

薬剤耐性結核菌の毒力とこれに関連した諸性状について

第1篇 主としてKH 1株のSM, INH耐性株およびその純粋株の毒力について

工藤祐是・豊原希一・檜川義親

工藤 禎

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

国立療養所清瀬病院 (院長 島村喜久治)

受付 昭和32年4月16日

緒言

結核菌が抗結核剤に耐性を得ると、その原感性株とは異なつた毒力を示すかもしれないという考はかなり以前より述べられている。この問題は細菌の変異という生物学的興味と同時に、臨床的に治療ないし予後に対して重大な関連があり徹底的な検討が必要であろう。

現行の薬剤中、SMについてはすでに1948年のSteenken¹⁾の論文に耐性菌毒力の変動を思わせる成績がみられる。しかしその後の報告は必ずしも結論が一致せず、SM耐性株の毒力がその感性株に比べて上昇²⁾、不定^{3,4)}、不変^{5,6)}といった雑多な見解が示されている。またPAS⁷⁾(減弱)、TB₁⁸⁾に関しては発表が少なく毒力の変動を結論づけるには未だ不十分である。

現在最も関心を払われているのはINH耐性菌であつて、上述の各耐性菌とは異なり種々の性状の変化が認められている。

INH耐性菌の毒力に関しては Karlson & Ikemi⁹⁾や Goulding (1952)の論文にも触れられているが、この問題が人々の注目を惹くようになったのはMiddlebrook一派の一連の発表により^{11)~15)}、カタラーゼ活性の消失と生体内の毒力との関連を強調した1953年ごろからである。

すでに発表された研究よりおおよその傾向をうかがうと、INH耐性菌の毒力がモルモット皮下接種において低下しているという意見が圧倒的に多い^{16)~25)}。しかし一部には低下傾向を認めても耐性度と毒力低下との平行関係を否定し^{17,27)}、静脈内では感染を起すとし¹²⁾、他の動物特にマウス静脈内接種では毒力が保持されているという報告も多い^{9,14)17,21)26)28)}。また臨床観察において動物と平行する毒力の減弱は認め難く、人体内の状態と結び付けるにはさらに研究を要するとも述べられている²⁹⁾³⁰⁾。

以上のようにINH耐性菌の毒力に関する知見は現在なお明確な結論に到達していない。

しかるに一方その毒力低下を一般的既知の事実とし

て、その上に立つた取扱いを行わんとする傾向が特に諸外国にはあるらしい。

このことはさらに多くの慎重な検討を要する問題であり、ここに実験データを追加することはあながち無駄ではないと思われる。

実験

I 2, 3の患者分離耐性株および試験管内耐性株による毒力試験

1. 方法

イ 供試菌株

試験管内耐性株：本実験に用いたKH 1株(または清H₁株、旧称仲野株)は昭和23年当所において患者喀痰より分離し、爾來標準強毒人型結核菌として繰返し動物攻撃試験に用られたものである。したがつてその毒力は十分に検討せられ、現在1/100mg皮下接種で成熟モルモットを2~3カ月後に斃死せしめうる。この菌株から下記のようにして人為的に耐性株を作製した。

KH1-mS :—保存菌株として毎月1回、1%小川培地により継代してきた感性原株を後述(第2実験の項に詳述)の方法により単個菌から増殖せしめたものである。
KH1-SM 1000 :—KH1-mS(ソートン培養)—(10mg/cc菌液0.1cc)→100γ/cc SM含有キルヒナー培地—(3週後)→1%小川培地—(1mg/cc菌液0.1cc)→1000γ/cc SMキルヒナー培地—(7週後)→1000γ/cc SMキルヒナー培地—(1カ月後)→1%小川培地(以下毎月1回1%小川培地で植継)

KH1-INH-100 :—KH1-mS(ソートン培養)—(10mg/cc菌液0.1cc)→10γ/cc 含有キルヒナー培地—(1カ月後)→1%小川培地—(4週後)→10γ/cc INHキルヒナー培地—(3週後)→100γ/cc INHキルヒナー培地—(1週後)→1%小川培地(以下毎月植継)

