

ストレプトマイシン耐性結核菌の被喰燻性に関する実験的観察 (その2)

丸 野 秀 親

京都大学医学部外科科学教室第2講座 (指導 青柳安誠教授)

国立兵庫療養所 (所長 小川吾七郎博士)

受付 昭和35年1月15日

III SM 耐性弱毒人型結核菌フランクフルト株の被喰燻性

前章までの実験によつて、人 F 株を遞増的 SM 加 Dubos 培地に継代培養するときは、当該菌は SM に対して急速容易に耐性を獲得するが、その耐性は復帰しにくく、耐性期が長くなるにつれて毒力の減弱が認められるが、復元期に入った場合には、感受性の差が著明であるにもかかわらず、毒力の差は見出しえないことを知った。そこで、これら一連の菌株は、白血球によりどのような喰燻作用をうけるものであるかを検討した。

1) 試験管内被喰燻現象

(実験材料)

- i) SM 耐性期株：耐性 5 代, 10代, 15代, 23代, 25代株。
- ii) 復元期耐性株：復元 1 代, 5 代, 10代, 18代, 20代, 25代株。
- iii) 対照株：被検菌と同世代継代培養した母菌人 F 株。
- iv) 白血球浮游液：滅菌中性肉汁 10cc を体重 300 ないし 500 g の健常海鯊の腹腔内に注入し、4 ないし 5 時間後、毛細管ピペットで混濁した腹水を無菌的に採取し、そのままただちに使用した。

(実験方法)

上記菌液を生食で 2 回よく洗滌したのち、菌量が 1 cc 中 3 度目となるように生食をもつて調整し、被喰燻現象の検索は教室考案のライト法変法に従った。すなわち、ライトの毛細管ピペットに調整後の生菌浮游液と白血球浮游液とをそれぞれ指標の処まで吸入、一度時計皿に出して十分混和し、この混合液をふたたびピペット中に封入し 37°C, 20 分間保温ののち、ふたたびよく混和して、ただちに塗抹標本を作成した。急速に乾燥し、メチルアルコールで固定、その染色には、鎌田²⁸⁾の行つたように、まず石炭酸フクシンによる微加温染色を 3 分間行い、ついで 3% 塩酸アルコールで脱色、水洗、後染色には Manson の Methylene blau 液の 50 倍稀釈液を用い、30 分間染色を行つた。そして、その程度の判定には、勝呂²⁹⁾の提唱による喰菌子数 (「喰」すなわち現

に細菌を包喰している細胞数と、「菌」すなわち現に包喰されている細菌数との和) の測定を行い、母菌株による喰菌子数を基準 (1.0) とした喰菌子係数をもつて現わした。検鏡にあつては、中性多核白血球の輪廓が正しくよく染色し、かつ孤立したもののみを 100 個検査し、菌体は正しく白血球内に包喰されたもののみを計算した。ただし、1 個の白血球中 5 個以上の菌を包喰したものは、誤算のおそれがあるので除外し、また白血球と菌との比例がはなはだしく異なっている視野にあるものは除外して計算した。なお、同一操作はいずれもおのおの 3 回行い、その平均値を求めた。

(実験成績)

表 9 に示すように、耐性期株は白血球による被喰燻性が対照のそれにくらべ充進しているのが認められ、耐性期が長くなるにつれてその程度が増加するようにみうけられたが、復元期株では対照との間に有意の差は見出しえなかつた。このさい、耐性期株の被喰燻性の充進は、実験に供した耐性期株は SM 含有培地に発育したものを、生食にて洗滌しただけでそのままただちに使用しているのち、SM に浸漬せられたための影響も考えられ、それをたしかめる意味で次の実験を行つた。すなわち、被喰燻性の明らかに充進のみられた耐性 25 代株を無 SM Dubos 培地に 1 代継代し、その菌株の被喰燻性を対照母菌株 (継代 26 代) のそれと比較してみると、両者間に有意の差は認めえなかつた。

2) 生体内被喰燻現象

上述のように、試験管内においては、人 F 株が SM 耐性期にある場合には被喰燻性の充進が認められ、復元過程に入ったときには母菌株との間に有意の差を認めなかつたが、これは生体外にとりだされ、一定の条件のもとに、もはやそれ以上増加も減少もなしえぬ一定数の多核白血球のみについての実験成績である。そこで、SM 耐性菌が生体内に生じた場合、あるいは新たに生体に侵入した場合、生体の反応、とくにその防禦機能はしからざる結核菌の侵入したときにくらべて、異なっているか否かを検討する意味で、次の実験を試みた。

a) 実験 1

(実験材料)

