

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2篇 薬剤耐性KH1株の油包死菌，ツベルクリンおよび流動パラフィン抽出物について

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6月2日

緒 言

前報¹⁾において標準強毒人型菌KH1株を中心として薬剤耐性菌の毒力を検討したが、今回はさらに、これら耐性株より油包死菌，ツベルクリン，流動パラフィンエキストラクトを作り，それぞれの相互関係をモルモットにおける皮膚反応や免疫効果の点から観察した。

薬剤耐性菌より作られた油包死菌の抗原性については，すでに平野が人型結核菌²⁾，BCG³⁾を用いて，SM耐性化株がその原株よりも抗原性が強いようであると述べているが，INH耐性株についてのこのような研究は，これまでほとんど見当たらない。しかし生菌の場合は弱毒化していても，BCGに匹敵する免疫原性を保持している⁴⁾との報告がある。薬剤耐性結核菌より作られたツベルクリンに関しては，各種耐性菌株ツベルクリンの成分や力価比較⁵⁾とかSM耐性菌保有動物ないし患者に対するSM耐性菌ツベルクリン反応の特異性についての報告⁶⁾が散見されるが，これらの点に関してもなお十分な検討が必要であろう。

薬剤耐性結核菌の免疫学的な研究は未だ甚だ乏しく，もしこの方面から，これら耐性菌の特異性が証明されるならば，その益するところは計り知れないものがあると思われる。

実 験

I 耐性株の油包死菌によるツベルクリンアレルギーならびに病変阻止能

1. 供試菌株と油包死菌の作製

前報第1実験に述べた試験管内耐性化株KH1-SM-1000 (Aとす) KH1-IN-100 (Bとす) および感性原株KH1-m-S (Cとす) の3株を用いた。これらは毎月1回1%小川培地に継代保存された。各菌株は外見上，発育の程度や集落の性状に全く差異はなかつた。供試菌株の実験直前における耐性度は図1の通りで，AはSM 10000 γ に完全，BはINH 100 γ に不完全耐性を示し，Cは感性である。これらの各菌株は3~4本の培地より

図1 供試菌株の耐性度(I)

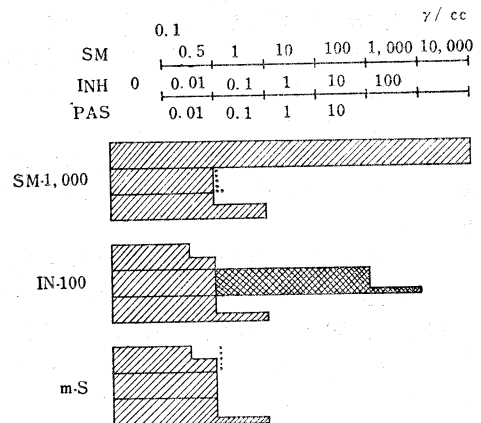


表1 前処置および感染菌株の組合せ 各群動物数

感 染 (生染)	前処置 (死置)			無処置
	KH1 SM-1000	KH1 IN-100	KH1 m-S	
KH1-SM-1000	8		8	4
KH1-IN-100		8	8	4
KH1-m-S	7	7	7	4
	15	15	23	12

播取られ，デシケータ中で陰圧下に3日間乾燥された後，正確に秤量された。この際の湿菌重量に対する乾燥菌量はそれぞれAが27.2%，Bが28%，Cは27.6%で三者間に大差はない。すなわちこれらの菌苔の間に乾湿の差はないものと考えられる。

おのおの乾燥菌体はメノールの乳鉢で十分磨砕され，1cc当り10mgとなるよう局方流動パラフィンに浮遊させ，100°C 30分加熱した。

この油包死菌液は接種前十分に振盪した。

2. 動物，接種方法ならびに観察

健康モルモットを16，16，24匹の3群に分け（雌雄半分ずつ），それぞれA，B，Cの死菌液を0.1ccずつ左下腹部皮下へ接種した。その後隔週に10倍旧ツベルクリン液で皮内反応を測定した。8週後無処置対照3群を加え，

