

人型結核菌INAH耐性株の population 構成に関する定量的分析

三浦幸二・林光男・野田用

安保孝・鳥居太

国立療養所大府荘 (指導 荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 32 年 5 月 6 日

Isonicotinic acid hydrazide (以下 INAH) 耐性復帰を認める説^{1)2)4)~6)}と認めぬ説³⁾がある。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観察し、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 に大きな変動があったといっている。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行くのを認めた。

われわれは、従来臨床的に INAH 耐性菌の耐性復帰を認めたことについては、次のような可能性を考えている。

第 1 に、Routine method で、接種生菌数が考慮に入れられなかつたため、喀痰中耐性結核菌の分布が同一でも、接種生菌数が減少したため、耐性菌もそれに比例して減少したことが考えられる。この点については、当研究室東村¹⁰⁾は、喀痰原液の接種で、INAH 1mcg 以上に集落融合の発育を示したものは、12例あつたが、そのうち 4 例では、稀釈液接種の際に、前に集落融合を示すような発育を示した濃度にも菌の発育を認めぬよになつたと報告した。

第 2 に INAH 10mcg 耐性菌または INAH 100mcg 耐性菌の viability duration の減少のためにおこることが考えられる。三浦¹¹⁾は、1%小川培地を使用し、人型結核菌青山 B 株の感性株、INAH 10mcg 耐性株、INAH 100mcg 耐性株、streptomycin (以下 SM) 100mcg 耐性株および one step selection による INAH 1mcg 耐性株の 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、生菌数の減少の傾向を認めたが、有意の差を認めることはできなかった。なお¹²⁾感性株、INAH 10mcg 耐性株および INAH 100mcg 耐性株は 48 日より 77 日までにおいて、生菌数はほとんど変らぬと報告した。

第 3 に感性菌と INAH 耐性菌、または INAH 10mcg 耐性菌と INAH 100mcg 耐性菌との間において、generation

time に相違があり、すなわち INAH 耐性菌の発育速度が感性菌とかなり相違し、感性菌が耐性菌より、良く発育するため耐性復帰がおこるのか、または例えば INAH 100mcg 耐性菌よりも INAH 10mcg 耐性菌の発育速度が速く、INAH 10mcg 耐性菌の方がよく発育するために耐性復帰がおこることを考えた。この点については、林、三浦¹³⁾は、1%小川培地にて、Youman の方法により、青山 B 株、INAH 10mcg 耐性株、INAH 100mcg 耐性株の generation time を測定したが、3 者の間に著差を認めなかつた。

第 4 に、INAH 耐性菌が、本来の性質として不安定性のために、population を構成する一部の個々の菌の耐性度が低下したところで判定したために耐性復帰と認めたことが考えられる。三浦¹⁴⁾は、INAH 10mcg 耐性株を 8 代、INAH 100mcg 耐性株を 4 代継代しても、population 構成は変らなかつたが、生菌数に対する耐性菌数の百分率が動揺を示した。これは INAH 耐性菌が、本来の性質として不均一であるためと報告した。生菌数に対する耐性菌数の百分率が動揺を示したことは、population を構成する一部の菌の耐性度に低下が起るが population としての耐性度は低下しないと考えた。このような現象がおこるのは遺伝学的条件のみならず、他の種々の条件の入っていることを考慮せねばならぬと報告した。また三浦、林¹⁵⁾は、臨床的には、INAH 耐性が不安定であることを認めた。

Demerec¹⁶⁾は、E. coli および Staphyl. aureus における SM 耐性系について分析を行つた結果、SM 耐性には数個の遺伝子が関与しており、かつそれらの遺伝子の potency が互に異なつているという考えを述べた。東村、三浦¹⁷⁾は、人型結核菌青山 B 株の one step selection で得られた集落の population 構成分析と、継代選択によつて得られた耐性株の population 構成の分析の結果から、SM 耐性に関与する遺伝子には potency が高く比較的安定な遺伝子と、potency が低くて比較的安定な遺伝子との 2 種があるが、INAH 耐性に関与する遺伝子には比較的安定な遺伝子のみが認められると報告した。しかし、ナス型コルベンにて調製した均等菌浮游液使用による方法では、one step selection で INAH 100mcg 耐性菌は得られないので検査することはできなかった。

