

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 1 報 耐性度と菌力の関係について

杉 本 一

国立療養所大日向荘

受付 昭和 33 年 3 月 3 日

結 言

結核菌の有毒無毒という菌力についてモルモットでは I NH 耐性度と菌力の間に関係のある成績が多いがハツカネズミではしからずとするものもかなりある。菌力とは 1 コの細菌のもつ毒性分および宿主の中での増殖力をもつて表現されるが、私は I NH 耐性菌の菌力を位置づけるために一般に療養所で施行されているところの直接法によつて判定された耐性菌、感性菌のおのおのを対照としてハツカネズミの肺臓内における生菌数の増殖をもつて目標とした。そしてこれらの菌群の菌力を比較分析するとともに I NH 治療および非治療患者の喀痰中結核菌について耐性度とその推移を 6 カ月間観察し、それらの菌群のハツカネズミに対する菌力の変化についても検討した。

研究対象

1. 結核患者 54 例の I NH 耐性検査をおこないのおのおの培地からえられた菌群のハツカネズミに対する動物実験をおこなつた。
2. 54 例のうち 28 例はとくに 6 カ月間耐性の推移を観察するとともにハツカネズミに対する菌力の変化についても検討した。
3. 静的観察では 54 例とともに 28 例の中で 6 カ月間動的に観察したものをもそれぞれ加えて対象とし合計 175 例について検討した。

研究方法

1. 実験に使用したハツカネズミは体重 20 g 前後の白色 dd 系の同性 (♀) である。
2. 使用菌群：I NH 耐性検査を月 1 回直接法によつておこない I NH 0γ, 0.1γ/cc, 1γ/cc, 10γ/cc の 4 種の 3% KH₂PO₄ 培地上で分離されたものである。完全耐性、不完全耐性の呼称は結核菌検査指針改正案にしたがつた。
3. 注射方法：すべて 3% KH₂PO₄ 培地、耐性培地上の 4 週間後の培養菌から 1 mg/cc の蒸留水浮遊菌液をつくり、0.01 mg (0.1cc 中) をハツカネズミの尾静

脈から注射した。注射した菌液は 1% KH₂PO₄ 培地に定量培養し生菌単位をもとめた。

4. 培養方法：静脈注射後 4 週間後に各群 3 匹ずつ殺して剖検し、肉眼的に病変の有無をしらべたのちに肺臓を培養して生菌数を測定した。肺臓は左右で大体 0.2 g なので 1 検体 3 匹の全肺臓をあつめ 6 cc の 1% NaOH 溶液で臓器乳剤をつくり蒸留水で 10 倍段階の稀釈法によつて 0.1 mg/cc まで稀釈し、各稀釈段階の 3 段階を 0.1 cc ずつ 3 本の 1% KH₂PO₄ 培地に流した。37°C 培養 4 週後に数えられる集落数にもとづいてこれから肺臓 100 mg 内生菌数を算出した。なお I NH 耐性菌を接種した群では I NH 含有培地にも流して分離生菌の I NH 耐性度も検査した。

5. 判定：肺臓培養の最終稀釈段階の培養で集落数が多くて数えられない場合にはつぎの結核菌検査指針改正案¹⁾にしたがつた。

- 数 100 前後までのものは数える
- + 発生した集落がほぼ孤立しているが 100 コ以上の場合
 - ++ 培地表面の約 1/2 をしめ、発生集落がほとんど融合している場合
 - +++ 培地表面の約 3/4 をしめ、発生集落がほとんど融合している場合
 - ++++ 培地全面に発育をみる場合

研究成績

1) 完全耐性、不完全耐性の場合の臓器内生菌単位数臨床細菌学的に表現されている完全耐性、不完全耐性の場合の耐性培地および無 I NH 培地に培養された菌群を注射した場合の肺臓内生菌単位をみると表 1、図 1 となる。接種生菌単位は等しく $n \times 10^3$ ($10 < n < 100$) である。完全、不完全耐性をとわず 10γ/cc 耐性培地にはえたものはいずれも肺臓内生菌単位は 10¹ order 以下で少なく、直接法による無 I NH 培地にはえたものの中には感性菌と同様な菌力を示すものもみられるが、全体としては菌力の劣るものが多い。1γ/cc 耐性菌の場合は 10γ/cc 耐性菌群より強い菌力を示すものの割合が多く感性菌よりは劣るものの割合が多い。0.1γ/cc 耐性

表5 耐性不変群

経口的	耐性推移 γ/cc	10	1	0.1	0
		→ 10	→ 1	→ 0.1	→ 0
I NH服用		●●	○	○○○●	○○●●
服用せず		○○○○ ●●●●●	●		