表9 試験管内結核菌喰盡率

菌株 継代数	被 検 菌			対 照 母 菌			喰菌子 係 数
	喰	菌	子	喰	菌	子	
耐性5代	35	87	122	33	61	94	1.29
耐性10代	39	91	130	36	62	98	1.32
耐性15代	44	109	153	39	76	115	1.33
耐性23代	42	115	157	40	76	116	1.35
耐性25代	45	122	165	39	78	117	1.41
復元1代	34	64	98	35	61	96	1.02
復元5代	37	53	90	36	62	98	0.91
復元10代	40	81	121	39	76	115	1.05
復元18代	44	80	124	40	76	116	1.07
復元20代	41	76	117	39	78	117	1.0
復元25代	44	81	125	45	95	138	0.91
耐性25代の 復元1代株	37	81	118	39	84	123	0.96

- i) SM耐性期株：耐性 15 代株。
- ii) 復元期耐性株：復元 10 代株。
- iii) 対照株：被検菌と同世代継代せる母菌人F株。
- iv) 試獣：体重 1.9 kg 前後の健常家兔。

被検菌および母菌の SM に対する感受性は、耐性 15 代株は無 SM 培地より SM 含有培地の方に発育が旺盛であるような 1,000 γ 耐性株。復元 10 代株も同様に 1,000 γ 耐性株であるが、部分的には耐性の減弱ないし復帰が察知せられる。

(実験方法)

上記の菌液を生食にて2回十分に洗滌したのち、per kg 10 度目の割合で家兔の耳静脈より注入し、注入後1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間、以後毎日、4週間にわたり、これら試獣の体重、白血球数、ヘモグラム、白血球の結核菌喰盡率を追究した。喰盡率の判定には勝呂²⁹⁾の行つた血行内喰菌作用測定法に従い、流血中の全白血球を500個計上し、この中に喰盡された喰菌子数から結核菌喰盡率を求め比較観察した。さらに4週後に、これらを屠殺剖検し、肺、肝、脾、腎の4臓器につき、肉眼的所見を比較観察し、ついで小川法³⁰⁾に従つて各臓器の定量培養を行い、生菌数を比較するとともに、各臓器の組織標本を作成し、隈部アミン水フクシン染色法³¹⁾を行つて比較検討を加えた。

(実験成績ならびに考察)

表10のごとき成績をえた。すなわち、

- i) 体重：いずれの群においても漸次減少したが、耐性 15 代株群が他群に比べて減少程度が軽度であつた。

- ii) 白血球数：全群とも菌注入後は急速に増加し、6時間で最高値に達するが、12時間以後には漸次減少して、2日目は全群とも菌注入前より低値となつた。そして10~14日後、ふたたび軽度の上昇を認めた。全般的には耐性 15 代株群が変化が軽度で、復元 10 代株と対照株では有意の差を見出しえなかつた。勝呂²⁹⁾によれば一定限度の毒力の範囲内においては、白血球の増加程度と抗原物質の毒力とはほぼ相連行するものであるといつてはいるが、耐性 15 代株の白血球の増加は対照に比べて軽度で、復元 10 代株では対照と接近していることが明らかに認められたが、これは結局、前章 4) に記載のごとく、耐性期株は毒性が減弱し、復元過程に入ると毒性の差は認められないことと同一の傾向を示すものである。

- iii) 中性多核白血球の百分率推移：全群とも菌注入直後より著明に増加しはじめ、2~3時間で最高に達した。ついでおおむね前記白血球数の変化と並行的に減少し、全群ともほぼ同様の曲線を描き、両被検菌と対照菌との間に有意の差は認められなかつた。なお、大単核球および移行型は2日目ころより増加の傾向が認められた。

- iv) 結核菌喰盡率：喰盡現象は主として24時間以内に、もつぱら中性多核白血球によつて営まれるのを観察したが、24時間以内の総喰菌係数は表11(その1)のごとく、耐性 15 代株注入のものが充進し、対照との間に差を認めたが、対照株と復元 10 代株との間には有意の差を認めえなかつた。この点のみからすれば、耐性期株の侵入は、しからざる結核菌の侵入よりも生体にとっては好都合であるが、復元期耐性株の場合には、かかることはいいえないことになる。