われわれは、このような遺伝学的立場から、結核菌の遺伝構造について検討を加える目的で本研究を行った。

実験材料

使用菌株：われわれ研究室東村が青山B株より分離したSM 100mcg 耐性株，PAS 100mcg 耐性株，INAH 10mcg 耐性株，INAH 100mcg 耐性株で、各菌株とも、それぞれの薬剤を含有する培地に10代以上継代培養されたものである。上記菌株のほか、三浦が分離したINAH 500mcg 耐性株を使用した。

使用培地：1%小川(辰次)培地を使用した。その組成は、第1リン酸カリ 1.0g，グルタミン酸ソーダ 1.0g，蒸溜水 100mlを基液となし、これに卵液 200ml，グリセリン 6.0ml，2%マラレット緑 6.0mlを加え、各中試験管に10ml 分注，85°C 1時間凝固滅菌した。なお凝固滅菌に先立ち、薬剤が、その所定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1/2として、所要濃度の倍量に加えられた。

使用薬剤：INAHは Isonicotinic acid hydrazide で武田製薬会社製，PASは Sodium paraaminosalicylate で田辺製薬会社製，SMはDihydrostreptomycin sulfate で協和醗酵株式会社製であった。

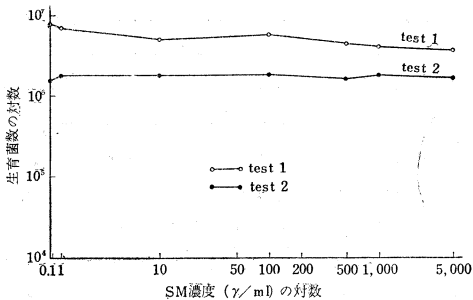
実験方法

保存せる菌株をナス型コルベンにてガラス玉とともに10分間振盪，生理的食塩水にて懸濁し，10進法により $10^0 \sim 10^{-7}$ に稀釈し，各所定の薬剤濃度を含有する培地系列に等量ずつ接種した。薬剤濃度により接種菌液濃度を調節した。1系列の試験管数はおのおの10本で，接種後37°C で培養し，6週後に生残菌の数を算定し，そして生残菌の出現率を各濃度ごとに表示して，Survival curves を作った。横座標は培地含有薬剤濃度の対数とし，縦座標は生残菌数の対数とした。

実験成績

1) SM 100mcg耐性株のSMに対する survival curvesは(図1参照)，5000mcgに到るまで，test 1, 2ともに，横座標にほぼ平行であった。すなわちSM 100mcg

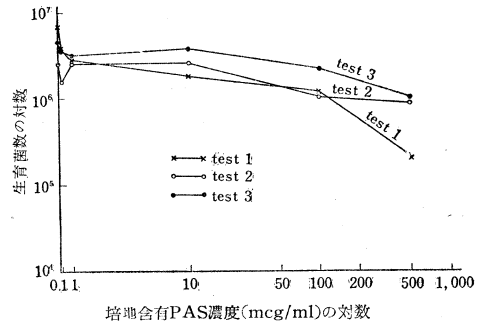
図1 SM100mcg耐性株のSMに対するSurvival curves



耐性株の population 構成は均一であった。われわれは，population構成が均一であるということは，耐性培地における生育菌数が，薬剤を含みぬ対照培地の生育菌数の100%であることをいい，survival curvesでは，横座標に平行するという意味に解釈している。

2) しかるに，PAS 100mcg 耐性株のPASに対する survival curvesは(図2参照)，10mcg，100mcg，

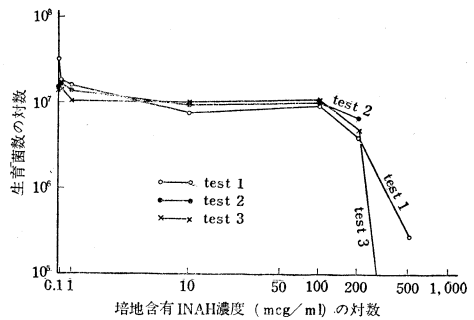
図2 PAS 100mcg耐性株のPASに対する Survival curves



