

イソニコチン酸ヒドラジッド耐性結核菌の菌力に関する研究

第4報 INH 耐性菌感性菌を人工的に混合した菌群の菌力について

杉 本 一

国立療養所大日向荘

受付 昭和33年5月3日

緒 言

日常問題とされる患者の喀痰から分離されるINH耐性結核菌の多くは感性菌と耐性菌を種々の割合にふくんでいる混合菌群といわれている。この混合菌群があるINHの濃度にいわゆる完全耐性を示したとしても菌群を構成するほとんど全部の結核菌が耐性菌であることを意味しているとは限らない。先に第3報において喀痰から分離されたINH 10 γ /cc 耐性菌で10 γ /cc 耐性培地に培養された菌群は1% H₂O₂を10分間作用させるとほとんど死滅しH₂O₂に感受性が高く、これに反してINH感性菌は著しく感受性が低く10~30分作用させてははじめ10⁴の生菌単位数であつたものが10³以上の残存生菌単位数を示すものが大部分であることを報告したが、今回はこのH₂O₂に感受性の高い耐性菌とH₂O₂にきわめて感受性の低い感性菌を人工的に混合した結核菌群についてハツカネズミに静脈注射して肺臓内生菌単位数の消長を観察し、混合菌群の構成の変動と菌力の関係を観察しいささか参考となる所見をえたのでその成績を報告する。

研究 方法

1. INH 感性菌は患者喀痰を3% KH₂PO₄ 培地に4週間培養した菌の集落からかき集められたもので0.1 γ /cc 以上には発育しないものである。INH 0.1 γ /cc, 10 γ /cc 耐性菌は0.1 γ /cc, 10 γ /cc 耐性培地に培養し4週間後にかき集められたもので完全耐性菌である。

2. 第1群の混合菌液は上記3% KH₂PO₄ 培地1代目の感性菌と同じく1代目の10 γ /cc 耐性菌から手振り法によつてつくつた。この2つの菌液を1cc ずつ菌量で次のような割合に混合して感性菌対耐性菌の比率が1:1, 10:1, 100:1の混合菌群をつくつて第1群とした。

3. 第2群は同様にして第1群とはちがつた患者喀痰から分離された菌を用い、感性菌対0.1 γ /cc 耐性菌の比率が1:1, 10:1, 100:1になるように混合したものである。

4. 第3群は同様にして第1, 第2群とはちがつた喀痰から分離された菌を用い感性菌対10 γ /cc 耐性菌の比率が1:1, 10:1, 100:1になるように混合した。

5. 第4群は同様にして第1, 2, 3群とはちがつた喀痰からの菌を用い感性菌対10 γ /cc 耐性菌の比が1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 になるように混合した。すなわち、

第1群においては、

感性菌の1 mg/cc の菌液

+ 10 γ /cc 耐性菌の1 mg/cc の菌液 1:1

感性菌の2 mg/cc の菌液

+ 10 γ /cc 耐性菌の0.2 mg/cc の菌液 10:1

感性菌の2 mg/cc の菌液

+ 10 γ /cc 耐性菌の0.02 mg/cc の菌液 100:1

第2群においては、

感性菌の1 mg/cc の菌液

+ 0.1 γ /cc 耐性菌の1 mg/cc の菌液 1:1

感性菌の2 mg/cc の菌液

+ 0.1 γ /cc 耐性菌の0.2 mg/cc の菌液 10:1

感性菌の2 mg/cc の菌液

+ 0.1 γ /cc 耐性菌の0.02 mg/cc の菌液 100:1

第3群は第1群の方式に準じた。

第4群においては、

10 γ /cc 耐性菌の1 mg/cc の菌液

+ 感性菌の1 mg/cc の菌液 1:1

10 γ /cc 耐性菌の2 mg/cc の菌液

+ 感性菌の0.2 mg/cc の菌液 10:1

10 γ /cc 耐性菌の2 mg/cc の菌液

+ 感性菌の0.02 mg/cc の菌液 100:1

10 γ /cc 耐性菌の2 mg/cc の菌液

+ 感性菌の0.002 mg/cc の菌液 1,000:1

10 γ /cc 耐性菌の2 mg/cc の菌液

+ 感性菌の0.0002 mg/cc の菌液 10,000:

以上の菌液の混合前における10⁻⁵ mg の定量培養の感性菌の数は第1群では51, 第2群では78, 第3群では3, 第4群では36となり、0.1 γ /cc 耐性菌は53, 10 γ /cc 耐性菌は第1群では61, 第3群では2, 第4群では20であつた。また混合後の10⁻⁵ mg の定量

