

# INH 耐性菌のビルレンツに関する研究

## 第2報 炎症反応に伴う諸条件のINH耐性菌に対する影響とそのビルレンツとの関係

深 津 睿 知

東京大学伝染病研究所臨床研究部 (部長 北本 治)

伊豆通信病院 (院長 山岡克己)

受付 昭和35年4月21日

### 結 言

ある種の細菌については virulence の差異がその形態学的、免疫学的な性状に密接に関係することが知られている<sup>1)</sup>。結核菌についても同様にコード形成因子<sup>2)</sup>、中性赤との呈色反応<sup>3)</sup>等と各菌株の virulence との関係が検討されている。また INH 耐性菌のモルモットに対する virulence が減弱することは広く認められており、Middlebrook らはその機作としてカタラーゼ活性の消失を重視している<sup>4)5)</sup>。

一方結核菌の virulence を正常な個体内で示す増殖能力と定義すれば、菌株による virulence の差異は質的に相違するものでなく単に量的に異なるにすぎない<sup>6)</sup>。したがってかかる観点から結核菌の virulence を検討する場合に、宿主体内に侵入した菌のおかれる環境と菌の生存ないし増殖との相互関係の解明は重要な課題となる。感染の結果宿主体内に成立する炎症が防禦作用を有することは広く知られているが、感染菌に対し阻止作用を及ぼす炎症部位の物理化学的要因として酸素消費の増大による酸素張力の低下、乳酸の蓄積、pH の低下等が指摘されている<sup>7)</sup>。

前報において数種の結核菌についてマウスの体内における消長を観察したさい、INH 耐性菌は H<sub>37</sub>Ra, BCG より明らかに強い virulence を保持するがその増殖が感染早期から阻止される成績を報告した<sup>8)</sup>。以下これらの菌株のモルモットに対する virulence および中性赤呈色反応を調べ、同時に INH 耐性菌が上記の炎症部位における諸条件に対しいかなる態度を示すかを感受性菌の場合と比較検討した。

### 実験方法

1) 使用菌株：INH 感受性の標準株として H<sub>37</sub>Rv H<sub>37</sub>Ra, BCG, H<sub>2</sub> の4株、INH 耐性菌として H<sub>2</sub>-RINH および患者の喀痰より分離した A, B 2株の計3株を用いた。INH 耐性株はいずれも INH 加1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地上で 10 γ/cc 完全、50 γ/cc 不完全の耐性を示し、カタラーゼ活性を全く消失した株を

選んだ。いずれの株も 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に3~4代継代され、INH 耐性株の継代には 10 γ/cc INH 加培地を使用したか感受性株と同程度の良好な発育を示した。

2) 菌液の調製：in-vivo で菌のさらされる環境条件を考慮し次の溶液を用いて菌液を調製した<sup>9)</sup>。食塩 13.6 g, 塩化カリ 0.8 g, 結晶硫酸マグネシウム 0.2 g, 第一磷酸ソーダ 0.2 g を水 100 cc に溶かし、10% 塩化カルシウム1滴を加えた液を20倍に稀釈し、0.25M の乳酸を1/10量加え、4% NaOH で pH 5.6 に修正後、120 °C で20分間高圧滅菌を行った。

1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地上に3~4週培養後発生した集落をかき取って滅菌蒸留水で2回洗滌したのち上記の溶液に再浮遊し、マイクロガラスホモゲナイザーで2分間磨砕後遠心し、その上清中の菌濃度を日立製の光電比色計により測定し、0.5 mg/cc の菌液を作製した。