500mcgと薬剤濃度の増加につれ curvesの下降を認め，不均一であった。

3) 薬剤を含有しない培地に継代した INAH 100mcg 耐性株のINAHに対する survival curves(図3参照)は，

図3 薬剤を含有しない培地に継代した INAH 100mcg 耐性株の Survival curves



100mcgまでは test 2, 3においては，ほぼ横座標に平行であったが，test 1では薬剤濃度を増すにつれ下降を示した。なお100mcgを越すと test 1, 3ともに急激な下降を示した。

4) INAHを含有する培地に継代した INAH 100mcg 耐性株のINAHに対する survival curves(図4参照)は，test 2においては，100mcgまでは，ほぼ横座標に平行であったが，test 1, 3においては，1mcgまではむしろ上昇し，その後100mcgまでは test 1では横座標に平行であり，test 3では薬剤濃度を増すにつれ下降を示した。

5) INAHを含有する培地に継代したINAH 10mcg耐性株のINAHに対する survival curves(図5参照)は，

図4 INAH 100mcg含有培地にのみ継代した INAH 100mcg 耐性株の Survival curves

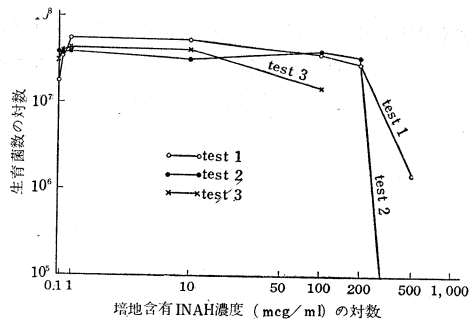
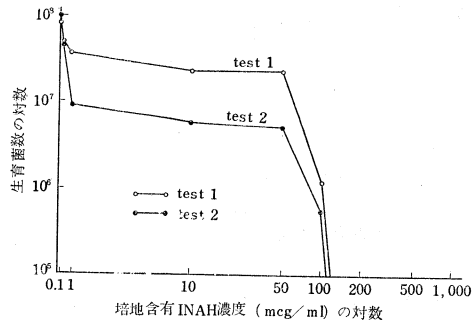


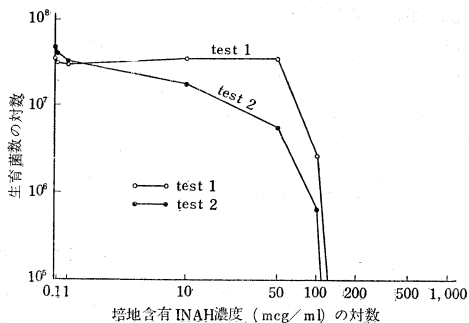
図5 INAH を含有する培地に継代した INAH 10mcg 耐性株の Survival curves



1mcg までは急激に下降し、その後50mcg までは徐々に下降、50mcg を越すとさらに急激な下降を示した。

6) INAH を含有しない培地に継代した INAH 10mcg 耐性株の INAH に対する survival curves (図6 参照)は、

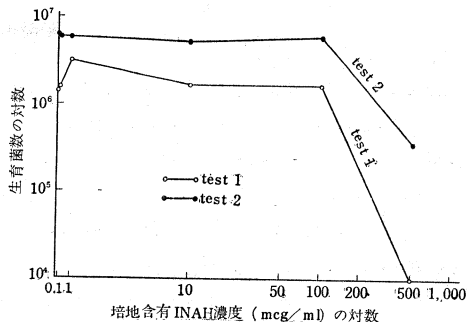
図6 INAH を含有しない培地に継代した INAH 10mcg 耐性株の Survival curves



test 1 では、50mcg までは、ほぼ横座標に平行し、test 2 では薬剤濃度増加につれ下降を示し、50mcg を越した後は、test 1, 2 ともに急激な下降を示した。すなわち INAH 10mcg 耐性株の population 構成は不均一と思われる。