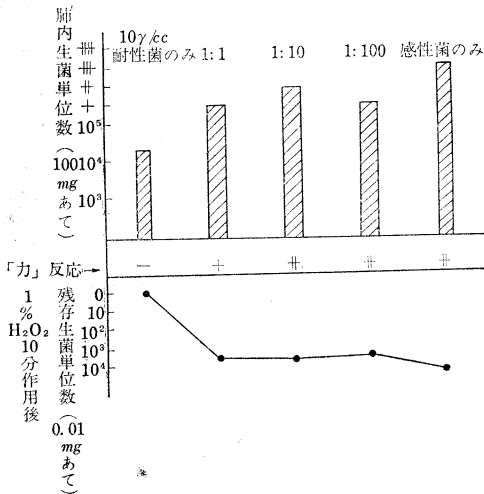
培養では順次に第1群より60, 47, 57となり第2群では52, 65, 58, さらに第3群では4, 5, 6, 第4群では25, 17, 18, 19であった。

6. 動物実験方法, カタラーゼ反応検査および H₂O₂ 抵抗性試験は前報と同じである。

研究成績

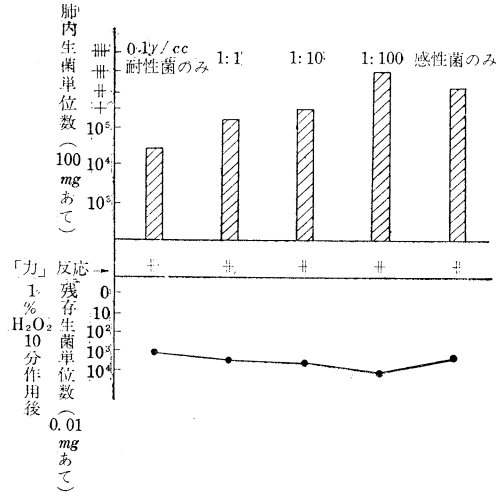
1) 第1群の成績: 10 γ/cc 耐性菌と感性菌を 1:1, 1:10, 1:100 の割合に混合して比較した。ここで用いた 10 γ/cc 耐性菌は「カ」陰性, H₂O₂ 10分作用で残存生菌単位数 0 であり, 肺臓内生菌単位数は 10⁴ order で菌力は劣っていた。これに対して感性菌は「カ」陽性, H₂O₂ 作用でもはじめの生菌単位数に比べ 1/10 内の生菌単位数減少を示していた。両者を 1:1, 1:10, 1:100 の割合に混合した場合にはいずれもハツカネズミに対して菌力は等しく強く, また H₂O₂ に対してもいずれも 0.01 mg が 10³ の残存生菌単位数を示していた。これらは感性菌のみの場合と著明な差はみられなかった(図1)。

図1 第1群



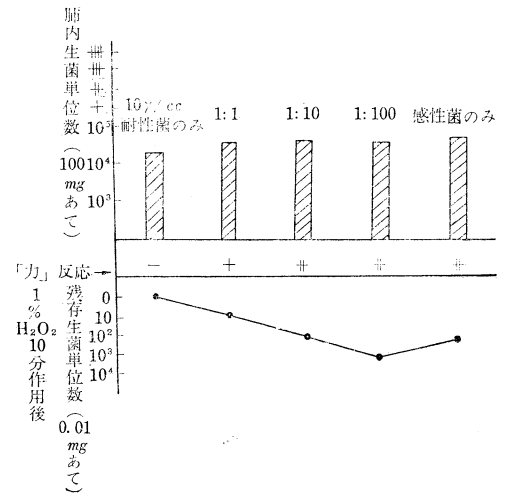
2) 第2群の成績: 0.1 γ/cc 耐性菌と感性菌を 1:1, 1:10, 1:100 の割合に混合して比較した。ここで用いた 0.1 γ/cc 耐性菌は「カ」陽性, H₂O₂ にも抵抗して 10³ 以上の残存生菌単位数を示していたがハツカネズミに対しては比較的菌力は劣っていた。感性菌は「カ」陽性, H₂O₂ にも抵抗つよく菌力もつよいものであった。両者を 1:1, 1:10, 1:100 の割合に混合した場合は感性菌のみの場合と著明な菌力の差はなかつたが, 1:1 および 1:10 の混合菌液では少しく菌力が劣っているようであるが 0.1 γ/cc 耐性菌の菌力のように弱くはなかつた(図2)。

図2 第2群



した 10 γ/cc 耐性菌と感性菌を 1:1, 1:10, 1:100 の割合に混合して比較した。ここで用いた 10 γ/cc 耐性菌は「カ」陰性, H₂O₂ に対して感受性つよく残存生菌単位数 0 でありハツカネズミに対して 10⁴ の肺臓内生菌単位数を示す菌力の劣るものであり, また感性菌は「カ」陽性, H₂O₂ に対する抵抗もつよく, 反対に肺臓内生菌単位数は 10⁴ の比較的菌力の劣つたものである。両者を 1:1, 1:10, 1:100 の割合に混合しても 10 γ/cc 耐性菌, 感性菌との間にいずれも菌力の差がみられず, 10 γ/cc 耐性菌とは H₂O₂ に対する抵抗性のみがちがつていた(図3)。