表1のような組合せでA, B, Cの各生菌液 0.02mg/c 0.5ccずつを右下腹部皮下に感染せしめた。(この攻撃用菌液の生菌単位は A: 26×10^6 , B: 2×10^6 , C: 15×10^6 であった。)その後さらに6週を経て、全動物は屠殺せられ、内景観察および肝脾の定量培養を行った。

3. 成績

油包死菌前処置後の旧ツベルクリンによる硬結経の24時間測定値平均を逐週グラフに示すと図2のようになる。すなわち3菌株の死菌によって惹起されるツ・アレ

図2 油包死菌接種動物におけるツベルクリン反応

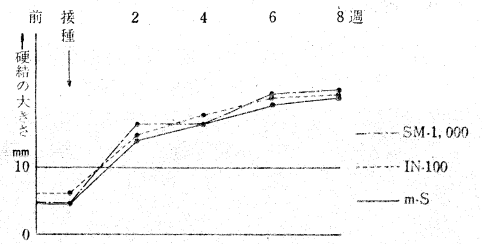


図3 油包死菌接種動物における局処変化の大きさと所属リンパ腺の腫脹

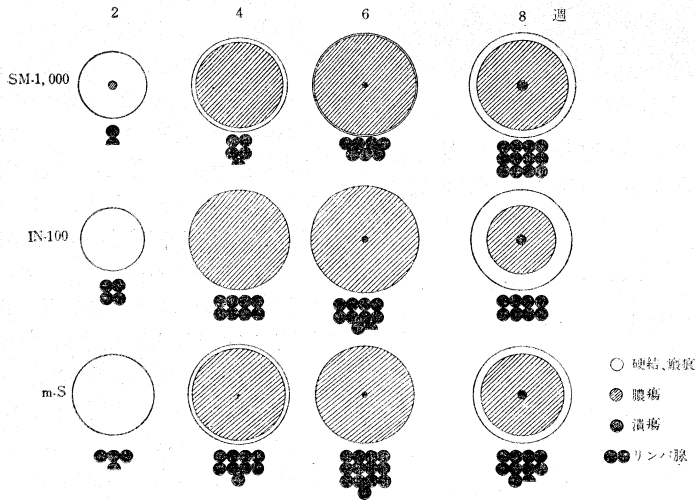
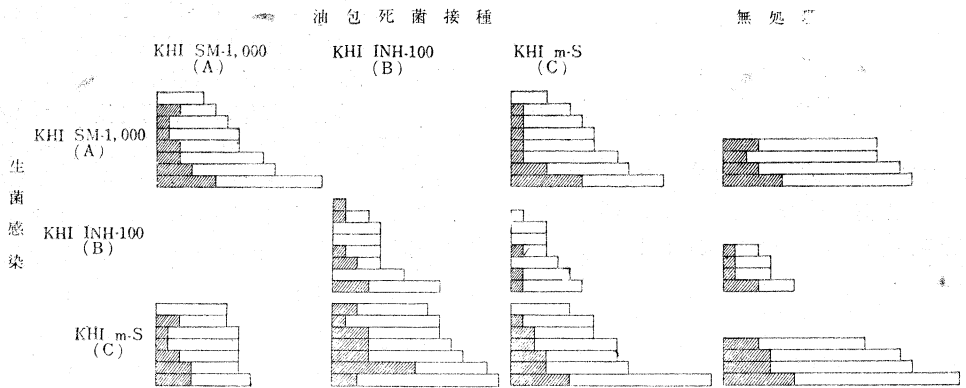


図4 油包死菌接種による生菌感染の防禦



ルギーには著明な差がないものと思われる。各菌株の接種動物は2週後には陽転し、観察期間中幾分上昇している。図3は各群内動物の死菌接種局処における変化と所属リンパ腺の腫脹の状態を相対的な大きさの比較図としたものであるが、やはり三者間に大差がない。前処置後8週で生菌攻撃、さらに6週後剖検した際の肉眼的内景変化をヒストグラムに示すと図4のようになる。A処置、C処置および無処置でAを感染せしめた3群を比較すると、A、C処置の病変阻止能はほぼ同程度で、特異