3) 動物実験：あらかじめツベルクリン反応陰性であることを確かめた体重 300~400 g のモルモット各群3~4匹に各菌液 0.2 cc を右側鼠径部の皮下に接種し、接種後5, 9週後に屠殺後剖検、肺、脾、肝の各臓器を取出し、その0.5~1 g をもつて定量培養を行い、残りをホルマリン中で固定し組織学的検索に供した。なお H<sub>37</sub>Ra, BCG, H<sub>2</sub>-RINH 接種群では接種3週後にも同様に処理した。培養は各臓器の1% NaOH による10倍稀釈乳剤を作つて原液とし、10段階階稀釈法を行つておのおの0.1 cc ずつを3本の1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に流し 37 °C で4週間培養後、発生集落数を計算し各臓器 10 mg 中の菌数を算定した。なお INH 耐性菌接種群では、5週後屠殺時 INH 加1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に流し、各臓器中に増殖した菌の耐性を検した。

4) 菌液の保存と生存菌数の計算：各菌液を2 cc ずつ5本の小試験管に分注し、各菌株につき1本ずつを底に44%ピロガロール 10 cc, 20% KOH 30 cc を入れた容量 200 cc の硝子ビンに入れ、ゴム栓で密栓封臘し 37 °C の孵卵器中に保存した。なお嫌気度のインディケーターとしてメチレン青を加えた葡萄糖溶液を小試験管に入れガーゼの小片を浸して同封した。

保存後、1, 2, 3, 5, 7 日後に1ビンずつ開封して小

試験管を取出し、10倍段階稀釈法を行いおのおの0.1ccずつを2本の1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に流し、37°Cで4週間培養後発生集落数を数え、原液0.1cc(菌量0.05mg)中に含まれる生菌数を計算した。

5) 中性赤呈色反応: 菌液作製時に試験管底に残った菌塊を50%のメタノールで1時間ずつ2回洗滌後、5%のNaClを含んだ1%溶性バルピタール液に再浮游し、中性赤の0.01%溶液を添加、30分間室温に放置し観察した。

実験成績

1) 動物実験成績: 各菌株を接種したモルモットについての実験成績を表1, 2に示す。

表1 各標準株のモルモットに対する virulence

菌株	動物No	接種局所	淋巴腺	脾生菌数	肝生菌数	肺生菌数	剖検時(週)
H <sub>37</sub> Rv	1			0	0	0	5日目死亡
	2	A	V.K	1 ++	3 ++	19 ++	5週
	3	A	V.K	2,575 冊	372 冊	313 冊	9 "
	4	A	V.K	208 冊	67 冊	975 冊	9 "
H <sub>37</sub> Ra	5		S	0 +	0 ++	0 ±	3 "
	6			0 -	0 +	0 +	5 "
	7			0 -	0 ±	0 +	9 "
	8			0 -	0 -	0 -	9 "
BCG	9			0 ±	0 ++	0	3 "
	10			0 ±	0 ++	0 ++	5 "
	11			0 -	0 -	0 ±	9 "
	12		S	0 -	0 ±	0 -	9 "
H <sub>2</sub>	13	A	S	155 冊	268 冊	31 ++	5 "
	14	A	V.K	283 冊	28 冊	1 ++	9 "
	15	G	V.K	65 ++	10 ++	585 冊	9 "

- 剖検所見 A: 膿瘍, G: 潰瘍, S: 淋巴腺腫脹, V.K: 乾酪化
- 生菌数(各臓器 10mg 中の生菌数を示す)
- 組織学的所見 -: 正常, ±: 細胞浸潤および充血, +: 結核性肉芽組織, ++: 中等大の結核結節, 冊: 融合した結節および乾酪化 冊: 巨大な結節と広汎な乾酪化

H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub> 株はいずれもモルモットに強い virulence を示した。H<sub>2</sub> 接種群では感染9週後の諸所見は5週屠殺時とほぼ同様であったが肝内生菌数はやや減少し、脾内生菌数も大きな変動をみず、組織学的所見もほぼこれに併行した。H<sub>37</sub>Rv 接種群は H<sub>2</sub> 接種群より強い病変を示しその進行性も著明であった。また本実験中唯一の死亡例である H<sub>37</sub>Rv 接種群の1匹は接種後5日目に肺炎のため死亡したが、臓器から結核菌を証明することはできなかった。