表6 耐性上昇群

経口的	耐性推移 γ/cc	0	0	0	0.1	1	10不完	1不完
		→ 0.1	→ 1	→ 10	→ 10	→ 10	→ 10完	→ 1完
I NH服用		○●●	○○○	●●●	●●●	●●●		
服用せず		●				●●	●	●

耐性低下例：2例であるが 10 γ/cc 耐性から 1 γ/cc 耐性に低下した 1例ははじめ 10 γ/cc 耐性であったときは完全耐性であり、無 I NH 培地からの菌群も 10 γ/cc 耐性培地からの菌群も ハツカネズミ に対する菌力は肺臓内生菌単位数が 10³ order であったものが 1γ/cc 耐性になると、1γ/cc 耐性培地からの菌群は肺臓内生菌単位数は 10⁴ と多くなりさらに無 I NH 培地からの菌群は 10⁵ 以上を示し耐性低下につれて菌力は強くなった。またこの耐性低下の場合にはその前段階である 10 γ/cc 耐性菌の菌力はきわめて弱く、10 γ/cc 耐性持続の例の耐性菌の菌力より弱い菌力であった。10 γ/cc 完全耐性から 10 γ/cc 不完全耐性となつた例は無 I NH 培地の菌群の菌力は強くなり、10 γ/cc 耐性培地上の菌群の菌力は弱くなつてきた。

耐性不変例：9例であるが 10γ/cc 耐性を持続した 5例は菌力の変化もみられない。1 γ/cc 耐性をつづけた 1例は耐性培地上の菌群は 10⁴ の肺臓内生菌単位数をつづけ、無 I NH 培地上の菌群は 10⁵ をつづけた。0.1 γ/cc 耐性を持続した 1例と感性をつづけた 2例はいずれも菌力は不変で 10⁵ 以上の強い菌力をつづけた。

耐性上昇例：17例であるが I NH 感性から 0.1γ/cc 耐性に上昇した 3例はいずれも菌力は強く、両者の差異は少なかった。また感性から 1 γ/cc 耐性に上昇した 2例のうち 1例は菌力の変化はなく、他の 1例ははじめ肺臓内生菌単位数は 10⁵ 以上であったものが 1γ/cc 耐性になつたときは生菌数は少なくなり、耐性上昇につれて無 I NH 培地にはえた菌群も耐性培地の菌群も感性のときよりずつと劣つた菌力を示した。1γ/cc 不完全耐性から 1γ/cc 完全耐性になつた 1例も無 I NH 培地の菌群の菌力は不変で、耐性培地上の菌群の菌力はやや弱くなつた。感性から 10 γ/cc 耐性に上昇した 3例はいずれも無 I NH 培地上の菌群の菌力は不変であり、10 γ/cc 耐性培地上の菌群の菌力は感性菌より明らかに弱かつた。ま

た 0.1 γ/cc 耐性から 10 γ/cc 耐性に上昇した 3例では無 I NH 培地の菌群の菌力は不変であつたが耐性培地上の菌群はいずれも耐性上昇にしたか弱い菌力を示す傾向であつた。つぎに 1 γ/cc 耐性から 10 γ/cc 耐性に上昇した 4例では 2例が耐性度の上昇にしたか弱い菌力も弱くなり、2例が耐性度が上昇しても菌力は不変であつた。また 10 γ/cc 不完全耐性から 10γ/cc 完全耐性に上昇した例では菌力は不変であつた。

総括ならびに考察

ハツカネズミの実験的結核症に関して同系の性別はあまり影響がみとめられないといわれている^{2) 3)}。接種経路としては脳内接種、静脈注射、腹腔内注射、皮下注射などがあり死亡を目標とする場合には比較的大量の結核菌が接種されている^{4 5}。臓器内生菌数の動態をするために全身ホモジナイザー法を推奨するものもあるが^{6) 7) 8)}、阿部⁹はハツカネズミによる実験的結核症についてはその免疫効果判定には肺内の菌消長がもつとも参考となるようにのべている。佐藤¹⁰⁾はハツカネズミの臓器内生菌数の動態をするために 0.01~0.001mg の静脈内注射が適当であるとし 10³~10⁴ の生菌単位がはいるように実験をおこない、静脈注射後 4 週間後に肺では肝、脾とちがつて生菌数が最高値を示すことを発表した。

