

INH 耐性 BCG に関する研究

第 1 報 耐性菌の分離と耐性度の安定性

長 田 進

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和 35 年 7 月 3 日

緒 言

抗結核剤の研究の著しい進歩に伴い、これをツベルクリン反応 (以下ツ反応と略) 自然陽転者に投与して、結核症の発病を予防しようとする、いわゆる予防内服 Chemoprophylaxis が試みられ、すでに多くの実験的 (1)~(12)、臨床的 (13)~(20) 報告がある。この方法による発病予防は、体内に侵入した菌に対する抗結核剤の bacteriocidal ないしは bacteriostatic な作用を期待する訳で、BCG 接種による方法、すなわち弱毒生菌の接種により、宿主に免疫を獲得させて発病を予防する方法とは本質的に立場を異にする。したがって、BCG 接種者にさらに予防内服を併用する場合、たとえば BCG 接種によるツ反応陽性者が自然感染をうけたと考えられる場合、あるいは結核患者に接触する機会が多い職業従事者または結核患者家族で、ツ反応陰性者、とくに乳幼児等に BCG を接種し、そのアレルギー前駆期に起るかもしれない感染を防禦しようとする場合等には、投与された抗結核剤によつて、前に接種された BCG が宿主体内での発育を阻害され、あるいは死滅される可能性が考えられる。したがって BCG による十分な免疫効果を期待できないのではあるまいか。

この点に関して Palmer ら (1) (2) はモルモットを使用して、感染と同時に INH を投与する実験を行い、INH 投与後にも免疫が残っていることを明らかにし、Bloch ら (3) はマウスを、Bartmann (6)、柳沢 (7) らはモルモットを使用した実験でそれぞれ同様な結果を報告している。しかし江頭 (8) は BCG 免疫群と BCG 免疫 + INH 早期投与群の防禦力を比較して、前者の優れている点を指摘し、Schmidt (9) は猿を使つた実験で、INH 早期投与が免疫力を減弱すると述べている。一方 Dubos (4)、Peizer (10)、遠藤 (12) らは、実験条件により、免疫が減弱する場合と不変の場合があると述べており、この点に関してはまだ一定した見解はない。

臨床的にもこの点についての意見は分れており、Robinson (13) は乳児のツ反応自然陽転者に INH を投与して、ツベルクリン・アレルギー (以下ツ・アと略) の陰転を、小池ら (14) は学童に BCG 接種と同時に INH を投与してツ・ア出現の低率なことを報告している

が、吉岡 (19)、三村 (20) はツ反応自然陽転の学童に INH またはその誘導体を投与しても、ツ・アに変化がないと述べ、U.S. Public Health Service (15) の広範な調査でも、予防内服はツ・アに変化をきたさないと報告している。

以上のごとき BCG 免疫に対する予防内服併用の影響の有無についての対立した見解を、合理的に解決する一方法として、抗結核剤耐性 BCG による免疫が考えられる (11)。この方法によれば、両者の特徴は互いに影響を受けることなく、発病予防に効果を期待できるかもしれない。

この観点から、われわれは INH 耐性 BCG を分離し、実用に供しうるか否かを検討した。今回は耐性菌の分離方法ならびに耐性度の安定性について報告する。

実験 I 耐性菌の分離

研究室保存 BCG の Sauton 培地 7 日培養の菌苔を滅菌濾紙間で吸湿し (加圧重量 500 g 5 分間)、水晶球入りフラスコを用い、手振法により、10 mg/ml 液を作製した。別に INH を 100 γ /ml に含むように作つた合成寒天平板培地 (21) 8 枚にこの 0.2 ml 宛を接種した。接種菌量は 46×10^7 である。合成寒天培地の組成は次のごとくで、寒天はソックスレーを用いメタノールで長時間抽出して、結核菌発育阻害物質を除去したものである。