- v) 臓器病変ならびに臓器定量培養：表12、写真5~7に示すように、全般的に生菌数も少なく、病変も軽微であつたが、なかんずく、耐性 15 代株接種のものは病変も集落数もさらに軽度で、復元 10 代株ならびに対照株群は前者と比較すると病的所見が認められ、集落数も多かつた。

b) 実験2

前記実験を補強する意味で、前実験に用いた菌株よりもさらに継代を重ねた耐性期株および復元期耐性株について、その結核菌喰盡率に検討を加えた。

(実験材料)

- i) SM耐性期株：耐性 20 代、25 代株。
- ii) 復元期耐性株：復元 15 代、20 代株。
- iii) 対照株：被検菌と同世代継代せる母菌人F株。
- iv) 試獣：体重 2 kg 前後の健常家兔。

(実験方法ならびに成績)

前回と同様に被検菌を家兔の静脈内に注入した場合の24時間以内の総喰菌係数は、表11(その1)に示すように、耐性期株は対照にくらべ明らかに充進を示し、耐性期が長くなるにつれて、その率が増すようであつた。

表 10 生 体 内 被 喰 噬 現 象

経過時間	継 代 15 代 母 菌 株				復 元 10 代 株				耐 性 15 代 株					
	体重 g	白血球数	淋巴球	中性多核白血球	体重 g	白血球数	淋巴球	中性多核白血球	体重 g	白血球数	淋巴球	中性多核白血球	好酸球	好塩基球
菌注入前	1,920	6,200	76	0	1,900	5,800	22	0	1,870	5,200	26	73	0	0
注 入 後														
2	8,470	66 (3-4)	32.8	0.2	8,203	62.6(2-5)	37.2	0.2	8,700	64.8(4-10)	45.2	0	0	
3	8,800	80.2(5-9)	19.2	0	12,000	66.4(4-8)	33	0.6	7,200	74.8(4-11)	25.2	0	0	
6	11,000	77.8(2-5)	21.4	0.6	11,400	77 (3-4)	22.6	0.2	6,000	65.2(2-6)	34.4	0.2	0	
12	14,700	58 (2-6)	40.8	0.6	15,200	67.8(3-5)	31	0.8	9,800	70.2(5-6)	29.6	0.2	0	
24	12,000	47.2(3-6)	50.8	1.2	14,500	63.2(3-5)	39.0	0.8	8,700	64.4(3-9)	35.6(1-1)	0	0	
2 日	1,950	7,200	38.8(2-2)	0.6	1,850	8,200	47.2(1-2)	0.8	1,903	6.203	35.2(1-1)	64.8	0	0
4	1,900	4,600	16.2	3.2	1,840	4,600	17.2	0	1,92	3,400	15.2	79.8	3.2	1.8
6	1,940	4,000	20.2	2.4	1,880	4,600	28.2	0	1,953	4,000	23.2	74.6	2.2	0
10	1,890	6,500	13.2	11.6	1,873	6,700	27.8	0	1,963	4,200	21.2	78	0.6	0.2
14	1,850	7,100	21.8(1-1)	11.2	1,850	5,800	35	0	1,960	5,500	13.2	86.6	0	0
18	1,740	7,900	24.8	3.2	1,763	8,100	27.4	0.8	1,890	5,500	35.8	56.2	7.8	0
22	1,750	3,700	13.2	6.2	1,720	6,400	34.8	0	1,893	5,300	28.8(1-1)	65.6	5.6	0
28	1,590	4,170	30.4	2.2	1,720	5,300	29.2	0	1,810	4,000	30.8	61.8	7.4	0
				3	1,540	5,800	42.8	0.4	1,750	5,200	22.2	73.2	4.6	0