本実験では性別を同じうするハツカネズミを使用し、患者喀痰より分離された I NH 耐性菌、感性菌群が生菌単位では 10³~10⁵ の間にはいるように静脈注射をし 4 週間後の全肺臓内生菌数を算定し、とくに n × 10³ (10 < n < 100) の接種生菌単位のものについて感性菌、耐性菌群のハツカネズミに対する菌力を比較した。患者喀痰より分離された 10 γ/cc 耐性菌や 1 γ/cc 耐性菌群では 0.1 γ/cc 耐性菌および感性菌群にくらべて全肺臓内生菌数が少ないものも多く、一部に感性菌と同程度の菌力を示すものもみられ、これは 10 γ/cc 耐性菌より 1 γ/cc 耐性菌の方に多かつた。また 0.1 γ/cc 耐性菌群ではほとんど感性菌と同じ程度の菌力を示すこともわかつた。10 γ/cc 耐性菌の中には肺臓 100 mg 内の生菌単位が 10³ 以下の著しく菌力の劣るものもみられた。

I NH 耐性度の高さ と 菌力の間 に一定の関係のあることを最初に主張したものは Mitchison¹¹⁾ であり、以来 I NH 耐性菌中にはモルモットに対して弱毒のものが多くは多くのものにより証明されたが、モルモットに弱毒でもハツカネズミには有毒であるとの説が唱えられ耐性度とハツカネズミ臓器内生菌数の動態について明らかな関係が認められないというものが^{12)~18)}、これに反して一定の関係のあつたことを主張するものもある^{19)~22)}。佐藤も 10 γ/cc 耐性菌の菌力の低下をみとめ、また著明ではないが差をみとめたものもある^{23) 24)}。

Mitchison らは耐性菌と菌力の間には明らかな関係がないという報告を反ばくして実験方法の不備であることをあげている。すなわち、反対するものを用いた耐性菌は均一なものでなく、中に感性菌をふくんでいる可能性があることを強調している。この点を明らかにするために私の実験で 10^7 /cc 耐性菌群をみると、臨床的細菌検査で完全耐性と表現された場合でも無INH培地に培養された菌群は感性菌のみの場合より菌力が弱いものもあつたが、中には感性菌群と同じように強い菌力を示すものもあつた。これは臨床的細菌検査で完全耐性といつても無INH培地にはかなり感性菌が混つている可能性も考えなければならない。さらに不完全耐性の場合でも無INH培地からの菌群の場合にはより多くのものが感性菌の菌力に等しい点からも上記の考察の妥当性が考えられる。また 10^7 /cc 耐性を示す患者喀痰を 1^7 /cc 耐性培地にうえられた場合も 10^7 /cc 耐性培地に培養されたものより強い菌力を示すものが多く、 1^7 /cc 耐性培地にはえた菌群はより多くの感性菌をふくんでいることが推定された。私の成績では 10^7 /cc 耐性培地からの菌群で感性菌の菌力に等しいところの肺臓内生菌単位数が 10^5 以上を示すものはなかつた。Noufferd²⁵⁾は抵抗性つよくしかも感性菌と同じ強さの病変をハツカネズミに起した例をあげ強弱混合した不均等菌群の接種のためだろうといつている。要約して私の静的検査からは 10^7 /cc 耐性菌群はハツカネズミには有毒であるが感性菌よりはその菌力は弱いという見解である。

つぎにINH耐性の推移とハツカネズミに対する菌力を動的に観察した結果を検討してみる。INHに抵抗性を示す結核菌が菌力が劣ることは前述したが、長くINHを使用している患者の喀痰より分離された結核菌の菌力の変化についてはあまり発表されていない。INHを服用すると容易に耐性になることが知られているが²⁶⁾ ²⁷⁾、私の例では28例のうち16例が耐性度の上昇をみている。

まず耐性低下例をみると 10^7 /cc 耐性から 1^7 /cc 耐性になつたものでは耐性低下時にハツカネズミに対して菌力は強くなつてきている。またこの耐性低下の場合にはその前段階の 10^7 /cc 耐性菌の菌力は著しく弱く、同時に混在していた感性菌の菌力が強く、弱い耐性菌であるために増殖できずに消えていつたものと考えられる。佐藤²⁸⁾、小酒井²⁹⁾も同じような現象をモルモットに対する菌力で経験している。 10^7 /cc 完全耐性から 10^7 /cc 不完全耐性となつた例は不完全耐性となつた場合の無INH培地の菌群の菌力は強くなり、 10^7 /cc 耐性培地上の菌群の菌力は弱くなつたが耐性菌と混在する感性菌の増減が重要な意味をもつものと思われる。

