

ハツカネズミ全身 homogenize 法による 人型結核菌イソニコチン酸ヒドロラジッド耐性株の菌力に関する研究

三木勝治・加藤允彦・松永清輝

国立療養所刀根山病院 (院長 渡辺三郎博士)

(指導 九州大学医学部 山村雄一教授)

受付 昭和 33 年 2 月 17 日

人型結核菌のイソニコチン酸ヒドロラジッド (INAH と略) 耐性株がテンジクネズミに対して病原性が減弱しているということが, Middlebrook¹⁾, Morse²⁾, Karlson³⁾ らによつて報告され, またハツカネズミを用いた成績^{2), 4)~8)}も種々報告されている。また, INAH 耐性菌のカタラーゼ活性が低下ないしは消失しているということについても幾多の報告^{9)~11)}がなされてきた。

しかしながら, これらの報告を総括してみても, その成績は必ずしも一致していないし, 病原性ないしは毒力の評価の方法にも一貫した考え方がみられず, さらにまた, INAH 耐性菌の耐性度, カタラーゼ活性, 毒力との間の相関についてはまだ一定の結論は得られないようである。

著者らは, 結核菌菌株の菌力を規定する 1 つの尺度としてハツカネズミ全身 homogenize 法を用いた実験^{12)~15)}を数年来行つてきたが, これによつて, 1 つの閉鎖した系としての宿主体内における感染菌の全 population の消長を種々の菌株について観察したが, 毒力株と非毒力株との間にそれぞれ特異的な population 消長のパターンを得ることができた。そこで, この方法を用いて耐性株の菌力を検討し, 同時にそれら菌株のカタラーゼ活性を測定して, 各菌株の INAH 耐性度との間に一定の相互関係がみられるかどうかを追究した。

実験方法

1. 使用菌株: 人型結核菌 INAH 耐性株としては GB 株, MD 株, RA 株 (いずれも伝染病研究所 北本氏により分離されたもの), ならびに水木 R 株の 4 株。(以上いずれも阪大竹尾結核研究所 庄司氏より分与をうけた。)

これらの INAH 耐性株の耐性度を 1% KH_2PO_4 小川培地上で検査した結果は次の通りである。

GB 株: > 50 γ (INAH 濃度 50 γ/ml までの培地上では対照培地とほぼ同数の集落数を生ずることを示す。以下同様)

MD 株: > 50 γ

RA 株: > 100 γ

水木 R 株: > 20 γ

ハツカネズミに対する菌力検定の対照として INAH 感受性 H_{37}Rv 株ならびに H_{37}Ra 株 (いずれも 1954 年に国立予防衛生研究所結核部から分与されたもので, 1% KH_2PO_4 小川培地に月 1 回継代保存しているもの) を使用した。

2. 使用動物: 体重 15g 前後の雄性ハツカネズミ (Na-2 系), 飼育は Oriental Pellet Diet MC 5 と水による。

3. 感染菌液の調製ならびに感染: 上記各菌株のソートン培地 3 週間培養の菌膜からガラスピーズ・フラスコ法により, それぞれ湿菌量 1 mg/ml の菌浮遊液を作り, 各菌株につき 10 匹ずつのハツカネズミに尾静脈内にそれぞれ 0.3 ml ずつ注入した。一方, この使用菌液を 1% KH_2PO_4 培地に接種して集落数を測定し, ハツカネズミ体内に注入された生菌単位数を計算した。

4. 全身中生菌単位数の測定: 感染後 24 時間, 1 週, 2 週, 4 週, 6 週後にそれぞれの感染動物群から 2 匹ずつとりだして殺し, 全身 homogenize 法⁹⁾に従つてハツカネズミの全身 homogenate を 1% KH_2PO_4 小川培地を用いて培養し, 感染後の各時期における全身中の生菌単位数を測定した。

