によるものと思われるので、colony を1個ずつ釣り、SM 200 γ /ml 含有、および薬剤を含有しない 3% Sauton agar Slant に接種

図1 SM200 γ 耐性菌数の接種菌数に対する百分率

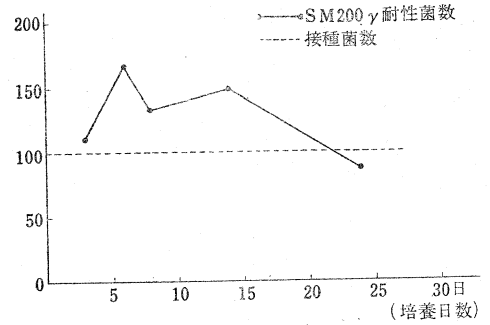
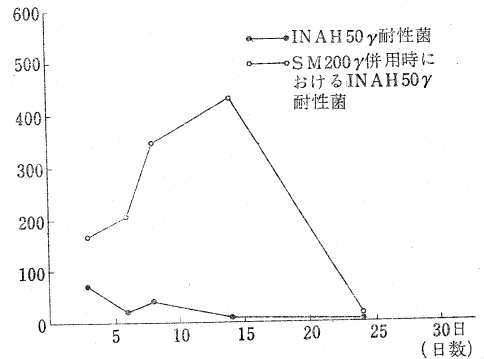


図2 INAH 50 γ 耐性菌数



したが、dependent mutant を分離することはできなかった。

実験は、前後3回行い、1回につき、100 colonies ずつを行った。

(3) INR より、INAH 併用および SM 単独使用において出現する SM 耐性菌数について

表2の如き成績を得た。接種菌数に対する INAH 10 γ 耐性菌数の100分率は、100%以下で、薬剤を含有しない培地の生菌数に比し、INAH 含有培地における生菌数の増大を認めることはできなかった。

表2 INR より INAH 併用および SM 単独使用において出現する SM 耐性菌数

	平板当り 接種菌数	平板当り INAH 10 γ 耐性菌数	IN 10 γ 耐性菌の 接種菌数 に対する 百分率	SM 200 γ 併用 における SM 200 γ 耐性菌数	INAH 併 用における SM 200 γ 耐性菌数
5日目	372.0 \times 10 ⁶	235.3 \times 10 ⁶	60.7	0.75	0.62
7日目	"	279.2 \times 10 ⁶	76.1	4.0	2.4
12日目	"	330.0 \times 10 ⁶	88.7	16.0	12.0
30日目	"	278.4 \times 10 ⁶	75.0	8.64	7.68

また生菌数当りに、出現する SM 200 γ 耐性菌数と、INAH 10 γ /ml 併用時において出現する SM 200 γ 耐性菌数をみると、SMRの場合と異なり、INAH 併用時において SM 耐性菌数の増大を認めることはできなかった。

図3 INAH 10 γ 耐性菌の接種菌に対する百分率

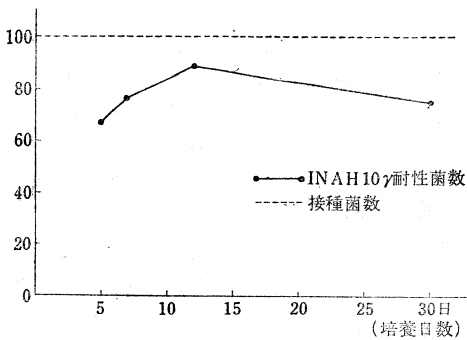
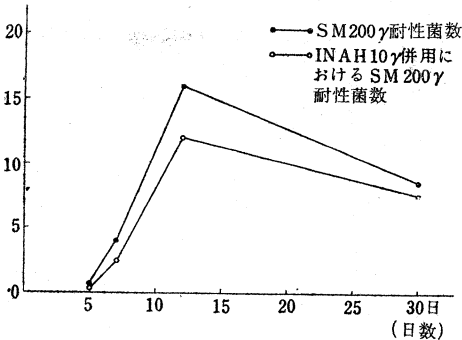


図4 SM 200 γ 耐性菌数



考 察

使用したSMRは、20,000 γ 以上の高耐性菌である。

この菌株を、SMを含有しない培地に接種した場合の生菌数よりも、SM 200 γ/ml を含有する培地に接種した場合、生菌数が著明に増大することは、その population が、耐性菌のみにより構成されるのではなく、それ以外のものが、その population 構成に大きな役割をしていることが考えられる。