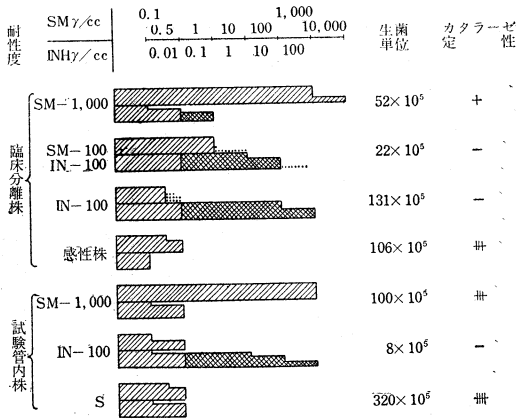
患者喀痰よりの分離株：SM-1000株、SM-100-IN 100株、IN 100株、感性株。

以上4株は全く別個の患者より3%小川培地で分離したもので厳密な意味の毒力比較はできないが、試験管内

株の対照として加えた。

以上の *in vitro*, *in vivo* の耐性株7株を1%小川培地に同時に培養し、4週目の菌苔を集め、磨碎コルベン手振り法でそれぞれの菌液を作り実験に用いた。これら菌液の実験時における耐性度、生菌量、カタラーゼ反応の成績は図1に示す通りである。これら各菌株の耐性度

図1 供試菌株の耐性度(I)



は名称の示すところとやや喰違つている。生菌数はKH 1-IN-100のみ甚だ少なく、カタラーゼ定性反応は用いられたINH耐性菌のすべてに陰性であつた。

□ 実験動物と接種方法

ツメルクリン陰性健康モルモットをおのおの4~5匹の14群に分け、上記7株をそれぞれ脳内、および皮下に接種した。接種菌量は脳内に1mg/cc 0.1cc, 下腹部皮下に0.02mg/cc 0.5ccを用いた。他方健康マウス各10匹ずつに同様脳内、静脈内に注射した。マウスの場合は脳内1mg/cc 0.03cc, 尾静脈内1mg/cc 0.1ccを用いた。モルの脳内接種はほぼSmith Burnの方法に準じ、頰科用錐で穿頭の上、短かい注射針を用い、マウスでは直接短針を刺入した。脳内接種の動物は1日位は食欲も低下するようであるが翌日からは全く元気である。

ハ 観察

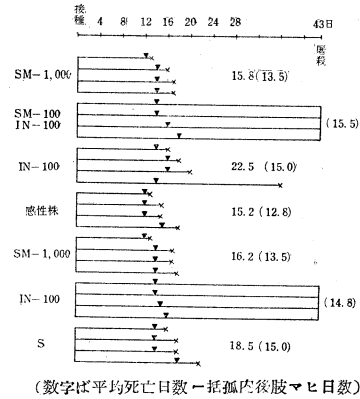
以上の各動物のうち脳内接種群は隔日体重と全身状態を観察し、皮下、静脈内群は隔週とした。かくして死亡動物はその都度、生残り動物は接種後6~7週で屠殺剖検し、肉眼的内景検査、脳、脾、肺の定量培養(小川氏法)を行い、さらに一部動物材料について臓器内結核菌の耐性検査も試みた。

2. 成績

結果を総括的に図示する。

図2Aはモルモット脳内接種群の各動物の後肢麻痺発現時期および死亡に至る期間を線の長さで示したものである。これによると *in vivo* SM 100-IN 100株と *in vitro* IN-100株では全例が6週の観察期間中生存していた。他はおおよそ2~3週で揃つて死亡した。 *in vivo*

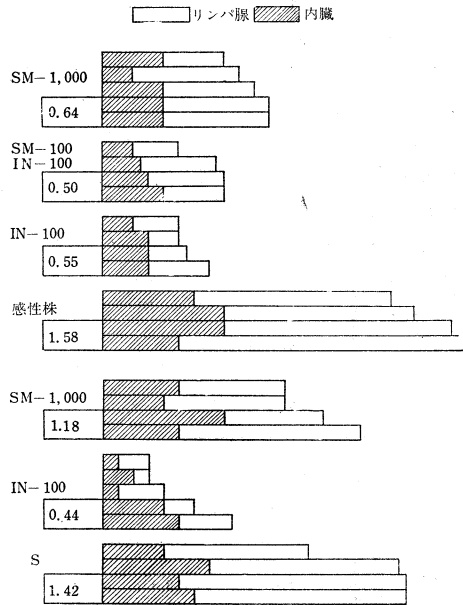
図2A 脳内接種モルモットにおける後肢麻痺発現と死亡に至る日数(I) (×死亡, ▼後肢マヒ)