5. カタラーゼ活性の測定: 各供試菌株のソートン培地 3 週間培養菌膜を滅菌蒸留水にて洗滌, 濾紙にて脱湿, 秤量したのち, Potter-Elvehjem のガラスホモジナイザーを用いて約 7 分間, 氷冷しつつ磨砕し, 100 mg (湿量) / ml の割合に生理的食塩水に浮遊させたものを酵素液として用い, Von Euler and Josephson¹⁶⁾ の方法に従つてカタラーゼ活性を測定した。すなわち, 0.01 N の割合に過酸化水素を含む磷酸緩衝液 (M/150 溶液, pH 6.8) 50 ml を 0°C に氷冷しておき, これに 1 ml の前記酵素液を添加する。添加後 2 分ごとに反応液中より 5 ml を採取しただちに 5 ml の 2 N 硫酸液中にできるだけ速やかに注入し, 酵素作用を停止せしめ, そのおのおのについて N/200 KMnO_4 溶液を用いて淡紅色となるまで滴定する。このとき得られる滴定値から, 次式に従つて 1 次反応速度恒数 K を求めることができる。

$$K = \frac{1}{2} \times \frac{1}{3} \left(\log \frac{a_1}{a_2} + \log \frac{a_2}{a_3} + \log \frac{a_3}{a_4} \right)$$

$a_1, a_2 \dots$ は二分ごとの $N/200 \text{ KMnO}_4$ 滴定量次に、別に使用酵素液の 1 ml を時計皿上にとつておいたものを、約 90°C にて数時間乾燥し、のち乾燥器中にて1昼夜乾燥して乾燥量を計測する。この乾燥量のグラム数で上記の1次反応速度恒数 K を除した値をもつて Kat. f. 値 ($\text{Katalase fähigkeit}$ の略) とする。

実験成績

1. ハツカネズミ全身中生菌単位数の推移：各菌株のハツカネズミに対する接種生菌単位数ならびに接種後の各時期において計測された全身中生菌単位数を表1に示す。これによつて明らかなように、最初に注入された菌

表1 ハツカネズミ全身より回復された生菌単位数

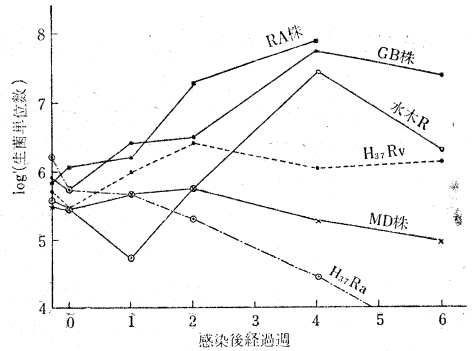
菌株	接種後経過 接種生菌単位数	接種後経過				
		24時間	1週	2週	4週	6週
GB株	8.0×10^5	3.8×10^5	1.9×10^6	9.8×10^5	1.6×10^8	7.3×10^7
		7.7×10^5	3.4×10^6	1.0×10^7	1.8×10^7	7.2×10^6
MD株	3.0×10^5	3.4×10^5	4.1×10^6	4.9×10^5	1.4×10^6	9.9×10^4
		2.1×10^5	4.4×10^6	6.1×10^5	2.4×10^5	— *1
RA株	7.6×10^5	1.4×10^6	2.5×10^6	3.0×10^7	1.1×10^8	— *2
		1.1×10^6	1.0×10^6	1.2×10^7	5.6×10^7	— *3
水木R株	3.6×10^5	3.1×10^5	5.8×10^4	7.6×10^5	1.5×10^7	2.0×10^6
		2.8×10^5	4.7×10^4	4.1×10^5	4.6×10^7	1.8×10^6
H ₃₇ Rv	4.9×10^6	1.1×10^6	9.8×10^5	8.2×10^6	1.1×10^6	1.3×10^6
		6.2×10^5	9.7×10^5	8.8×10^6	1.0×10^6	— *4
H ₃₇ Ra	1.6×10^6	4.8×10^5	5.5×10^5	1.6×10^5	3.1×10^4	3.0×10^3
		6.2×10^5	3.6×10^5	2.2×10^5	2.3×10^5	$< 7.0 \times 10^2$