H<sub>37</sub>Ra, BCG 接種群ではいずれも全経過中臓器内に接種菌の生存を証明しえなかった。感染早期に組織学

表2 INH 耐性株のモルモットに対する virulence

菌株	動物No	接種局所	淋巴腺	脾生菌数	肝生菌数	肺生菌数	INH耐性度	剖検時(週)
H <sub>2</sub> -R INH	16		S	19 ++	4 +	0 +	?	3週
	17			0 ++	0 ++	0 ++		5 "
	18			0 -	0 ±	0 +		9 "
	19			0 +	0 ±	0 ++		9 "
A	20	A	S	228 冊	48 冊	1 ++	10γ/cc	5 "
	21	A	S	8 ++	275 冊	2 冊		9 "
	22	A	V.K	4 +	475 冊	0 ++		9 "
B	23	A	S	38 ++	16 ++	1 ++	10γ/cc	5 "
	24	A	S	10 ++	1 冊	1 ++		9 "
	25	A	V.K	24 ++	4 ++	0 ++		9 "

記載法は表1と同じ

的に証明された各臓器の病変も強い消褪傾向を示し、9週屠殺時にはその組織学的所見はいずれも正常に近い像を示し両者の間に差異は認められなかった。

INH 耐性菌接種群についての成績は区々で、H<sub>2</sub>-RINH 接種群は3週屠殺時肝、脾に結核菌を証明し脾に結核結節をみたが、肺には異常をみず、以後は各臓器内に菌を検出しえず病変も漸次消褪した。しかし患者より分離した2株はいずれもこれより強い virulence を示し、感染5, 9週後各臓器に結核性病変をみ菌を証明したが、B株接種群では5週剖検時の方が各臓器とも強い病変を示し、臓器 10 mg 中に含まれる菌数も多かった。A株接種群では9週剖検時、肝内生菌数は増加をみたが、肺、脾における生菌数は減少していた。また接種局所の所見も H<sub>2</sub>-RINH 株接種群では所属淋巴腺に軽度の腫脹をみたのみであったが、他の2群はいずれも皮下膿瘍の形成をみ、所属淋巴腺は乾酪化して感染9週後も治癒傾向を認めなかった。なお INH 耐性菌接種群の各臓器から検出された菌の INH 耐性度は、5週屠殺時生菌を証明しえなかった H<sub>2</sub>-RINH 株を除いて他の2株はいずれも 10 γ/cc に完全耐性を示し接種時の耐性度と変りなかった。

2) 菌液中の結核菌の消長: 嫌気状態のもとに保存された菌液中の結核菌の生存状態を表3に示した。

H<sub>37</sub>Rv 株はこれらの条件に対して強い抵抗性を示し3日目までほとんど生菌数に変化がないが、5日目に著しい減少をみ、7日目には菌液 0.1 cc 中にその生存を証明しえなくなった。H<sub>2</sub> 株は1日後急激に減少し2日目にもやや減少をみたが、3日目には大きな変動をみず、以後 H<sub>37</sub>Rv 株と同様な経過をとつた。

BCG は徐々に減少する傾向を示し、上の2株と同じく7日目には菌液 0.1 cc 中に生菌を証明しえなかった。H<sub>37</sub>Ra 株の経過は明らかに H<sub>37</sub>Rv 株と相違し、