的にA処置がA感染を強く防禦するという事は証明されない。B、C処置に対するB感染の場合も同様のことがいえると思われるが、Bの病原性そのものが弱いのので、これらの関係は明らかでない。

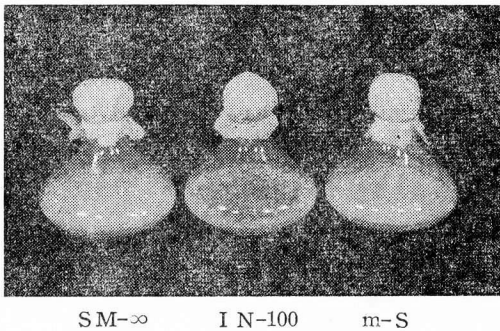
C感染に対するA、B、C各菌株の前処置の間には幾分か差が認められる。すなわちB前処置群の病変阻止効果がA、C前処置の場合に比べ劣っている。

このような関係は肝、脾の定量培養成績にも平行してみられるが、やはりB感染群は無処置でも菌を証明しえ

成績に加えられなかつた。

II 耐性菌のツベルクリンおよびパラフィン抽出物による皮膚反応

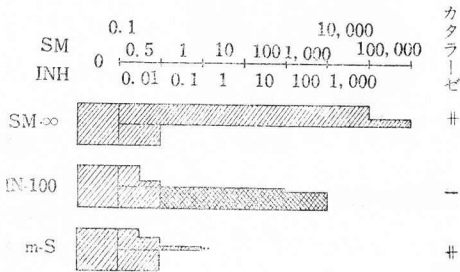
写真1 ソートン培地上の発育



1. 供試菌株とツベルクリンおよびパラフィン抽出物

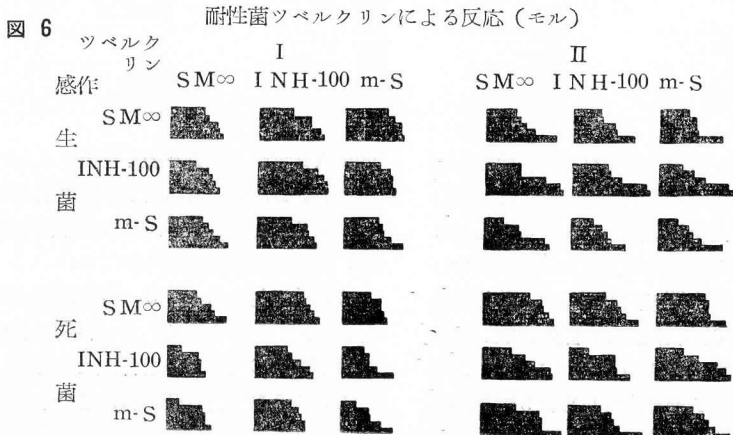
I 実験とほぼ同じであるが、SM耐性およびINH耐性のKH1株はその後ミクルルギーにより、単個菌株より増殖せしめ3菌株共純化したものを用いた。(第1篇参照)これらの菌株は1%小川培地よりキルヒナー培地

図5 供試菌株の耐性度 (II-ソートン培地培養菌)