() 内の数字は「喰」および「菌」

表 11 その 1 生 体 内 結 核 菌 喰 噬 率

経過時間	継代15代母菌株		復元10代株		耐性15代株		継代20代株		耐性20代株		継代25代株		耐性25代株														
	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子													
1 時間	5	4	7	2	3	5	4	10	14	3	3	6	2	4	6	3	4	7	4	7	11						
2	5	9	14	4	8	12	4	11	15	5	7	12	6	7	13	6	10	16	4	7	11	5	13	18			
3	2	3	5	3	4	7	2	6	8	3	4	7	3	3	6	4	6	10	2	4	6	3	5	8			
6	2	6	8	3	5	8	3	6	9	3	5	8	4	6	10	4	5	9	3	4	7	2	3	5	8		
12	3	6	9	3	5	8	4	10	14	2	3	5	2	4	6	3	3	6	2	5	7	4	6	10			
24	2	2	4	1	2	3	1	1	2	2	2	4	1	2	3	2	3	5	2	2	4	1	2	3	4		
計	17	30	47	16	27	43	18	44	62	18	24	42	18	26	44	22	35	57	16	25	41	16	26	42	21	39	60
喰菌係数	1	0.91	1.32	1	1.04	1.35	1	1.02	1.46	0.92	1.35	1	1.02	1.46	0.92	1.35	1	1.02	1.46	0.92	1.35	1	1.02	1.46	0.92		

表 11 その 2

経過時間	菌 株		耐性35代の復元1代株			
	喰菌子	喰菌子	喰菌子	喰菌子		
1 時間	2	2	4	2	3	5
2	7	9	16	7	11	18
3	6	7	13	2	5	7
6	3	7	10	4	6	10
12	3	5	8	3	6	9
24	2	4	6	1	2	3
計	57	57	57	57	57	57
喰菌係数	1	0.92	1	0.92	1	0.92

表 12 臓器内病変および定量培養

臓器 菌株	肺		肝		脾				腎	
	集落数	組病 織変	集落数	病変	集落数	病変	大きさ (mm)	重量 (g)	集落数	病変
耐性15代株	0.4	-	0	-	0.2	±	43×8	1.2	0	-
復元10代株	19.8	+	9.6	±	8.2	≠	54×8	1.6	1.7	±
継代15代母菌株	33.8	+	6.0	±	2.4	+	54×8	1.7	3.7	±
耐性35代の 復元1代株	11.7	+	1.2	±	2.8	+	59×13	3.2	1.3	±
継代36代母菌株	11	+	1.8	±	1.3	+	55×10	2.6	0.8	±

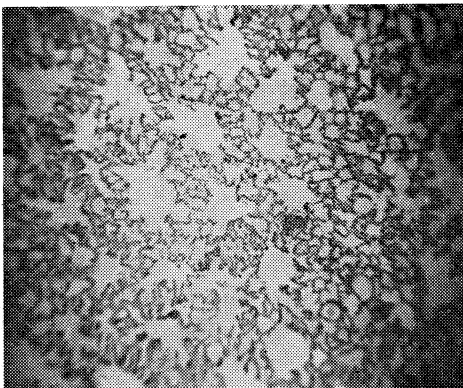


写真 5 耐性15代株接種家兎の肺所見

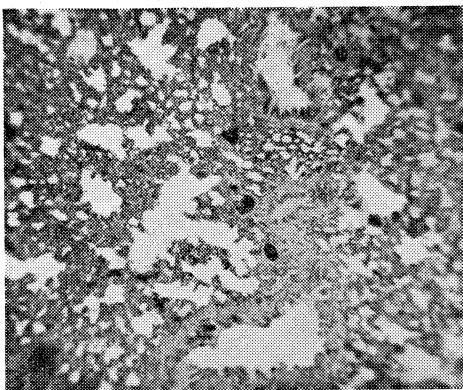


写真 6 復元10代株接種家兎の肺所見

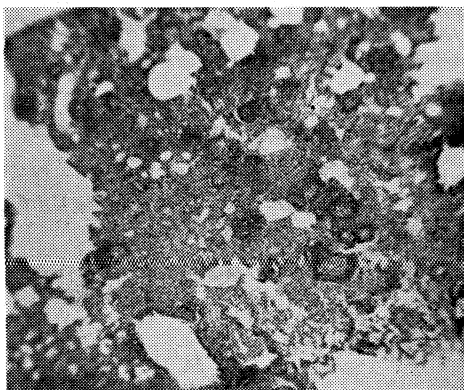


写真 7 継代15代対照母菌株接種家兎の肺所見

が、復元期株では明らかに耐性を維持しているにもかかわらず、対照との間に有意の差は認められず、前回の実験と同様の傾向が観察せられた。

c) 実験 3

前記実験において、耐性期株は被喰嚙性の亢進がみられたが、いずれも耐性培地に発育したものを、既述のごとく洗滌するだけでただちに使用したがためとも考えられるので、この点につき検討を加えてみた。