培地の組成および製法 ;

| | |
|--|----------|
| KH_2PO_4 | 1.0 g |
| Na_2HPO_4 | 3.0 g |
| Na-glutamate | 5.0 g |
| Ferric-Ammonium-Citrate | 0.05 g |
| $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g |
| $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.0005 g |
| $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.0001 g |
| $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.0001 g |
| Glycerin | 10.0 g |

以上に純水を加え 1,000 ml とし、pH を 30% NaOH 水で 6.8~7.0 に修正、これにメタノール精製寒天を 2% の割に加え、15 Lb 20 分滅菌する。これを滅菌小型シャーレに 7~8 ml 宛無菌的に分注して凝固させる。

以上の培地に培養4週後に発生した集落数は、培地8枚の平均69.5コで、耐性変異菌の発現率は1:6.7×10⁶であった。

そこで、発育良好な集落を at random にとり、INH 100 γ/ml 含有 Kirchner 寒天培地上に塗抹して増殖せしめた。この菌苔より手振法で菌液を作り、de Fournbrune の micro-manipulator を用い、単個菌を釣菌分離した。釣菌した54コの単個菌中4コがINH 100 γ 添加 Kirchner 寒天培地上に重層した Film 寒天培地上に発育したので、以後の実験にこの4株を使用した。

発泡法による Catalase 反応²²⁾は、分離した耐性株では、いずれも発泡せず陰性であった。これに対して親株(感性株)は陽性であった。

実験II 耐性度の安定性の検討

分離した4株の耐性菌中、No 1 および No 4 の2株について耐性の安定性をしらべた。

実験方法；

INH 100 γ/ml 含有 1% 小川培地(以下 INH (+)小川と略)、INH を含まない 1% 小川(以下 INH (-)小川と略) および INH を含まない Sauton-potato (以下 S・P と略) の3種類の培地にそれぞれ10~14日間隔で塗抹継代し、その間3、6および9ヵ月後にINHの耐性度を調べた。検査時には各株ともに10日目培養の菌苔から手振法で菌液を作り、INH 0 γ/ml、10 γ/ml および 100 γ/ml 含有の各小川培地に10⁻⁴~10⁻⁶/m³ をおのおの4本宛培養した。培養の判定は10⁻⁵/mg 稀釈菌液の培養4週目の平均集落数をもつてした(表1)。

成績；

1) まず分離した耐性株の継代培養時の菌苔の発育状態を概観すると、(もちろんこれは塗抹菌量の多寡に大きく影響されるが)、INH (+) 小川上の発育は常に良好で、感性菌の INH (-) 小川培地上の発育と大差がなかった。INH (-) 小川に継代した場合は、これに比べ増殖がやや劣るようで、菌苔は常に幾分湿潤気味であった。S・P 上での発育は、継代当初は旺盛で、10日目の菌苔は完全に馬鈴薯面を破つて発育したが、継代6ヵ月ごろより幾分発育が悪くなり、馬鈴薯全面を覆う旺盛さはみられなかった。