耐性上昇群では感性菌から 0.1^7 /cc 耐性となつたものは菌力には変化なく、 1^7 /cc 耐性になつたものは2例

のうち1例が菌力が低下した。これが 10^7 /cc 耐性に上昇した例ではいずれも耐性菌群の菌力は低下したが無INH培地からの菌群の菌力は感性菌の場合と同じような強毒であるものもあり、したがつて喀出する患者喀痰中の菌力はなお相当つよい菌力であることがわかつた。 1^7 /cc 耐性から 10^7 /cc 耐性になつた場合には耐性度の上昇につれて菌力は弱くなるものと不変のものとは相半ばしていた。Meissner³⁰⁾はモルモットに対する菌力の変化を動的に観察しINH使用期間と菌力の関係をみてINH抵抗性の高いほど菌力の弱い例を多くみとめた。Rist³¹⁾は臨床的にみてINH耐性菌をだす患者は感性強毒菌も喀出するから周囲ならびに自身に対して安全とはいえないといつているが、私も6カ月間、 10^7 /cc 耐性持続例で混在する耐性菌と感性菌の菌力を比較して耐性菌は感性菌より弱い菌力をつづけていたが共存する感性菌は強力をつづけていた例を経験したことから耐性度の上昇にしたがい確かに耐性菌の菌力は弱くなるが、耐性の推移と患者の予後とは別の今後の問題であると思う。

結 論

肺結核患者の喀痰から分離したINH耐性菌と感性菌の175例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検討するとともに、28例を動的に6カ月間耐性の推移と平行して菌力の変化を観察した結果をえた。

1. 10^7 /cc 耐性菌群は感性菌より菌力は弱い。 1^7 /cc 耐性菌群になると感性菌と同じ程度の強い菌力を示すものの割合が多くなる。

2. 臨床細菌学的に完全耐性と表現された場合でも無INH培地に培養された菌群でも感性菌のみの場合より菌力が弱いものが多いが、中には感性菌と同じような強い菌力を示すものもある。不完全耐性の場合でも無INH培地からの菌群の場合にはより多くのものが感性菌の菌力に等しい菌力を示した。

3. 10^7 /cc 耐性培地にはえた菌群はいずれも感性菌の菌力よりは弱いだが、 10^7 /cc 耐性菌群で 1^7 /cc 耐性培地に培養された場合には感性菌の菌力に等しい菌力を示すものがみられた。

4. 同一患者の耐性の推移を動的にみた場合、 10^7 /cc 耐性から 1^7 /cc 耐性になつたときは耐性低下時に菌力は強くなり、これは 10^7 /cc 完全耐性から 10^7 /cc 不完全耐性になつた場合にもみられた。耐性度の上昇していく場合には菌力の弱くなるものが多い。

終りに御校閲と御助言を賜つ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部長、内田達次博士の御援助

を感謝します。

文 献

- 1) 柳沢謙：臨床病理，4：355，昭31.
- 2) Uesaka, I. : Jap. Journal of Tbc., 4 : 64, 1956.
- 3) Hoyt, A. : Am. Rev. Tub., 75 : 618, 1957.
- 4) Youmans, G. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 90 : 238, 1955.
- 5) Hoyt, A. : Am. Rev. Tub., 75 : 618, 1957.
- 6) 山村雄一：結核の臨床，3：575，昭30.
- 7) 加藤允彦：医学と生物学，37：161，昭30.
- 8) 加藤允彦：結核，32：557，昭32.
- 9) 阿部逸夫：結核，28：374，昭28.
- 10) 佐藤直行：結核，30：455，昭30.
- 11) Mitchison, D. : Brit. Med. J., 1 : 128, 1954.
- 12) Peizer, L. : Am. Rev. Tub., 68 : 290, 1953.
- 13) Steenken, W. : Am. Rev. Tub., 68 : 548, 1953.
- 14) Bloch, H. : Am. Rev. Tub., 68 : 734, 1953.
- 15) Karlson, A. : Proc. Mayo Clinic, 27 : 373, 1952.
- 16) Heilmeyer, L. : Ergeb. d Ges. Tbk. Forsch., XIII : 59, 1956.
- 17) 小坂久夫：医療，10：286，昭31.
- 18) 三浦幸三：結核，31：647，昭31.
- 19) Mitchison, D. : Am. Rev. Tub., 69 : 640, 1954.
- 20) Stewart, S. : Am. Rev. Tub., 69 : 641, 1954.
- 21) Lucchesi, M. : Riv. Tub. App. Resp., 3 : 323, 1955.
- 22) Gernetz, R. : Rev. de la Tub., 19 : 1, 1955.
- 23) 平野憲正：東京医事新誌，70：19，昭28.
- 24) 大岩弘治：日本細菌学雑誌，12：291，昭32.
- 25) Noufferd, H. : Ann. de L'inst. Pasteur, 88 : 325, 1955.
- 26) 熊谷博：抗研誌，8：278，昭28.
- 27) Baldmans, U. : Beit. Klin. Tub., 116 : 203, 1956.
- 28) 佐藤直行：結核，30：247，昭30.
- 29) 小酒井望：日結，16：573，昭32.
- 30) Meissner, G. : Beit. Klin. Tub., 113 : 280, 1955.
- 31) Rist, N. : Rev. de la Tub., 19 : 659, 1955.