(実験材料)

i) 被検菌：耐性 35 代株を無 SM Dubos 培地に 1 代接種培養したもの。

ii) 対照株：被検菌と同世代（継代 36 代）継代せる母菌人 F 株。

iii) 試験：体重 2.2 kg 前後の健全家兎。

被検菌ならびに母菌株の SM に対する感受性は、被検菌は明らかに 1,000 γ 高耐性株であり、母菌株は 10 γ/cc 培地にも発育しえない感受性株である。

(実験方法ならびに成績)

前記実験と同様にして両者を比較検討し、つきのごとき成績をえた。すなわち、

i) 体重：両者とも漸次減少したが、両者間に特記すべき有意の差は観察しえなかつた。

ii) 白血球数：菌注入後急速に増加し、6 時間で最高値に達したが、その後漸次減少し、2 日目は菌注入前に復帰するのを認めた。さらに、6 日目ごろより上昇傾向を示したが、両者間に有意の差は観察しえなかつた。

iii) 中性多核白血球の百分率推移：注入後急速に上昇し、3 時間で最高に達し、2 日目には注入前に復帰するのをみたが、両者間に有意の差は観察しえなかつた。

iv) 結核菌喰嚙率：喰嚙現象は主として 24 時間以内に、もつぱら中性多核白血球によつて営まれるのを観察しえたが、24 時間以内の総喰嚙係数は表 11 (その 2) のごとく、2 時間目が最高値を示し、両者とも同様の曲線を描き、有意の差は見出しえなかつた。

v) 臓器病変ならびに臓器定量培養：表 12 に示すように全般的に生菌数少なく、病変も軽微であつたが、両者間に有意の差は見出しえなかつた。

以上のように、SM 耐性期株が一たん復元過程に入った場合には、明らかに感受性の差があるにもかかわらず、両者間に生体に及ぼす影響、毒性、被喰燻性において有意の差を見出しえなかつた。

IV 所見総括

Tween 80 を用いた Dubos 変法培地を作成し、弱毒人F株の Homogenous Culture を行い、結核菌の均等浮游液をえたが、

1. 人F株の SM 感受性は菌量が多ければ低く、菌量が少なければ高く発現する。

2. 人F株を増殖的 SM 加 Dubos 培地に継代培養するときは、該菌は急速に高度の SM 耐性を獲得する。そして、さらにこの菌株を SM 含有培地に継代培養するときは、一定濃度の SM 含有培地の方にかえつて発育が旺盛となるようになり、かかる菌株は SM を含まない培地に接種するか、試験を通過させると、このような傾向は著明に減少する。また、SM 耐性獲得株の耐性は安定して復帰しにくい。

3. SM 耐性獲得株の形態的变化は立証しえなかつた。

4. SM 耐性期株は母菌株に比べて増殖状態が劣性を示すが、復元過程に入ると差は認められず、いずれも発育曲線上の位相のずれは見出しえなかつた。

5. SM 耐性獲得株も母菌株と同様にツベルクリンアレルギーを与えることを知つた。

6. SM 耐性期株は同世代継代せる母菌株に比べて、毒性の減弱が認められるが、復元過程に入った場合、母菌株との間に明らかに感受性の差があるにもかかわらず、毒性には有意の差を見出しえなかつた。

7. SM 耐性期株の白血球による被喰燻性は、対照母菌株のそれよりも充進するが、一たん復元過程に入ると、長く耐性を維持するにもかかわらず母菌株との間に有意の差をみなかつた。

V 考 察

細菌が抗菌物質に対し耐性を獲得することは、多くの研究によつてすでに明らかなるところである。その例にもれず、人F株も容易にしかも急速に高度の SM 耐性を獲得する。そして、この耐性株を SM を含まない培地に接種継代した場合、部分的には耐性の復帰が認められるが、なお長期にわたり耐性を保持している。この獲得耐性復帰の点を他の抗菌物質の場合と比較すると、葡萄球菌、寺島株のペニシリン耐性においては、白羽³²⁾、中山¹⁾ および島田²⁾ によれば、ペニシリンから絶縁された場合、はじめ急速に、のちに緩慢に復帰すると報告し、寺島菌ならびに大腸菌のフェラシン耐性における小野³⁾ の観察によれば、耐性復帰はきわめて困難であると述べて