図3 第3群

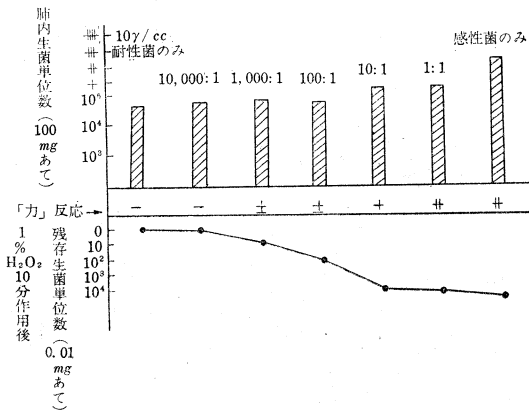


4) 第4群の成績: 10 γ/cc 耐性菌と感性菌を 1:1, 10:1, 100:1, 1,000:1, 10,000:1 の割合に混合して比較した。10 γ/cc 耐性菌は「カ」陰性, H₂O₂ 作用で残存生菌単位数は 0, 肺臓内生菌単位数は 10⁴ order の菌力の劣るものであった。感性菌は「カ」陽性,

3) 第3群の成績: 第1群とは異なる患者より分離

H₂O₂ に対する抵抗も強く、菌力も著しくつよいものであった。両者を 1:1, 10:1, 100:1, 1,000:1, 10,000:1 の割合に混合した場合には耐性菌と感性菌の割合が 1,000:1 の比でそれ以上感性菌をふくんでいるときには H₂O₂ に対する抵抗がみられ、ハツカネズミに対する菌力は 100:1 のものは 10 γ/cc 耐性菌に等しい菌力を示しそれ以上感性菌をふくんでいると菌力も強くなってきて感性菌の菌力に近い値となつた (図4)。

図4 第4群



総括ならびに考案

結核菌についてはその菌力を動物実験、あるいは生化学的性状、発育形成その他から判定しようという試みがなされてきたが、結核菌が INH 耐性になるとモルモットに対して菌力を減ずるという報告は 1953 年ごろから相ついで発表された¹⁻³⁾。著者も第 1 報から第 3 報にかけて INH 耐性結核菌は耐性度の上昇するにしたがいカタラーゼ陰性となり H₂O₂ にも抵抗が弱くなり、さらにハツカネズミに対して菌力が劣つてくることを証明した。また、患者喀痰中の結核菌では INH 耐性を獲得してもなお感性菌を種々の割合にふくんでおり、この割合のちがひによつてハツカネズミに対する菌力の変化も現われてくることを報告した。今回は患者喀痰より分離した耐性菌、感性菌を種々の割合に混合して静脈内注射をやり全肺臓内生菌単位数を比較し併わせて混合菌群のカタラーゼ反応と H₂O₂ に対する抵抗性も検討した。勝山⁴⁾は弱毒結核菌 H₃₇Ra と強毒結核菌 H₃₇Rv を同時にモルモットに接種したとき弱毒菌は速やかに体内より消失してしまうことを報告しこれは強毒菌による免疫力の発現であると考えた。加藤⁵⁾はハツカネズミに対して H₃₇Rv と生存増殖力を全く喪失した 18-b 株よりなる混合菌群を用いて実験をおこない両菌株は宿主体内において共存してもそれぞれ単独の感染の場合と全く同一の生存増殖の経過を示し総生菌数の消失は H₃₇Rv のそれと一致したといつている。また、Gernez⁶⁾は

ハムスターに、INH 10 γ/cc 耐性菌を感染させると 300 日以上ハムスターは生きていたが感性菌を混合接種すると 150~180 日で死亡することを報告し、米山⁷⁾は INH 耐性菌の菌力低下を確認するとともにモルモット体内耐性減弱は INH 耐性結核菌と INH 感性結核菌の混合接種により、感性菌と耐性菌の増殖力の差によることを確認した。

私の成績をみると、菌力の強い感性菌とそれより菌力の劣る 10 γ/cc 耐性菌を種々の割合に混合して同時に注射してハツカネズミの 4 週間後の肺臓内生菌単位数を比較してみると、感性菌が 1% 以下の割合にふくまれている場合には 10 γ/cc 耐性菌に近い菌力を示すことが観察された。これより感性菌のしめる割合が多いと感性菌単独接種の場合と著明な菌力の差はみとめられないことがわかつた。この場合混合菌液 1 mg/cc 中の生菌単位数があくまで 17×10⁵ であつた場合の結果である。