表 3 嫌気状態下における乳酸加菌液中の結核菌の消長

菌株 \ 日数	0	1	2	3	5	7
H <sub>37</sub> Rv	3.3 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>	1.2 × 10 <sup>4</sup>	5.2 × 10 <sup>4</sup>	1.3 × 10 <sup>1</sup>	0
H <sub>37</sub> Ra	3 × 10 <sup>4</sup>	1.7 × 10 <sup>3</sup>	4.3 × 10 <sup>1</sup>	7	0	0
BCG	4.8 × 10 <sup>5</sup>	3.2 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>5</sup>	3.3 × 10 <sup>1</sup>	3.3 × 10 <sup>3</sup>	0
H <sub>2</sub>	1.7 × 10 <sup>8</sup>	1.5 × 10 <sup>4</sup>	3.2 × 10 <sup>3</sup>	2.8 × 10 <sup>3</sup>	8	0
H <sub>2</sub> -RINH	2.6 × 10 <sup>4</sup>	2.2 × 10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
A	1.2 × 10 <sup>5</sup>	1.3 × 10 <sup>5</sup>	6.5 × 10 <sup>3</sup>	3.8 × 10 <sup>3</sup>	7.3 × 10 <sup>1</sup>	8
B	5.8 × 10 <sup>4</sup>	6.7 × 10 <sup>2</sup>	0	0	0	0

0.5 mg/cc の菌液 0.1 cc 中の生菌数を示す

菌液中の生菌数は BCG と同じく持続的に減少し、5 日目以降はその生存を認めえなかつた。

H<sub>2</sub>-RINH 株もまた感受性母株 H<sub>2</sub> の経過と異なり 1 日後に著しい生菌数の減少をみ、2 日目以降はもはや全く培養しえなかつた。患者より分離した INH 耐性の 2 株についてはそのうちの 1 株は H<sub>2</sub>-RINH 株と全く同じ経過を示したが、他の 1 株は H<sub>2</sub> 株に類似する経過をとり 7 日目にもなおその 0.1 cc 中に 8 コの菌が生存していた。また毎日培養時各菌液の塗抹標本を作り、染色鏡検したが染色性、形態に大きな変化をみなかつた。

表 4 各菌株の中性赤呈色反応

菌株	H <sub>37</sub> Rv	H <sub>37</sub> Ra	BCG	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> -RINH
菌塊	紅	黄 白	紅	紅	紅
上清	黄	紅	黄	黄	黄

3) 各株の中性赤呈色反応：表 4 にみるごとく H<sub>37</sub>Ra 株のみ着色をみず、BCG および INH 耐性株のいずれも強毒株と同程度に紅色を呈し上清は黄色となった。

考 察

INH に対して耐性を獲得した結核菌のモルモットに対する virulence が低下する場合があることはすでに多くの研究者によって報告されているが、この実験に用いたいずれの INH 耐性株も H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub> のごとき強毒株に比しその virulence は弱い。しかし同じ INH 耐性を示し全くカタラーゼ活性を消失した INH 耐性株でも、その virulence の減弱の程度は大きな差異を示している。そのモルモットに対する virulence を標準株と比較すると、H<sub>2</sub>-RINH 株は H<sub>37</sub>Ra ないし BCG に近く、患者より分離した 2 株はむしろ H<sub>2</sub> 株に近い。一方強毒株 H<sub>37</sub>Rv および H<sub>2</sub> との間でも

virulence の差異は著しく、H<sub>2</sub>-RINH の virulence が他の 2 株に比して著しく低いことは、その感受性母株 H<sub>2</sub> の virulence がすでに他の標準強毒株に比し相当低いことに起因すると考えられる。したがって INH 耐性菌の virulence を検討するさいその感受性母株との比較が必要であり、株を異にする感受性株との比較は十分な考慮を要する。

Middlebrook は INH 耐性菌の virulence 減弱の機作としてカタラーゼ活性の消失を重視している<sup>45)</sup>。しかし明瞭に virulence の差異を示す、ここに用いた INH 耐性の 3 株がいずれもカタラーゼ活性を全く消失していることから、その virulence の減弱がカタラーゼ活性の消失にのみ起因するとは考えられない。また結核菌の virulence に関与する因子としてその中性赤結合力を調べたが、ここに使用した 5 株については H<sub>37</sub>Ra のみが陰性であった。しかし BCG, INH 耐性株および H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub> 株の間になんらの差異も認めえず中性赤結合力がすべての結核菌の virulence の程度に関与する共通の因子であるとは考えられない。Dubos は、BCG のごとく生体内である程度増殖しうる弱毒株ではコード形成、中性赤結合等の特徴とされる諸性状は、H<sub>37</sub>Ra のごとき無毒株の場合と異なつて必ずしも消失せず、その生体内における増殖を阻む病変部位の諸条件の重要性を指摘している<sup>10)</sup>。したがって BCG よりさらに著明な生体内増殖能力を保持する INH 耐性菌の virulence の検討に当つて、その増殖を阻止しようとする生体の示す炎症反応の重要性を無視しえないであろう。