の IN-100 株の一部は生命を延長している。この表で興味あるのは、死亡しない群でも軽い後肢麻痺がみられ、しかも各群共ほぼ同時期に発現していることである。

図2Bはモルモットの皮下接種群における肉眼的の病変の程度を示すヒストグラムであるが、脳内接種の場合の

図2B 皮下接種モルモットにおける肉眼的の病変の程度と脾重量(I)



生存期間とほぼ逆の関係を示し病変が強くなっている。ただし *in vivo* IN-100が脳内接種で全例死亡しているにもかかわらず、全例生残つた SM 100-IN 100株よりも病変が少ないといった若干の喰違いがある。

次にマウスの脳内接種群には結核死と思われる例がなく、いずれの群も生残つた。また静脈内接種でも肉眼的にはほとんど病変が認められなかつた。

これら各動物の臓器定量培養の成績を一覧表に示すと図3となる。このうちでモルモットの脳内接種群は脳、

図3 臓器定量培養平均集落数(I) (各臓器10mg中)

動物		モルモット					マウス		
接種方法		脳内		皮下			脳内		静脈
臓器		脳	脾	肺	脾	肺	脳	脾	脾
臨床分離株	SM-1000	冊	+	1.4	23	16	1	14	1.5
	SM-100	65	17	0	28	0	0.5	94	44
	IN-100	冊	142	1.3	34	1.6	0	68	19
	感性株	冊	冊	3	冊	130	139	+	106
試験管内株	SM-1000	冊	+	7.2	188	47	67	冊	
	IN-100	32	75	0	0	0	20	21	
	S	冊	冊	2	112	61	0	冊	

脾, 肺の各臓器共, 生残期間と全く一致した生菌数を示している。また皮下接種の場合も肉眼的変化とほぼ平行している。すなわち *in vivo* SM 100-IN 100 と *in vitro* IN-100株では毒力低下が著しい。しかし, これらの菌株にしても全く生菌の発生をみながつたのは脳内, 皮下群共, 肺においてのみであつて, 他の臓器にはかなりの集落が認められた。また *in vivo* IN-100株では臓器培養においても多数の菌が見出された。

マウスは前述のように脳内接種では死亡せず, 静脈内接種でもほとんど病変を作らず, 各群間の差異を認めることができなかつたが, 臓器定量培養には, 各群共結核菌集落を検出しえた。しかし表に示すように, おおよそ一様に菌数が分布し, 各群間の一定の関係は証明されない。特に脳内接種において, 遠隔の脾に各群一様に多数の菌が見出されるのは, マウス体内では各菌株が同程度の生存力を保持していることを示している。

次にこれら定量培養の際の一部材料で再び耐性を直接に測定した(図4)。この検査ではINH耐性菌が全

図4 モルモット脾による直接耐性検査(I)

薬剤濃度 γ /cc	0	S M							I N H			
		0.1	0.5	1.0	10	100	1000	10000	0.1	1	10	100
SM-1000	2		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SM-100	11		9	6	0	0		0	0	0	0	0
IN-100	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
感性株	375	145	0	0	0	0		0	0	0	0	0
SM-1000	119		104	96	110	95	79	0	0	0	0	0
IN-100	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0
S	124	37	0	0	0	0		0	0	0	0	0

く発生せず, 生体内耐性度の変動は知りえなかつたが, *in vitro* SM耐性菌の接種動物内の菌が, 接種前1000 γ (10000 γ まで測定)より10000 γ に耐性となつているのが