Meissner⁸⁾は INH 耐性菌と感性菌を種々の割合にまぜモルモットに接種して次の結果をえた。すなわち 100% 耐性菌接種の場合には病変少なく 50~90% に感性菌がふくまれると相当高度の病変をみとめほとんど全臓器内に感性菌が検出されわずかに接種局所に耐性菌をみとめている。また 5% 感性菌がふくまれても動物に高度の結核を起すので混合菌群の菌力はふくまれている感性菌の菌力で決定されるといつている。佐藤⁹⁾は患者喀痰から分離した結核菌中の INH 耐性菌の分布率は直接法による検査で 50% をこえることがなく、また人工的に耐性菌と感性菌を混合した場合混合菌群に分布する耐性菌の比率は一定の割合で減少していく。これは混合菌群中の INH 感性菌と耐性菌の発育速度の差によるものと考えている¹⁰⁾。さらに Meissner は混合菌群では試験管内で 10~5% の感性菌が入つても完全耐性とよみとれる結果をえており、1 回の動物通過では INH 耐性菌は感性菌に変らなかつたことなどを追加している。私の第 3 群の成績では、いずれも菌力の比較的劣つていた 10 γ/cc 耐性菌と感性菌を種々の割合に混合して動物注射しても当然菌力の変化はみられずただ動物接種時の菌液の H₂O₂ に対する抵抗性が両者を 1:1 の割合に混合した場合にも感性菌単独の場合に近い抵抗性を示した。

Pothmann¹¹⁾は INH 高度耐性になつても強い菌力を示すときはそれはその中に感性菌をふくむためであるといつており、Rist¹²⁾は臨床細菌学的に INH 耐性菌の無毒菌をだす患者も感性菌を喀出するから周囲ならびに自身に対しても安全とはいえないという。私も第 1~4 報にいたる成績から INH 耐性菌はハツカネズミに対してたしかに感性菌より菌力が劣つていたが、喀痰中には完全耐性になつても相当の感性菌の混在がみと

められたことと、耐性菌になつてもなおかなりの菌力を示すことから、患者の予後と周囲に対する感染の危険はさらに検討しなければならぬ問題であると思つている。

結 論

患者喀痰から分離された1代目のINH 10 γ /cc 耐性菌、0.1 γ /cc 耐性菌と感性菌とを人工的に10,000:1, 1,000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100の割合に混合した菌群のハツカネズミに対する菌力を全肺臓内生菌単位数で比較し、同時に混合菌群のH₂O₂に対する抵抗性を検討して次の結果をえた。

1) 菌力の弱い10 γ /cc 耐性菌と菌力のつよい感性菌とを混合して注射し4週後の肺臓内生菌単位数をみると、混合菌液1 mg/cc 中の生菌単位数が 17×10^5 であつた場合、感性菌が1%以下の割合にふくまれていると10 γ /cc 耐性菌に近い菌力を示し、これより感性菌の占める割合が多いと感性菌単独の場合に近い菌力を示すにいたる。感性菌の占める割合が1%以下であつたときはH₂O₂に対する抵抗性もH₂O₂作用後1 mg/cc 中の生菌単位数が 6×10^4 以下に減少していた。

2) いずれも菌力が劣つている10 γ /cc 耐性菌と感性菌とを種々の割合に混合して注射しても混合菌群の間

に菌力の変化はみられず、ただH₂O₂に対する抵抗性が両者を1:1の割合に混合した場合にも感性菌単独の場合に近い抵抗を示した。

終りに御校閲と御助言を賜りました群馬大学三橋進教授および御指導、御校閲を戴いた予研柳沢謙部長に深甚なる感謝の意を表し西野龍吉主任、内田達次博士の御援助を感謝します。

文 献

- 1) Steenken, W.: Am. Rev. Tub., 68: 548, 1953.
- 2) Peizer, L.: Am. Rev. Tub., 70: 728, 1954.
- 3) Meissner, G.: Beit. Klin. Tbk., 110: 538, 1953.
- 4) 勝山茂: 医学と生物学, 35: 142, 昭30.
- 5) 加藤允彦: 医学と生物学, 37: 161, 昭30.
- 6) Giernez, R.: Ann. Inst. Pasteur, 6: 1, 1953.
- 7) 米山英子: 九大結研紀要, 2: 179, 昭30.
- 8) Meissner, G.: Beit. Klin. Tbk., 113: 62, 1955.
- 9) 佐藤直行: 結核, 29: 393, 昭29.
- 10) 佐藤直行: 結核, 30: 119, 昭30.
- 11) Pothmann, F.: Dtsch. Med. Wschr., 82: 292, 1957.
- 12) Rist, N.: Rev. de la Tub., 19: 659, 1956.