宿主体内に侵入した細菌は感染局所に炎症を惹起し、あるものはさらに増殖して炎症反応もそれに従つて強まるが、あるものは増殖を阻止されて炎症も消褪する。したがって感染早期の炎症部位における菌の増殖の可否は感染症の経過に決定的な役割を果しその細菌の病原性に密接な関係をもつ。炎症の防禦作用については以前から

多くの事実が認められているが、炎症局所における循環障害、局所に集まった喰細胞の活発な活動の結果ここでは嫌氣的解糖作用が強く促進され、各種の代謝物質とくに乳酸が蓄積し pH は低下する<sup>11)</sup>。Dubos はこれらの炎症部位における物理化学的因子と感染菌との相互関係を検討して、これらの因子がすべての感染症の経過に重要な意義をもち、とくに結核症のごとく感染初期に菌の細胞内増殖と広汎な壊死を伴う感染症の経過に決定的な意義を有すると述べている<sup>10)</sup>。

本実験では上にあげた3因子が *in-vitro* で I NH 耐性菌を含む各種の結核菌の生存にいかなる影響を及ぼすかを検討したが、強い virulence を示す H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub>株はいずれも長期間にわたってこれらの諸条件に対して強い抵抗性を示した。しかし H<sub>2</sub> の population を構成する菌の大半は H<sub>37</sub>Rv 株より抵抗性が弱く、1日後に生存菌数は約 1/100 に減少している。H<sub>37</sub>Rv 株がモルモットに対し接種菌数が少ないにもかかわらず H<sub>2</sub> 株より強い virulence を示しているのは、宿主体内でこれらの因子による淘汰作用のため H<sub>2</sub> 株の大半が死滅ないし増殖を抑制されることが1つの要因と考えられる。次にこれらの条件の I NH 耐性菌の生存に対する阻害効果を検討すると、ここに使用した3株のうち2株、H<sub>2</sub>-RINH および B 株は1日後に全く消滅しその抵抗性は著しく弱い。他の1株はかえって H<sub>37</sub>Rv 株より強い抵抗性を示したが、この株を接種したモルモットの肝内で菌は持続的に増殖し、他の2株より強い virulence を保持することが証明された。すなわち同程度の I NH 耐性を示しかタラーゼ活性を全く消失した結核菌でも virulence の程度を異にすると同時にこれらの条件に対する抵抗性が異なる。この実験で検討した実験条件、すなわち乳酸濃度、pH および嫌気状態はいずれも宿主体内の炎症部位に実在する範囲にあり<sup>12)</sup>、virulence の低下を示す I NH 耐性株のこれらの条件に対する抵抗性が感受性強毒株に比し低いことはそのカタラーゼ活性の消失とともに注目に値する。先に第1報で、マウスの体内で一たん増殖した I NH 耐性菌が間もなく減少する事実を指摘したが、モルモットの場合にも接種後感受性強毒株と同様に各臓器内で増殖した I NH 耐性菌は9週後には減少傾向を示し発生した病変も軽減する。この実験で経過観察に用いた動物は各菌株について1匹にすぎなかったが、I NH 耐性菌によりモルモットの臓器内に生じた病変が治癒傾向を示すことはすでに知られている<sup>13)~15)</sup>。すなわち I NH 耐性株と感受性強毒株の virulence の差は一たん体内で増殖した菌と成立した病変の、その後の進展の相違にあると考えられる。宿主体内の各臓器に定着後増殖した結核菌は自ら惹起した炎症部位の物理化学的諸条件下におかれる。その結果これらの条件に対する抵抗性の弱い I NH 耐性菌は死滅し一た