ここで、第1に dependent についての定義が問題となる。

Miller は、依存菌は、もとの株の population 10¹⁰ に 1~3個位の割合で分離したと述べている。また Newcombe ら¹⁴⁾ は、Escherichia coli について、SM依存性菌およびSM耐性菌への spontaneous mutation rate を測定し、両者ともに、1 \times 10⁻¹⁰ per bacterium per division cycle であつたといつている。人型結核菌については、橋本¹⁵⁾ は、人型結核菌 H₂ 株より 18-b 株を、4.4 \times 10⁹ に 1 個の割合で分離している。また、東村、三浦、野田¹⁵⁾ は、青山B株を使用し、SM 20 γ に対する感性菌よりの出現率をしらべたところ、10⁷ に 8.6個であつた。これから考えると、人型結核菌においても、Escherichia coli においても、SM耐性菌(ただし高耐性菌)およびSM依存菌への spontaneous mutation rate は、ほぼ同率である筈である。

Mycobacterium avium については、東村、三浦、橋

本¹⁶⁾ は、SM耐性への mutation rate は、10⁻¹⁰~10⁻¹¹ per bacterium per bacterial generation であつた。依存菌については、矢坂、山村⁸⁾ が分離している。

今、保存菌に、全くSM依存菌を含んでいない場合には、dependent は、10¹⁰~10¹¹ に 1 個しか含まれぬ筈である。しかるに本実験においては、SM 200 γ/ml 含有 Sauton agar 上の生菌数は、薬剤含有培地上の生菌数に比し著明な増大を示した。これは、保存せる SMR 中に、すでに相当数の SM 依存菌が含有されていたことを示している。

また、橋本¹⁷⁾ は、18-b の逆変異率については、SM 高濃度含有 Kirchner 寒天培地継代第11代および第25代の逆変異率は、それぞれ 1 : 4.8 \times 10⁶、および 1 : 4.3 \times 10⁶ であつたといひ、極めて、安定せるものであつた。安定せるものである故、分離ができたので、これを、狭義の dependent と考えたい。耐性菌はもちろん薬剤含有培地にも生え、薬剤を含有しない培地にも生えるが、特に発育を促進されるものを、増強株といわれているようであるが、これが果して妥当であるか問題である。われわれは、増強株を、不安定な dependent mutant と考えている。すなわち不安定であるから、colony を釣つて接種すると同時に逆変異をおこして、resistant となると考えている。したがつて dependent とは、いわゆる狭義の安定した dependent と、いわゆる、増強株を含んだものである。このように定義すると、SMR の population 中には、極めて多量の dependent を含んでいることとなる。

しかるに、実験(2)において、colony を釣つた場合、狭義の dependent を、証明することができなかつたのは、(少なくとも、300 colonies 中に 1 個も発見できなかつた。)ほとんどが、いわゆる SM 増強株であつたことになる。

SMR よりの、SM 併用または INAH 単独使用時における、INAH 50 γ 耐性菌出現率についてであるが、INAH 50 γ/ml のみを含有した場合に出現する INAH 50 γ 耐性菌数よりも、INAH 50 γ/ml + SM 200 γ/ml を含有せる培地に出現した INAH 50 γ 耐性菌数の方が、はるかに大であつた。これは、いわゆる増強株より出現せるものと考えられるが、この事実より下記の如く、さらに興味ある事実を観察することができる。

例えば、表1の8日菌の場合を採り上げてみると、接種菌数に対する SM 200 γ 耐性菌数の100分率は、131.6%である。SMRは、20,000 γ 以上の耐性であるので、100%はSM耐性菌であり、31.6%は dependent である筈である。その 100%のSM耐性菌より出現せる平板当りの INAH 50 γ 耐性菌数は42.6で、31.6%の dependent より出現せる平板当りの INAH 50 γ 耐性菌数は346.6と 42.6 の差、すなわち 30.4 であるべきである。これより

みると、SM-dependent よりの INAH 50 γ 耐性菌出現率は、SM耐性菌よりの INAH 50 γ 耐性菌出現率の約24倍という事実を見出すことができる。これから考えると、SM-dependent は、極めて INAH 耐性菌を生じやすい性質を持っていることがうかがわれる。