2) 耐性度の検査

継代3ヵ月後(小川継代10代目、S・P 11代目)、6ヵ月後(小川18代目、S・P 20代目)、9ヵ月後(小川25代目、S・P 28代目)にそれぞれ行った。

(1) INH (+)小川に継代した場合

No 1 株では、耐性菌の分離時に比べ、生菌数は常にやや減少の傾向があつたが、各検査時の集落数はおおよ

表1 耐性の安定性 (表中数字は10⁻⁵mg 接種) 培養4週の結果

| 菌株 | 継代培地 および INHの有 無 | INH 濃度 分離 後期間 | 0 | 10 | 50 | 100 |
|---------|-----------------------------|------------------------|------|------|-------|-------|
| | | | γ/ml | γ/ml | γ/ml | γ/ml |
| No 1 | 1%小川 INH(+) | 分離時 | 84.2 | 77.6 | / | 81.4 |
| | | 3ヵ月 | 27.2 | 17.6 | / | 17.4 |
| | | 6 | 20.0 | 23.5 | / | 20.5 |
| | | 9 | 24.2 | 25.5 | 26.5 | 25.0 |
| | 1%小川 INH(-) | 3ヵ月 | 3.2 | 5.0 | / | 3.0 |
| | | 6 | 85.2 | 82.5 | / | 88.5 |
| | | 9 | 14.2 | 13.0 | 13.8 | 10.0 |
| | Sauton- potato INH(-) | 3ヵ月 | 8.6 | 11.6 | / | 8.0 |
| | | 6 | 52.6 | 49.0 | / | *19.0 |
| 9 | | 29.0 | 35.0 | 25.2 | *11.5 | |
| No 4 | 1%小川 INH(+) | 分離時 | 14.6 | 15.6 | / | 8.6 |
| | | 3ヵ月 | 20.8 | 27.2 | / | 18.8 |
| | | 6 | 45.0 | 47.8 | / | 44.0 |
| | | 9 | 11.5 | 13.5 | 14.2 | 13.5 |
| | 1%小川 INH(-) | 3ヵ月 | 10.8 | 13.8 | / | 10.0 |
| | | 6 | 11.5 | 14.0 | / | * 8.2 |
| | | 9 | 23.0 | 23.0 | 20.2 | 17.0 |
| | Sauton- potato INH(-) | 3ヵ月 | 11.4 | 8.2 | / | 8.0 |
| | | 6 | 58.0 | 56.0 | / | 41.0 |
| | | 9 | 23.0 | 22.0 | 19.5 | 19.0 |

注: § この欄は10⁻⁴mg 中の生菌数で表わした

* 集落の発生が他に比べ7~10日遅延

そ20×10⁵に近く、均一な耐性度を示した。すなわち、3ヵ月後では27×10⁵/0γ, 17×10⁵/10γ, 17×10⁵/100γ, 6ヵ月後ではそれぞれ20×10⁵, 23×10⁵, 20×10⁵, 9ヵ月後では24×10⁵, 25×10⁵, 23×10⁵である。

No 4 株では集落数は各検査時を通じて若干の変動がみられたが、3ヵ月後20×10⁵, 6ヵ月後40×10⁵, 9ヵ月後10×10⁵をいずれも中心とした数で、均一した耐性度を示した。

② INH (-) 小川に継代した場合

INH (+) 小川の場合と異なり、ときに耐性度の多少の変動を疑わしめた。すなわち、No 1 株では、3ヵ月および6ヵ月後の生菌数の減少が著明であつた。これは先にふれたように、培地上の菌苔の発育が他の培地上のそれに比べいささか不十分であつたのに、他培地と同じく10日目の菌苔をとつて実験したことに起因するものと考えられる。とくに6ヵ月後の検査では、100 γ/ml の菌群の減少が著明で、35×10⁴/0γ, 32×10⁴/10γ, 8.5×10⁴/100γ という集落数を示し、これは耐性度の低下を疑わせた。

No 4 株では No 1 株にみられた変化はなく、各検査時の集落数は常に $10 \sim 20 \times 10^5$ で、均一した耐性を示した。ただ 6 カ月後の $100 \gamma/ml$ の集落のみが他に比べ 7～10 日遅れて発現した。

③ S・P に継代した場合

以上の現象は S・P 継代 6 カ月後の検査時にもみられた。すなわち、No 1 株の 6 カ月後の検査時に、 $100 \gamma/ml$ の集落の発現が他に比べ 10 日前後遅延し、かつ集落数は $50/0\gamma$, $49/10\gamma$, $19/100\gamma$ と $100 \gamma/ml$ 培地上でやや少数であった。なお 3 カ月の検査時の耐性は、 $8 \sim 11 \times 10^5$ の間に均一であり、また集落の発現にも遅延はなかつた。

No 4 株の場合は、3 カ月で 10×10^5 を、6 カ月で 50×10^5 をそれぞれ中心とする集落数で、ほぼ均一な耐性がみられた。

以上継代 6 カ月後の検査の場合、INH (－) 小川では両株に、S・P では No 1 株に、それぞれ $100\gamma/ml$ 培地上の集落数が幾分少なく、あるいは発育が遅延し、耐性の低下を思わせる状態がみられたので、9 カ月後の検査のさいは、あらかじめ多数の培地にそれぞれ塗抹継代しておき、とくに発育が良好と思われる菌苔を使用した。また耐性の低下の程度をみるため、 $50 \gamma/ml$ の耐性検査をも併せ行つた。