ん成立した病変も漸次消滅の経過をたどるのであろう。一方強い抵抗性を示す強毒株は炎症反応の示す防禦作用にうちかつてさらに増殖を続け病変は拡大し進行性の病変を形成するにいたると考えられる。しかしこれらの条件下で、もつとも virulence の弱い H<sub>37</sub>Ra 株の生存期間は I NH 耐性株よりはるかに長い。また弱毒株である BCG は H<sub>37</sub>Rv 株より長時間にわたり生存しうる能力をもち、すべての結核菌の virulence の差異がこれらの諸条件に対する抵抗性にのみ起因するものでないことを示している。これらの事実は宿主の先天的抵抗性等の諸問題とともに、結核菌の virulence が2, 3の特定の条件に依存するものでなく宿主および感染菌の両側における諸因子の複雑な相互関係として把握すべきことを示唆している。

以上の実験で炎症反応の示す特性として乳酸による pH の低下と嫌気状態について検討したが、これらの因子のうちいずれが結核菌の生存に対して決定的な役割を果たすかについてさらに検討を進めねばならない。

## 結 論

H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>Ra, H<sub>2</sub>, BCG および H<sub>2</sub>-RINH 株、患者の喀痰から得た I NH 耐性株2株の計7株についてモルモットに対する virulence を比較し、同時に各株の中性赤色反応を調べた。さらに宿主体内に発生した結核性病変部位における各菌株の消長を追求する目的で、乳酸を加えて酸性にした菌液を嫌氣的に保存してその生存状態を観察し次の結果を得た。

- 1) カタラーゼ活性を消失した I NH 耐性菌のモルモットに対する virulence は低下するがその減弱度は菌株によつて異なる。
- 2) virulence 低下の著しい I NH 耐性菌は乳酸による pH の低下と嫌気状態に対して著しく抵抗性が弱い。
- 3) 中性赤結合反応は I NH 耐性菌と標準強毒株との間に差異を認めない。

なお I NH 耐性菌の virulence 減弱および各株の示す virulence の差異について2, 3の考察を加えた。

終りに臨み本実験が伊豆通信病院の藤田・後藤両先生ならびに動物飼育に当たられた佐藤氏の御協力によるものであることを付記し謝意を表する次第である。また懇切な御指導、御校閲を賜わつた伝染病研究所臨床研究部の北本教授、福原博士の御好意に心から感謝して筆を擱く。

## 文 献

- 1) Dubos, R.J.: The bacterial cell, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1949.

- 2) Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 86 : 175, 1947.
- 3) Dubos, R.J., & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 58 : 698, 1949.
- 4) Cohn, M.L., et al. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 5) Coleman, C.E., & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 42, 1956.
- 6) Rich, A. : The pathogenesis of tuberculosis, Charles C. Thomas, Springfield, 1951.
- 7) Dubos, R.J. : Lancet, 2 : 1, 1956.
- 8) 深津・藤田 : 結核, 33 : 634, 昭33.
- 9) Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 98 : 145, 1953.
- 10) Dubos, R.J. : Biochemical determinants of microbial disease, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1954.
- 11) Menkin, V. : Newer Concepts of Inflammation, Charles C. Thomas, Springfield, 1948.
- 12) Menkin, V. : Dynamics of Inflammation, Macmillan Co., New York, 1940.
- 13) 北本 : 診断と治療, 44 : 326, 昭31.
- 14) Karlson, A.G., & Ikemi, Y. : Proc. Staff. Mayo Clin., 29 : 119, 1954.
- 15) Barnett, M. et al. : Brit. J. Exp. Path., 34 : 568, 1953.