INR についても、同様な実験を行つてみた。Bryson, Deiches, and Szy Balski¹⁰⁾は、Mycobacterium ranae の INAH 依存株を分離しているので、SM の場合の如き結果を予想したのであるが、INR の場合には、特別な事実を見出すことはできなかつた。

したがつて、INR の population 中には、SMR ほど多量には、その population 中に dependent を含有しないものと思われた。

結 論

Mycobacterium avium 獣調株より分離した SM 耐性菌株 (20,000 γ 以上耐性) および INR 50 γ を使用した。培地は、Sauton 培地、および 3% Sauton agar であつた。

(1) 保存せる SMR を、Sauton 培地にて培養し、3, 6, 8, 14, 24 日目に、ナス型コルベンにて均等浮遊液となし、INAH 50 γ/ml および INAH 50 γ/ml + SM 200 γ/ml を、それぞれ含有する 3% Sauton agar 平板に等量ずつ接種、その10進法による稀釈液を、薬剤を含有せぬ培地に接種し、接種菌数当りの SM 200 γ 耐性菌数、INAH 50 γ 耐性菌数、および SM 200 γ/ml 併用時における INAH 耐性菌数を比較し、接種菌数に対する、SM 200 γ 耐性菌数の増加、および SM 200 γ/ml 併用時における INAH 50 γ 耐性菌数の増大を認めた。

(2) SM 200 γ/ml 含有培地に接種せる SMR の colony を、1 個ずつとり、安定した依存株を分離しようとしたが、分離することはできなかつた。

(3) INR についても、SMR と同様な実験を行つたが、SMR の如き結果を得ることはできなかつた。

御指導御校閲を賜つた国立療養所大府荘荘長勝沼六郎博士および名古屋大学医学部内科第1講座日比野進教授に感謝します。なお、終始御助言を賜つた大府荘君野徹三博士、東村道雄博士に感謝します。本研究を行う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) Miller, C.P. and Bohnhoff, M. : J. Bact., 54 (4): 467~481, 1947.
- 2) Yegian, D., Budd, V. and Vanderlinde, R.J. : J. Bact., 58: 257~259, 1949.
- 3) Lennert, T.F. & Hobby, G.L.: Am. Rev. Tuberc., 59 (2): 219~220, 1949.
- 4) Owen, C.R., Adcock, J., Stow, R.M., Stautot, L.W., and Davey, W.N. : Am. Rev. Tuberc., 61: 705~718, 1950.
- 5) Yegian, D. and Budd, V. : J. Bact., 55 (4): 459~461, 1948.
- 6) Yegian, D. and Vanderlinde, R.J. : J. Bact., 57 (2): 169~178, 1949.
- 7) Yegian, D. and Budd, V. : J. Bact., 61: 161~165, 1951.
- 8) 矢坂・山村: 日本臨床結核, 9: 92~95, 1950.
- 9) Emerson, S. : J. Bact., 54 (2): 195~207, 1947.
- 10) Bryson, V., Deiches, H., Szybalski, W. : Am. Rev. Tuberc., 68: 631~633, 1953.
- 11) 君野: J. Antibiotics Seri. B.
- 12) Demerec, M. : Genetics, 36 (6): 585~597, 1951.
- 13) 橋本: 結核, 30 (1): 4~8, 1955.
- 14) Newcombe, H.B. and Hawirko, R. : J. Bact., 57 (5): 565~572, 1949.
- 15) Tsukamura, M., Miura, K., Noda, Y. : (結核海外版掲載予定)
- 16) Tsukamura, M., Miura, K., Hashimoto, M. : J. Anti. seri. A., 9 (1): 19~21, 1956.
- 17) 橋本: 結核, 30 (5): 237~241, 1955.
- 18) Kirchheimer, W.F. and Youmans, G.P. : Am. Rev. Tuberc., 66: 486~496, 1952.
- 19) Paine, T.F. JR. and Finland, M. : J. Bact., 56: 207~218, 1948.
- 20) Yegian, D. and Budd, V. : J. Bact., 61: 167~170, 1951.
- 21) 橋本: 結核, 30 (5): 237~241, 1955.
- 22) 橋本: 結核, 30 (8): 461~466, 1955.
- 23) 橋本: 結核, 30 (12): 707~711, 1955.
- 24) 加藤・三木・松永: 医学と生物学, 37(5): 161~164, 1955.