結果は表に示したように、INH (－) 小川では No 1 株の集落数は $0 \sim 100 \gamma/ml$ において $10 \sim 14 \times 10^5$ の間にあり、安定した値を示した。また No 4 株では各 INH 濃度の集落数の発生時期は同じで、集落数も $17 \sim 23 \times 10^5$ と均一であり、6 カ月にみられたような変化はなかつた。

S・P 培地では No 4 株は前回同様安定していたが、No 1 株において、やはり $100 \gamma/ml$ 培地の集落の発生が 7～10 日遅れた。

以上のように分離耐性株は、INH (+) 小川に継代した場合には、常に安定した耐性を示したのに対し、INH (－) 小川および S・P 上に継代した場合は、ときに培地上の集落の発現が遅れ、あるいは集落数が少ないという現象がみられた。一般に集落数の多少には菌液作製に用いた菌苔の発育の良否がかなり影響するものであると考えると、上述した所見は、継代に用いた培地による本質的な影響とみるよりも、検査時の菌苔の発育いかに関係するとみた方が妥当ではあるまいか。

また 10 本の 1% 小川培地に、同一菌液の同一量 ($10^{-6}mg/ml$) 接種を 10 回行つた場合の集落数の分散²⁵⁾ から計算してみると、前述した集落数の差には有意の差はないようである。

総 括

有毒結核菌の INH 耐性株が、原株に比べて毒力が

減弱することは諸家の指摘するところであるが、耐性菌群中に感性菌が混在する場合は、反覆継代するにつれて感性菌菌群が増大し、ためにその耐性菌の毒力が、みかけ上、感性菌のそれによつて代表されるようになることが知られている^{24) 25)}。また柴田²⁶⁾は INH $10 \gamma/ml$ 耐性菌より、de Fonbrune の micro-manipulator で単個菌を分離した場合、親株の表示する耐性と、単個菌に基く新株の耐性に一致しない場合があること、この新株は Dubos 培地に 3～8 代継代しても耐性に变化がないことを述べている。

以上の報告より考案すると、INH 耐性菌を用いる実験においては、分離菌の純粋性、あるいは表示する耐性の安定性等にもつとも注意を払わねばならない。

われわれはこの点を重視し、BCG からの耐性菌の分離に当り、one-step selection で $100 \gamma/ml$ 耐性菌を得たのち、さらに de Fonbrune の micro-manipulator を用いて、単個菌を分離した。佐藤²⁸⁾は BCG の INH 耐性 $10 \gamma/ml$ の出現率は $1 : 2 \sim 4 \times 10^5$ であると報告しているが、われわれの $100 \gamma/ml$ 耐性菌の出現率は $1 : 6.7 \times 10^6$ であつた。また micro-manipulator で釣菌した単個菌の Film 培地上の発育率は 7.4% で、感性菌のそれに比べ低率であつた²⁶⁾。

われわれの分離した INH 耐性 BCG 株は、したがつて一応純粋なものと考えられるが、さらに継代中の耐性の変動の有無を、前述のように調べ、その安定性を追究した。

INH 耐性菌の安定性については多くの報告があり、Pancy²⁷⁾は反覆継代中の速やかな耐性の復帰を述べているが、Meißner²⁵⁾、佐藤²⁹⁾らは、患者材料より分離した INH $10 \gamma/ml$ 耐性菌は、継代中に耐性の変動があつても、実験室で分離した $10 \gamma/ml$ 耐性菌は安定していると述べている。

われわれの単個菌に基く INH 耐性菌の安定性は前述のごとくで、INH (+) 小川に継代を行つた場合は、きわめて安定した耐性を示すが、その他の INH を含まぬ培地では、ときに耐性の不均一を思わせる成績を得た。しかしこれは検査に用いた菌苔の発育の良否が大きく関与しており、使用した培地には本質的に関係がないように思われる。