注目される。

3. 小括

本実験の成績を通じて次のことがいえる。すなわちSM耐性株は *in vitro*, *in vivo* のいずれで得られたものもその毒力が感性株とほとんど変つていないが, INH耐性株ではモルモットの皮下および脳内接種でかなり著明な毒力の低下が認められる。しかしマウスでは脳内, 静脈内接種の両者共, これらの関係が明らかでなく, むしろ感性株と大差のない成績を示している。以上の所見をさらに検討すると, モルモットの脳内接種においてINH耐性株群の生命延長ないし実験期間中の生残がみられるが, 後肢麻痺の発現は全例に起り, 一応2週前後には発病しているものと考えられる。したがつて菌は各群一様に増殖し, 後になつて弱毒株とみられる菌が漸次消滅してゆくのであろう。このことは Mitchison らの考え方に近い成績である。またモルモット皮下接種でも全体としてINH耐性株の毒力低下が著明であるが, それらの菌株でも内臓にかなりの病変が認められる。さらに臓器の定量培養成績も, これら肉眼的所見とほぼ平行した結果を示している。しかしINH耐性株であつても7週後に脾や肺の遠隔の臓器から少ないながら生菌を検出するのは, この菌株といえどもモルモットに起病力を全く失つているとはいえないであろう。

マウスでは各菌株間の相異は脳内, 静脈内共モルモットの場合よりもさらに不明確である。このことは, モルモットと異なりマウスに接種された非病原性抗酸性菌が, かなり長期に亘つて検出する現象と考え併せると興味深い。(われわれは静注マウスの結核症はモルモットの場合よりも, 特異性が少なく敗血症に近い病状ではないかと考えている。)

臓器内菌の直接耐性検査は使用した臓器の生菌数が少なかつたので, ほとんど結論は述べられないが, *in vitro* SM 1000株が接種前より高い10000 γ にまで完全耐性を示したのは, 少なくともSM耐性株の生体内増殖力が, INH耐性株とは異なり低下していない証拠であろうと思われる。

II *in vitro* の耐性株を純化した場合の毒力

多くの場合, 実験に供される結核菌菌株は菌集落をそのまま塗擦または菌液として流入して継代培養したものであるから, そのうちには一部感性菌も混入しているかもしれない。

したがつて, これらの菌株から1個の菌体を取り出し, これを増殖せしめた菌株を用いて再度モルモットに対する毒力を検査した。

1. 実験方法

イ 単個菌よりの菌株の作製

以前の試験³¹⁾に用いた特殊の凹窩硝子の凹窩の縁を一部欠き鈎菌口をつけた。この蓋硝子下面にキルヒナー寒

天の薄層を貼布し、結核菌菌液を懸滴し、油浸下に単個菌を探し 37°C にて、2~4個に増殖せしめる。この菌は弱拡大下でもみうるの、顕微鏡の十字動装置を改造した簡易な器具に尖端を磨いた白金線を取りつけたもので鉤菌する。この場合、他の菌に全く触れずに鉤菌されたことを操作前後の写真撮影により記録した。このようにして白金線の尖端に附着せしめた菌はキルヒナー液状培地中で洗い落され、さらに培養する。この方法によれば感性菌、SM耐性菌で5回位に1度、INH耐性菌で10~15回に1度、ケシ粒のような菌集落の発育がみられる。

供試菌株

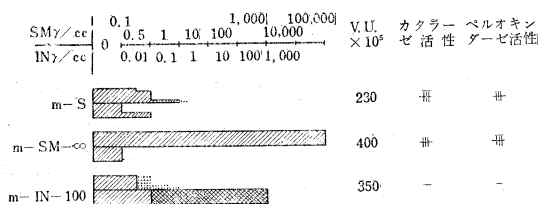
KH1-m-S :—これは第1実験にすでに使用しているが、感性原株を上記の方法で純化し小川培地に継代保存しているもの。

KH1-m-SM ∞ :—第1実験に使用した in vitro SM-1000株 (KH1-m-S より前記のように作った人為的SM耐性株)を純化したものであるが、偶然にSM 100000 γ に完全耐性を示す菌が得られたので特にSM- ∞ と名付けた。この濃度は現行の方法で測定しうる最高の濃度で、これ以上になると培地が変質し、測定できない。