へ、さらにソートン培地へと移植せられ、表面培養を行った。

ソートン培地における各菌株の発育速度には写真1に示すような差違が認められる。すなわちSM耐性菌と感性菌の発育は約5週で絨繻状を呈し同程度であるが、I



NH耐性菌のみは相当の遅れを示し紙状であつた。したがつて培液の着色もINH耐性菌のみ遅れた。5週目の菌苔の一部をとり、耐性検査を行つたが、図5のようにソートン培地へ培養した場合も耐性は本来の菌株で再三確かめられた成績と差がなかつた。SM耐性菌と感性菌は8週、INH耐性菌は10週後(菌苔の発育はなお劣勢であつたが、培養液の着色がほぼ同じになつた)100°C 30分滅菌し型通り1/10量に濃縮して、0.5%に石炭酸を加え、アンプルに封じて氷室に保存し、各菌株のツベルクリン原液とした。この際得られた菌苔を蒸溜水で3回洗滌し、濾紙に集め、デシケーター中で吸引乾燥した。この菌苔に、その乾燥重量の5倍の局方流動パラフィンを加え十分混和の上50°Cの孵卵器中に收容し、毎日攪拌しながら1週後遠沈、上清を分離し、沈渣にさらに最初の量の半分の流動パラフィンを加え同様に1週後遠沈、上清を前のものに加える。この混濁した流動パラフィンに等量のエーテルを加えさらに遠沈、上清を松風濾過管Nで吸引濾過して菌体を除き透明な濾液を得た。これからさらに陰圧でエーテルを除きアンプルに封入して氷室に保存した。このものは透明黄褐色粘稠な液であつて粗製流パラ抽出物として用いられた。

2. 感作動物ならびに皮膚反応

健康モルモットを各群5匹の6群に分け、A群にはKH1 m-S生菌0.01mg/0.5cc、B群にはKH1 m-SM∞生菌0.01mg/0.5cc、C群にはKH1 m-INH-100生菌0.1mg/0.5ccを左下側腹部皮下へ感染せしめ、α群へはKH1 m-S、油包死菌1mg/0.1cc、β群へはKH1 m-SM∞油包死菌1mg/0.1cc、γ群へはKH1 m-INH-100油包死菌1mg/0.1cc(本篇第1実験と同様に作られたもの)を同じく左下側腹部皮下へ接種した。

これら各菌株の生菌および死菌を接種して4週後、各群全動物の腹面左側に縦に、10倍稀釈のSM∞、INH100、m-Sの各ツベルクリンをツベルクリン注射器で丁寧に0.1ccずつ皮内注射を行つた。その硬結の大きさを24時間および48時間後に測定した。さらに2週後INH

-100のツベルクリンのみを20倍、他は10倍として右側に同じ反応を繰返した。

さらに2週後(接種後8週)に同一動物の背部皮内へ各菌株の粗製流パラ抽出物をそのまま接種し、ツベルクリンの場合と同様に皮膚反応を測定した。

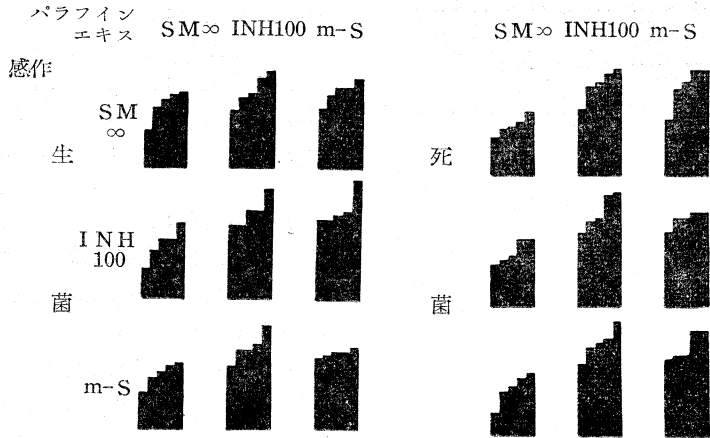
3. 成績

図6は、上記各菌株の生菌、ならびに死菌を接種した各群動物に対する、各菌株のツベルクリン反応成績を示したものである。すなわち表1は感作後4週目の比較

で横に各動物の硬結径をとり5匹分を小さいものから順に重ねたものである。これではINH 100のツベルクリン反応が全般に大きくて、各感作に該当するツベルクリンが特異的に他のツベルクリンより反応が強いという事実は認められない。さらに6週目の成績である表IIではINH 100ツベルクリンのみを20倍に稀釈して三者間の力価を接近せしめたが、前同様感作菌とツベルクリンの間に特異的な関係は認められない。

図7は各菌株よりの流パラ抽出物による皮膚反応の成

図7 耐性菌パラフィンエクストラクト反応(モル)