* 1 : 培養操作上の事故により計算できず
* 2, 3, 4 : 動物死亡のため計測不能

量は各菌株ともその生菌単位数においてもほぼ 10^5 の order に揃つているといえる。RA 株接種群の動物は接種後4週から6週にいたる間に2匹死亡したため、4週までの成績しか得られていない。また、H₃₇Rv 群も5週前後に1匹死亡したため、6週の成績は1匹についてのみ得られたものである。上記以外の各群では実験期間中死亡したものはなかつた。各欄に示す2匹ずつの値の平均値の対数を取り、全実験期間6週までの推移を図に示すと図1の通りである。これによつて供試の各 INAH 耐性株の菌数推移を対照の有毒株 H₃₇Rv ならびに無毒株 H₃₇Ra のそれと比較すると、それぞれの菌力水準がよくうかがえる。すなわち RA 株、GB 株、水木 R 株の順にいずれも H₃₇Rv 株よりも高い菌力を示し、MD 株だけはやや無毒株 H₃₇Ra に近い菌力を示すものといえる。

2. 各菌株のカタラーゼ活性：実験方法の項に記述した通り、おのおのの菌株について Kat. f. 値を測定したが、その成績は表2に示す通りである。すなわち、4つ

図1 全身中生菌単位数の推移



の供試 INAH 耐性株はいずれも、対照の H₃₇Rv と比較してカタラーゼ活性はいちじるしく低下もしくは消失しているといえる

表2 各菌株のカタラーゼ活性

菌 株	Kat. f. 値	活性の判定
G B 株	< 0.011	(-)
M D 株	< 0.014	(-)
R A 株	< 0.014	(-)
水木R株	< 0.012	(-)
H ₃₇ Rv	0.388	(+)

考 察

一般に、結核菌菌株の病原性の強弱を評価するに当つては、厳密に規定された条件のもとにおける宿主寄生体関係のあらわれとしてとらえられなければならないとする立場から、菌力という概念が使われるようになってきた。一定の細菌が単に生物としての存在から、さらに病原性細菌としての属性が与えられるためには必ずそれに対する宿主が規定条件として設定されなければ、単に病原性・非病原性という類別は意味がないと思われる。したがつて、一定の動物を宿主としてえらんで行つた菌力実験の結果からただちに、用いられた菌株の病原性(人に対する)を論ずることはできない。ただ、実験上のいろいろの特性がすでに検討されているような既知菌株を標準として、一定の条件のもとに菌力を比較する場合、ある程度病原性を論ずる根拠となりうるのではなからうか。このような考えから、本実験においては任意にえらんだ少数例の INAH 耐性株について、その菌力を全身 homogenize 法を用いて検討したわけである。この方法による菌力の測定に関しては、種々の抗酸性菌株について実験をかきねてその成績はすでに報告^{12, 14, 15}している。今回の INAH 耐性株の菌力に関する成績をみると、用いた4つの耐性株のうち3つまでは、対照としてえらんだ人型結核菌毒力株 H₃₇Rv よりも高い菌力水準

を示しており、しかも、その順位は INAH 耐性度とは併行していない。このことは、もちろん、ここに用いた INAH 耐性株の Parent 株そのものに元来、菌力の差異が存していた結果によることが考えられる。しかしながら、少なくとも任意にとりあげた INAH 耐性株相互の間に、その INAH 耐性度から菌力の差異を推定することの妥当でないことを示している。ことに、RA 株については、ハツカネズミに対して、既知の実験室内保存人型菌株のどれにもみられなかつたほどの高い菌力がみとめられる。しかも、この菌株の小川培地上における耐性度検査の成績をみると、50 γ/ml の INAH 濃度にいたるまでのすべての検査濃度において、INAH を含まぬ対照培地に比し発育集落数の差はみとめられない (100 γ/ml では発育集落数は対照の約 70%)。したがって少数の感性菌の混在ということも考えられない。