結 論

INH 耐性 BCG が免疫元として、実用に供しうるか否かを検討する第一歩として、INH $100 \gamma/ml$ 耐性菌を one-step で分離した。耐性菌出現率は $1 : 6.7 \times 10^6$ である。

さらに de Fonbrune の micro-manipulator を用いて、この耐性菌より単個菌を分離し、耐性の純度を高めた。

かくして得た2株の耐性菌の耐性度を9カ月間にわたって検査したところ、INH 添加 1% 小川 培地に継代した場合には、耐性度は常にきわめて安定していた。INH 非添加の 1% 小川または Sauton-potato 各培地に継代した場合には、ときに耐性度に変動が起るよう思われたが、発育の良好な菌苔を使用すれば、INH 添加 1% 小川培地に継代した場合と同様に、安定した耐性度を示した。

擲筆に臨み、御懇篤な御指導、御校閲を戴いた柳沢部長、室橋主任に深く感謝する。また終始御協力戴いた橋本、勝山両氏に深く感謝する。

本研究は BCG 生産協議会の援助によつて行われた。

参 考 文 献

- 1) Ferebee, S.H. & Palmer, C.E. : Am. Rev. Tuberc., 73 : 1, 1956.
- 2) Ferebee, S.H., Palmer, C.E. & Hopwood, L. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 917, 1956.
- 3) Bloch, H. & Segal, W. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 228, 1955.
- 4) Dubos, R.J. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 117, 1956.
- 5) Hamilton, G.M. & Nassau, E. : Tubercle, 36 : 130, 1955.
- 6) K. Bartmann, J. Villnow & C.H. Schwarz : Beit. z. Kli. Tbk., 116 : 687, 1957.
- 7) 柳沢謙・前田道明 : 結核の臨床, 6 : 321, 昭30.
- 8) 江頭靖之 他 : 日本病理学会会誌, 42 (地方会号) : 290, 昭28.
- 9) Schmidt, L.H. : Am. Rev. Tuberc., 74 (Supple) : 138, 1956.
- 10) Peizer, L.R., Chavaes, A.D. & Widelock, D. : Am. Rev. Tuberc., 76 : 732, 1957.
- 11) 柳沢謙・金井興美 : 医学と生物学, 43 : 28, 昭32.
- 12) 遠藤勝三 : 阪大医誌, 9 : 956, 昭32.
- 13) Robinson, A. Meyer, M. & Middlebrook, G. : New. Eng. J. Med., 252 : 983, 1955.
- 14) 小池英也 : 結核, 33 : 306, 昭33.
- 15) U.S. Pub. Health. Serv. Tbc. Prophylaxistrial : Am. Rev. Tuberc., 76 : 942, 1958.
- 16) Hewell, B. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 733, 1954.
- 17) Aronson, J.D. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 7, 1956.
- 18) 千葉保之・高原義正 : 日本臨牀結核, 15 : 34, 昭31.
- 19) 吉岡武雄 : 呼吸器診療, 12 : 503, 昭32.
- 20) 三村大八郎 : 信州医学誌, 6 : 132, 昭32.
- 21) 橋本達一郎・青柳高明・土屋まつえ : 医学と生物学, 発表予定.
- 22) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 23) 室橋豊穂・吉田幸之助 : 結核, 33 : 293, 昭33.
- 24) Szybalski, W. & Bryson, V : Am. Rev. Tuberc., 65 : 768, 1952.
- 25) Meißner, G. : Fortschritt der Tuberkuloseforschung, 7 : 52, 1956.
- 26) 柴田一郎 : 結核, 32 : 17, 昭32.
- 27) Pancy, F., Stander, H. & Donovick, R. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 761, 1952.
- 28) 佐藤直行 : 医学と生物学, 25 : 142, 昭27.
- 29) 佐藤直行 : 医学と生物学, 31 : 250, 昭29.