いる。一般に SM 耐性菌は安定であるといわれているが³³⁾、各種大腸菌 SM 耐性復帰に関する加藤³⁴⁾ の実験によれば、復帰傾向の乏しいものは、ほとんど直線的急上昇で耐性を獲得した場合のものであり、また、全然復帰を示さぬものは耐性獲得状況が途中において突然飛躍的に高度の耐性を示したもので、いわゆる突然変異を起したものと考えられるとしている。われわれの場合も、人F株は急上昇で耐性を獲得し、復帰しにくかつたが、一方、イソニコチン酸ヒドロラジット耐性結核菌は比較的速やかに耐性が失われるという点³⁵⁾ ³⁵⁾などを考え合わせると、SM 耐性人F株の場合は、結核菌の特異性としてではなく、SM の特殊な作用のもとに復帰が困難であると思惟される。

われわれは、SM 耐性期株の被喰燻性が復元期耐性株ならびに母菌株に比べて、明らかに充進を示し、毒性の減弱するのを認めた。W. Schmidt³⁶⁾ は感受性結核菌について、前処置として SM, P A S, T B₁ 液を接触させたものは、非接触の対照にくらべ被喰状態が促進し、薬剤との接触時間を長くすると喰菌率が高まつたことを認め、これらの化学療法剤は結核菌発育阻止作用と同時に、薬剤の侵襲をうけた結核菌が被喰容易な状態にあるものと推察している。われわれの耐性期株の場合、耐性培地に発育せるものを洗滌だけして、そのままただちに使用しているので、耐性期株中にはいわゆる依存株が存在し、ために被喰燻性の充進がみられ、復元過程に入ると、かかる菌株の混在が著減するために、対照との間に有意の差が認められなくなるとも考えられるが、それのみでなく、耐性菌においても W. Schmidt のいうごとく、薬剤の直接的影響による被喰燻性の充進も参与しているのではないかと思惟される。

VI 結 論

Dubos 変法培地による均等性結核菌浮游液を用いて、SM 耐性菌を作成し、その被喰燻性を母菌株のそれと比較検討したが、人F株は容易にしかも急速に SM 耐性を獲得する。しかもその耐性は復帰しにくい。耐性期株は被喰燻性の充進が認められたが、復元期に入った耐性株では母菌株との間に有意の差は認められなかつた。

稿を終るにのぞみ、終始御鞭撻ならびに御校閲賜わつた所長小川吾七郎博士、外科医長田村政司博士、種々御教示賜わつた荘司病院原頼博士、国立宇多野療養所鎌田正勝博士に謝意を表します。

なお、本研究は厚生省科学研究費の補助を受けた。記して謝意を表します。

引用文献

28) 鎌田：経静脈性脂肪輸入の結核菌喰燻作用に及ぼ

- 寸影響に関する実験的研究, 日本外科宝函, 23 : 594, 昭29.
- 29) 勝呂: 健康動物血行内に於ける喰菌作用に対する細菌純培養濾液の影響, 東京医学会雑誌, 38 : 208, 534, 大13.
- 30) 小川: 結核菌検索の基礎と応用, 保建同人社, 東京, 昭26.
- 31) 隈部: 人体内に於ける結核菌の生態, 保健同人社, 東京, 昭24.
- 32) 白羽: ペニシリンの局所応用に関する基礎的吟味, 抗菌物質研究, 2 : 47, 昭24.
- 33) 小酒井: 細菌の薬剤耐性, 医学書院, 東京, 昭30.
- 34) 加藤: 大腸菌のストレプトマイシン及びペニシリンに対する動態の研究, ペニシリン, 2 : 327, 昭24.
- 35) 佐藤: Isonicotinic acid hydrazide 耐性結核菌 population の継代培養による変動, 医学と生物学, 30 : 99, 昭30.
- 36) Schmidt, W.: Untersuchung über die Einwirkung moderner Tuberkulose Therapeutica auf mycobacterium tuberculosis unter besonderer Berücksichtigung der natürlichen (unspezifischen) phagocytose, Beitr. Klin. Tbc., 108 : 227, 1953.