KH1-m-IN-100 :—これも前述の実験に使用した in vitro IN-100株を純化したもので、図1の耐性度と異なり、INH 100 γ に完全耐性を示した。

以上の3菌株の耐性度、使用時の生菌単位、カタラーゼ活性、ペルオキシダーゼ活性を図5に示す。カタラー

図5 供試菌株の耐性度(II)



ぜ、ペルオキシダーゼ共、INH耐性菌にのみ全く消失し、感性菌とSM耐性菌はほぼ同程度の反応を示した。

動物および接種方法ならびに観察

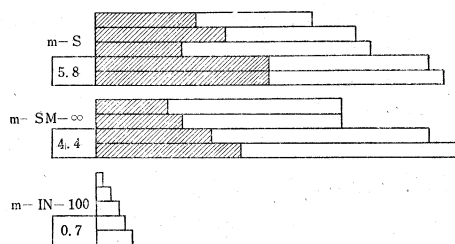
健康モルモット各5匹の3群の皮下にm-S 0.02mg/cc 0.5cc, m-SM ∞ 0.02mg/cc 0.5cc, m-IN-100 0.2mg/cc 0.5cc ずつ接種した。INH耐性株のみ菌量を多くしたのは、第1実験において、本菌株の生菌量が少なかつたためであるが、後に判明した生菌単位は図5のように、他の菌株と大差なく、結果的に10倍も多く接種した事になった。

かくして型通り毎週観察後8週にて屠殺剖検し、肉眼的病変と臓器内生菌分布を検査し一部臓器はその中の菌の耐性検査および病変の組織学的検査を行った。

2. 成績

図6は肉眼的病変のヒストグラムである。INH耐性

図6 皮下接種モルモットの肉眼的病変と脾重量(平均) (II)

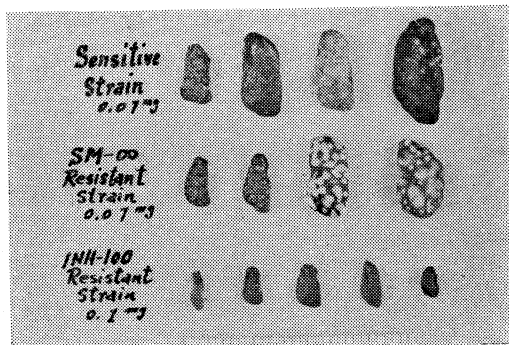


株は大量の菌を接種したにかかわらずほとんど進行性病変を認めず、SM耐性株はこのように高度の耐性であっても感性株と大差はない。しいて言えばSM耐性の方が感性株よりも幾分変化が軽度である。この関係は附図1の脾の変化にも明瞭であるし、臓器定量培養の成績(図7)や組織学的検査の像よりも認められる。すなわち臓

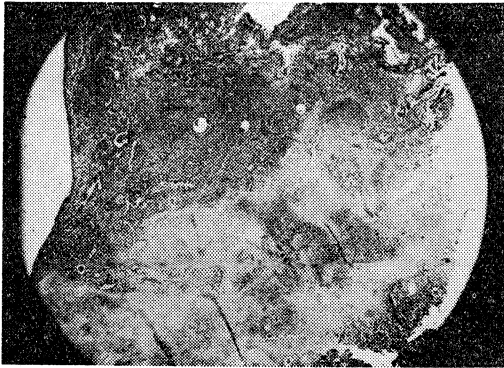
図7 臓器定量培養成績(II)

菌株	動物番号	臓器		臓器	
		肝	肝	肺	肺
		-1	-2	-1	-2
m-S	1	+++	+++	+++	+++
	2		67		137
	3	+++	++	+++	+++
	4	+++	+++	+++	+++
	5		5		400
m-SM ∞	7	163	21	23	3
	8	165	22	+++	++
	9	22	2	17	4
	10	39	5	++	65
m-IN-100	11	0	0	0	0
	12	0.5	0	0	0
	13	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
	15	0	0	0	0

附図1 モルモット脾の肉眼的変化(II)