7) INAH 500mcg 耐性株については、薬剤を含有しない培地に継代した菌株の INAH に対する survival curves (図7 参照)は、test 1, 2 ともに100mcg までは横座標にほぼ平行であったが、100mcg を越した後は急激

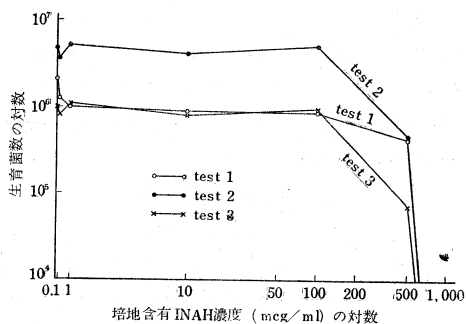
図7 薬剤を含有しない培地に継代した場合の INAH 500mcg 耐性株の Survival curves



な下降を示した。

8) また薬剤を含有する培地に継代した INAH 500mcg 耐性株の INAH に対する survival curves (図8 参照)

図8 薬剤を含有する培地に継代した INAH 500mcg 耐性株の Survival curves



は、test 1, 2, 3 ともに 100mcg まではほぼ横座標に平行であったが、INAH 100mcg を越した後は、test 1 を除き急激な下降を示し、特に500mcg を越した場合 test 1, 3 ともに、ほぼ垂直な下降を示した。すなわち INAH 500mcg 耐性株の population 構成は、INAH 100mcg までは横座標にほぼ平行で均一であるが、INAH 500mcg の点を取った場合、survival curves は急激な下降を示した。INAH 500mcg 耐性株も不均一と思われる。

考 察

SM 100mcg 耐性株の SM に対する survival curves は、図1に示すごとく SM 5000mcg/ml に到るまで横座標にほとんど平行であった。これは、Demeree¹⁶⁾が、E. coli および Staphyl. aureus において SM 耐性は均一であったと報告し、また東村、三浦¹⁷⁾が、青山B株より分離せる SM 100mcg 耐性株について、SM 100mcg 耐性株の population 構成を均一であると報告し、なお東村、河西は臨床的にも SM 耐性が均一であることを報告しているが、この成績¹⁹⁾と一致している。

PAS 100mcg 耐性株の population 構成については、東村ら^{17)~20)}は、PAS 耐性株の population 構成は不

均一であると報告しているが、本実験においては、追試再確認し、INAH耐性株の survival curves の対照とした。

東村ら^{17)~20)}は、試験管内においても、また臨床的にも、SM耐性は比較的均一であつたが、PAS耐性およびINAH耐性は不均一であつたと報告した。なお三浦¹⁴⁾は、INAH 10mcg耐性株およびINAH 100mcg耐性株を継代培養し、INAH耐性株の population 構成は不均一であつたと報告した。そして、東村、三浦¹⁷⁾は、これら3者を比較して、PAS耐性株の耐性度についての population 構成は最も不均一で、INAH耐性株のそれは、それについて不均一で、SM耐性株のそれは均一であると報告した。本研究においては、INAH耐性をさらに詳細に定量的分析を行つた。

すなわち、薬剤を含有しない培地に継代した場合(図3参照)ならびに薬剤を含有する培地に継代した場合(図4参照)ともに、INAH 100mcg耐性株の population 構成は均一と思われる場合も、また不均一と思われる場合もあり、結局やや不安定であり、その population 構成の度合は、SM 100mcg耐性株の均一性と、PAS 100mcg耐性株の不均一性の中間に位し、特にSM耐性株の均一性に近いものと思われる。

INAH 10mcg耐性株については、薬剤を含有する培地に継代した場合(図5参照)には、INAH低耐性すなわちINAH 0.1mcg, INAH 1mcgで、すでに急激な下降をみとめた。これは、INAH 10mcg耐性株の低耐性が不均一であることを示している。また薬剤を含有しない培地に継代した場合は(図6参照)、test 1では50mcgまでは横座標にほとんど平行であつたが、test 2では薬剤濃度の増加につれ survival curves は下降を示し、test 1, 2ともに50mcgを越すと急激な下降を示した。すなわちINAH 10mcg耐性株は、均一性の度合よりみれば、INAH 100mcg耐性株に比べると不均一と思われる。