績であるが、抽出物そのものの力価の差は認められるが、ツベルクリンの場合と同様に菌株間の特異反応は認められない。

考 察

SM高度耐性菌、INH耐性菌および感性菌の死菌感作によるツベルクリンアレルギーの強さはほぼ同程度で3株間に差が見出されない。しかし、これら感作動物に各菌株の生菌を感染せしめると、INH耐性菌の死菌感作による病変阻止能が他の菌株よりも弱いという結果を得た。このことは流パラ死菌感作の場合に、その免疫力はその生菌における毒力と平行するという従来知られた知見⁷⁾⁸⁾がこの場合も当てはまると考えられる。また、ツベルクリン反応の強さは耐性菌、感性菌の死菌感作で差はないが、病変阻止能には明らかな差異が認められる。

次にこれらの菌株より作られたおのおののツベルクリンによる皮膚反応では、それらのおのおのの菌株による感染に対して、特異的な反応を示すとか、それ自身に力価の差があるといった事実は認められなかつた。このことは、抗酸性菌という範囲では、非病原性の雑菌ですら、結核菌による感作に対して、そのツベルクリン様物質が特異的な差を示さないという以前の実験成績⁹⁾¹⁰⁾とも考え併せ、当然のことかもしれない。少なくともツ

ベルクリン反応による耐性菌保有の鑑別は甚しく困難であると思われる。

次にツベルクリン反応と同様の皮膚反応を各菌株の流動パラフィン抽出物で試みた。ツベルクリンは結核菌の粗製水抽出物と看做されうであろう。これに特異性が乏しいとすれば油脂可溶性部分を多く含むであろう流パラ抽出物では如何というのが本実験の目的であつた。このものは Choucroun¹¹⁾の報告の最初の部分にほぼ準じて作られた。もつとも Choucroun はこれを皮膚反応に用いたのではなく、その抗原性を論じ、さらに毒性分層と感作性分層に分け、その生物学的意義を追求している。しかし以前にこの抽出物の皮膚反応で動物におけるBCGと結核菌接種の鑑別を試み、かなりの特異性を認めたので¹²⁾、今回も本実験に加えたのであるが、実験成績に示すように陰性の結果に了つた。

以上の成績より、免疫学的な面、ことに生物学的反応よりする耐性結核菌の特異性の追求は、かなり困難であり、これらをさらに有効な分層とすることに将来の検討が向けられねばならないであろう。

結 論

1) SM耐性菌、INH耐性菌、感性菌(同一保存菌株より作られたもの)の油包死菌の惹起するツベルクリンアレルギーには差が認められない。

2) これら油包死菌による感作動物のおのおのの菌株感染に対する病変阻止能にも当該菌株間に特異性は認められない。しかしINH耐性菌の病変阻止能(抗原性)は他に比べて明らかに弱い。

3) 3菌株より作られたツベルクリンによる皮膚反応は当該菌株接種動物に対して特異的ではない。

4) さらに、これらの菌株より作られた流動パラフィン抽出物による同様の皮膚反応にも特異性は認められない。

本実験に寄せられた当室吉川君の協力に感謝の意を表す。

本実験は厚生省科学研究費によつて行われた。(本論文の要旨は第31回日本結核病学会総会で演説した。)

参考文献

- 1) 工藤祐是他：結核投稿中。
- 2) 平野憲正他：日本細菌学雑誌, 8(3): 337, 1953.
- 3) 平野憲正他：日本細菌学雑誌, 8(7): 743, 1953.
- 4) G.M. Hamilton et al., : Tubercle, 36 (5): 130, 1955.
- 5) 木下彌栄：第30回日本結核病学会総会演説, 60, 1955.
- 6) 寺山和夫：第10回厚生省医務局発表会演説1954.
- 7) 岡 捨己他：抗研誌, 6: 22, 1950.
- 8) 工藤祐是：昭和26年7月厚生省総合結核研究協議会予防接種科会報告, 1951.
- 9) 工藤祐是：結核, 26 (7): 342, 1951.
- 10) 工藤祐是：結核, 26 (8): 398, 1951.
- 11) N. Choucroun : Amer. Rev. Tbc., 56(2) : 203, 1947.
- 12) 工藤祐是：昭和26年7月厚生省総合結核研究協議会予防接種科会報告, 1951.