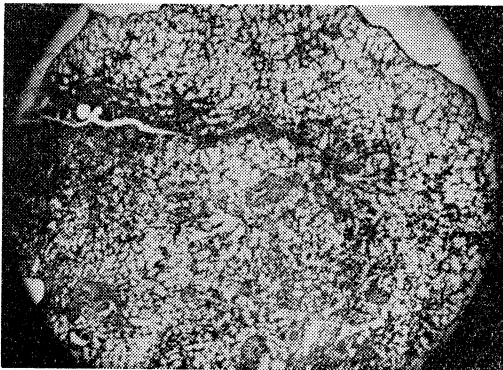
附図2 モルモット肺病変の組織像(II)
KH1-mS 0.01mg



KH1-m-SM ∞ 0.01mg



KH1-m-IN-100 0.1mg



器内菌の分布ではやはり m-IN-100株からはほとんど菌集落が検出されず、m-SM ∞ 株はm-S株よりもかなり菌が少ない。また組織検査(附図2)でも m-IN-100株接種動物の肺脾肝はほとんど特別な変化なく、一部の肺に非定型的で微小な上皮様細胞の集合がみられたのみであった。これに反し、m-S株の肺は広汎な壊死ないし軟化を伴う上皮様細胞の瀰漫性浸潤を示し、肝では特にグリソソ鞘の壊死を伴う円形および上皮様細胞の浸潤がみられる。脾もほとんど健康部が認められない位強い変化を起している。m-SM ∞ もm-Sと似ているが、全般的にこ

れより軽度で壊死を伴わない結節も多くみられる。

3. 小括

強毒人型結核菌KH1株の感性原株を単個菌より発育せしめたKH1-mS株をそれぞれ試験管内でSM 100000 γ 、INH 100 γ に完全耐性とし、それらをさらに単個菌とし、KH1-m-SM ∞ 株、KH1-IN-100株を作製した。これら3株の純化株をモルモットに接種し、毒力を検討した。

その結果、単個菌化する以前の菌株における実験よりもさらに各菌株間の差が明瞭に表われた。すなわちSM耐性株は感性原株とはほぼ同程度か、やや弱い病変を示し、INH耐性株はほとんど変化を示さなかつた。

結 語

本実験は特定のKH1なる強毒人型結核菌株を中心に掘下げたものであつて、この成績がすべての結核菌に当てはまるとは即断できないが、2,3の興味ある所見を示している。

SMの甚しい高度耐性菌を作つても、そのモルモットに対する毒力は、原感性株と大差なく、幾分か低下している程度である。これに反しINH耐性菌は少なくともモルモット皮下、脳内のいずれの経路でもかなり著明な毒力の減弱を示している。しかし脳内と皮下では多少喰違つた成績がみられ、また脳内接種では死ぬか、生き残るかといった比較の大きな差となつて表現され、毒力の細い差は現われ難いように思われる。しかも後肢麻痺はいわゆる弱毒菌も含むいずれの群にもみられるので、これら弱毒菌も初めは増殖して障害を示し、後治癒に向うのではないかと思われる。

マウスでは脳内、静脈内共モルモットにおけるような明らかな差はみられず、各群ともほぼ同様に多数の菌を臓器より検出している。しかし、他の抗酸性雑菌の接種で肉眼的病変を示さない場合にも、マウス体内で菌の増殖する傾向が認められているので、抗酸性菌の毒力の定義が確立されていない今日、マウス体内よりの菌の検出をもつて、マウスの毒力を論ずることは困難であろう。

これらのKH1株の原感性株とそれよりのSMおよびINH耐性株を簡単なミクルギーで単個菌より増殖せしめたものについて、さらにモルモットの感染実験を行った。このような操作は耐性株の純化を目的とするものであるが、back mutationを考慮するならば、単個菌といえども増殖せしめて後、実験に供せざるをえない以上、全く純粋とはいえないであろう。しかし、mutationの頻度が小さいとするならば2つの実験に示された供試菌株の耐性度の比較からも知られるように、菌集合体を継代してきたものよりも遙かに純粋と考えられる。