INAH 500mcg耐性株については、薬剤を含有しない培地に継代した場合(図7参照)、薬剤を含有する培地に継代した場合(図8参照)ともに、INAH 100mcg/mlまでは横座標にほぼ平行であり、100mcgを越した後は急激な下降を示した。このことは、INAH 500mcg耐性株の population 構成は、INAH 100mcgまでは比較的均一であるが、INAH 500mcg/mlでは survival curves が急激な下降を示し、INAH 500mcg耐性度では不均一と思われる。

Demerec¹⁴⁾は、E. coli および Staphyl. aureus におけるSM耐性には、数個の遺伝子が関与しており、かつそれらの遺伝子は互に potency が異なつていと報告しているが、上述せる如く、INAH 10mcg耐性株は population 構成が不均一であり、INAH 100mcg耐性株の population 構成は比較的均一であることは、耐性に

遺伝子が関与すると仮定すれば、INAH 10mcg耐性に関与する遺伝子は不安定であり、INAH 100mcg耐性に関与する遺伝子は比較的安定と考えられ、少なくともINAH耐性に関与する遺伝子には不安定なもの、比較的安定なものとの2種類が存在すると考えうる。なおINAH 500mcg耐性株の population 構成については、本実験においては、INAH 100mcgまでは比較的均一であつたが、INAH 500mcg耐性度では不均一であつたが、INAH 500mcg耐性株の population 構成の均一の度合は、本実験の成績のみにては結論を下すことはできぬので、現在引続き検討中である。

結 論

- 1) INAH 10mcg耐性株は、INAH 10mcgで selection を繰り返しても、また薬剤を含有しない培地に継代しても、population構成は不均一であつた。
- 2) INAH 100mcg耐性株は、INAH 100mcgで selection を繰り返しても、また薬剤を含有しない培地に継代しても、population構成は比較的均一であつた。
- 3) INAH 500mcg耐性株は、INAH 500mcgで selection を繰り返しても、また薬剤を含有しない培地に継代しても、population構成はINAH 500mcg耐性度については不均一であつたが、INAH 100mcg耐性度については比較的均一であつた。
- 4) INAH耐性に遺伝子が関与すると仮定すれば、INAH 10mcg耐性に関与する遺伝子と、INAH 100mcgに関与する遺伝子とは別個の性質のものと思われた。

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ならびに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。また御助言を賜つた大府荘東村道雄博士、君野徹三博士に感謝します。本研究を行うに当り御協力を賜つた大府荘研究室各位に感謝します。

参考文献

- 1) Pansy, F., Stander, H. & Donovick, 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: 日本臨牀結核, 14: 501~511, 1955.
- 5) 上島・橋本・石田・八坂: 日本臨牀結核, 14: 501~511, 1955.
- 6) 石川他: 結核, 30: 188~189, 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) 東村・河西: *Chemotherapy*, 4(4): 227~231, 1956.
- 11) 三浦: *結核*, 31 (11): 647~650, 1956.
- 12) 三浦: *医学と生物学*, 40(6): 214~217, 1956.
- 13) 林・三浦: 人型結核菌INH耐性菌のgeneration time及び耐性復帰について, 第11回日本結核病学会東海地方学会発表.
- 14) 三浦: *結核*, 31 (10): 616~620, 1956.
- 15) 三浦・林: *J. Antibiotics, Ser. B*, 9(6): 294~296, 1956.
- 16) Demerec, M.: *J. Bact.*, 56: 63~74, 1948.
- 17) 東村・三浦: *Annual Report of the Japanese Association for Tuberculosis*, 2: 1~5, 1957.
- 18) 東村・三浦・畔柳・野田・安保: *J. Antibiotics, Ser. B*, 9(2): 72~76, 1956.
- 19) 東村・河西: *Chemotherapy*, 4(4): 232~235, 1956.
- 20) 東村: *医学と生物学*, 38 (1): 11~14, 1956.
- 21) 東村・三浦: *Chemotherapy*, 4(5): 248~251, 1956.