次に、これら INAH 耐性株のカタラーゼ活性との関係を見ると、われわれの用いた活性測定方法において対照の $H_{37}Rv$ 株では明らかに活性がみとめられるにもかかわらず、INAH 耐性株については供試 4 株ともカタラーゼ活性は検出されなかつた。

Cohn, Middlebrook ら^{7, 8)}は INAH 耐性菌は Catalase test の陽性陰性とテンジクネズミに対する菌力の強弱とは併行するが、ハツカネズミに対しては Catalase test 陰性の INAH 耐性菌でも virulent であると報告している。そのほか、Bloch⁵⁾, Hobby⁶⁾, Karlson⁴⁾らも静脈内感染の場合 INAH 耐性菌でもハツカネズミに対して virulent であるという成績をだしている。一方、INAH に対する感受性ということとは無関係に、一般にあらゆる抗酸菌のカタラーゼ活性を比較してみた場合、人型、牛型結核菌は、鳥型菌にくらべてカタラーゼ活性は弱く、非病原性抗酸菌はもつとも強いとされており^{17) 18)}、人型結核菌無毒株 $H_{37}Ra$ や牛型弱毒菌 BCG についてカタラーゼテストを行つても陽性であることが報告されている¹⁹⁾。

以上の諸成績ならびに今回のわれわれの実験成績を考え合わせると、結局、1つの INAH 耐性株をとりあげた場合、そのカタラーゼ活性の有無や INAH に対する耐性度のいずれからも一義的にその病原性を評価することはできないことは確かであろう。

結 論

4 株の人型結核菌 INAH 耐性株について、そのハツカネズミに対する菌力を全身 homogenize 法を用いて測定し、人型結核菌毒力株 $H_{37}Rv$ ならびに無毒株 $H_{37}Ra$ を対照として比較した。また、各菌株のカタラーゼ活性

の測定を合わせ行つた。その結果は、INAH 耐性株はその INAH に対する耐性度ならびにカタラーゼ活性とは無関係にハツカネズミに対して強い菌力水準を示すものがあり、いずれの in vitro test の結果からも、INAH 耐性株の病原性を評価することはできないことをたしかめた。

本実験は九州大学医学部教授山村雄一博士の直接指導のもとに行われたことを記し、感謝の意を捧げる。また菌株の分与を賜つた大阪大学竹尾結核研究所庄司宏博士に深謝する。

文 献

- 1) Middlebrook, G. & Cohn, M.L. : Science, 118 : 297, 1953.
- 2) Morse, W.C., Weiser, O.L., Kuhns, D.M., Fusilio, M., Dail, M.C. & Evans, J.R. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 464, 1954.
- 3) Karlson, A.G. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 531, 1954.
- 4) Karlson, A.G. & Ikemi, Y. : Proc. Mayo Clin., 29 : 119, 1954.
- 5) Bloch, H., Widelock, D. & Peizer, L.R. : Amer. Rev. Tuberc., 68 : 734, 1953.
- 6) Hobby, G.L. & Lanert, T.F. : Amer. Rev. Tuberc., 65 : 771, 1952.
- 7) Cohn, M.L., Kovitz, C., Oda, U. & Middlebrook, G. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 8) 佐藤直行 : 結核, 30 : 455, 昭30.
- 9) Middlebrook, G. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 10) Middlebrook, G., Cohn, M.L. & Schaefer, W.B. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 852, 1954.
- 11) 豊原希一 : 結核, 32 : 501, 昭32.
- 12) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝 : 結核, 30 : 638, 昭30.
- 13) 加藤・三木・松永 : 結核, 31 : 158, 昭31.
- 14) 加藤・三木・松永 : 結核, 32 : 472, 昭32.
- 15) 加藤・三木・松永 : 結核, 32 : 557, 昭32.
- 16) Euler, H. von & Josephson, K. : Ann., 452 : 158, 1927.
- 17) 占部 : 日本微生物誌, 27 : 956, 昭8.
- 18) Finlayson & Edson : Trans. Roy. Soc., 77 : 284, 1949.
- 19) 橋本達一郎 : 医学と生物学, 31 : 115, 昭20.