かかる菌株を用いた場合は、モルモットの皮下接種において、さらに大きな差異が認められ、INHの高度耐性株ではほとんど肉眼的病変を示さず病原性を失つてい

るとさえ思われる。このことは臓器培養，組織検査によつても確かめられる。この菌株はカタラーゼ，ペルオキシダーゼ活性の両者共全く失われている。

（いずれにしても，このような強毒菌が，INH耐性化によつて，極端に毒力を減弱し，ほとんど無毒にさえなる場合があることは最低限度事実であり，このような状態が人体内でも起りうるとは考えられても，実際には全部の菌が純粋に耐性菌のみになることは望み難いであろうし，また他のすべての菌株でも耐性化と，毒力の減弱その他の現象が併行しうるかどうかは今後の検討に俟たねばならない。

また，これら純化株は現在もお継代中であり，耐性度や毒力の安定性についても考究さるべきであると考えられる。

本実験は当室吉川君の絶大なる援助によつてなされた。また組織学的検査には岩崎研究部長の懇篤なる御教示を仰いだ。ここに深甚なる謝意を表する。

（本論文の要旨は昭和31年第31回日本結核病学会総会に発表した。）

主要文献

- 1) Steenken, Jr. et al. : Amer. Rev. Tbc., 58 : 2, 353, 1948.
- 2) Bonanno, G. et al. : Riv. Sicil. della Tbc. 7 : 2, 51, 1953.
- 3) 村田 : 結核, 29 : 14, 1953.
- 4) 橋本他 : 医学と生物学, 31 : 115, 1954.
橋本他 : 結核, 29 : 383, 1954.
- 5) 小酒井他 : 医学と生物学, 19 : 93, 1951.
- 6) Kröger, E. et al. : Beitr. Klin. Tbk., 109 : 5, 403, 1953.
- 7) Nitti, V. et al. : Arch. di Tisiol., 7 : 12, 974, 1952.
- 8) 金井 : 医学と生物学, 35 : 36, 1955.
- 9) Karlson, A.G. et al. : Proc. Staff. Meet. Mayo Clin., 27 : 19, 373, 1952.
- 10) Goulding, R. et al. : Lancet. CCLXIII. 6724, 69, 1952.
- 11) Middlebrook, G. : Science, 118 : 297, 1953.
- 12) Middlebrook, G. : Amer. Rev. Tbc., 69 : 3, 471, 1954.
- 13) Cohn, M.L. et al. : Amer. Rev. Tbc., 70 : 3, 465, 1954.
- 14) Cohn, M.L. et al. : Amer. Rev. Tbc., 70 : 4, 641, 1954.
- 15) Middlebrook, G. : Amer. Rev. Tbc., 70 : 5, 852, 1954.
- 16) 平野他 : 東京医事新誌, 70 : 7, 19, 1955.
- 17) Steenken, Jr. W. et al. : Amer. Rev. Tbc., 68 : 4, 548, 1953.
- 18) Barry, V.C. et al. : Lancet, CCLXIV, 978, 1953.
- 19) Karlson, A.G. et al. : Proc. Staff. Meet. Mayo Clin., 29 : 119, 1954.
- 20) Karlson, A.G. et al. : Amer. Rev. Tbc., 70 : 3, 531, 1954.
- 21) Morse, W.C. et al. : Amer. Rev. Tbc., 69 : 3, 464, 1954.
- 22) Peizer, L.R. et al. : Amer. Rev. Tbc., 70 : 4, 728, 1954.
- 23) Mitchison, D.A. : Brit. med. J., 4854, 128, 1954.
- 24) Meissner, G. : Beitr. Klin. Tbk., 110 : 6, 538, 1954.
- 25) Meissner, G. : Disease of Chest, 26 : 1, 15, 1954.
- 26) 佐藤 : 医学と生物学, 29 : 1, 14, 1953.
- 27) Hinshaw, H.C. : Transaction of the 12 th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration, 117, 1953.
- 28) Broch H. et al. : Amer. Rev. Tbc., 68 : 5, 734, 1953.
- 29) Transaction of the 12 th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration, 117, 1953.
- 30) Transaction of the 13 th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration, 161, 1954.
- 31) 工藤 : Acta Scand. Tbc., 32 : 1, 74, 1956.