

## INH 耐性菌のビルレンツに関する研究

## 第 1 報 全身ホモゲナイズ法によるマウスに対するビルレンツの検討

深津 睿知・藤田 暉通

東京大学伝染病研究所臨床研究部 (部長 北本 治)

伊豆 逋 信 病 院 (院長 山岡克己)

受 付 昭 和 33 年 4 月 21 日

## 緒 言

イソニコチン酸ヒドラジッド (INH) に対し耐性を獲得し、同時にカタラーゼ活性を失った結核菌がモルモットに対して virulence の低下を示すことについてはすでに多くの報告があるが<sup>1)~10)</sup>、マウスに対しては少数の例<sup>11)~13)</sup>を除いて静脈内接種法によつて virulence の減弱を認めないとする報告が多い<sup>4) 14)~17)</sup>。

1つの菌のある種の実験動物に対する virulence を一定条件下の host-parasite relationship として把握すれば<sup>8)</sup>、結核菌の種々の菌株の一定の宿主に対する病原性の差を検討するさい菌の接種量、接種時に菌のおかれる物理化学的諸条件、感染経路などを厳密に規正する必要があると同時に宿主側の諸条件についても慎重に考慮せねばならぬ。従来マウスにおける実験的結核症の判定規準として用いられてきた生存日数、各臓器内における結核菌の増殖状態およびその病理学的変化が必ずしも宿主の側のすべてを表現しているとは考えられない。

Rich は virulence を感受性をもつた動物の正常な個体内における菌の増殖能力と定義したが<sup>19)</sup>、加藤らは全身ホモゲナイズ法を用いマウスの全身中における接種菌の消長から H<sub>37</sub>Rv, Ra 株の間の virulence の相違を示している<sup>20)~23)</sup>。そこで結核菌の数種の標準株を用いてこの方法を追試し、さらに INH 耐性株のマウスに対する virulence を検討した。

## 実 験 方 法

1) マウス：結核菌に対し感受性の強い純系種の入手が困難なため、生後 7~9 週、体重 17~20 g の dd 系白色マウスを用いた。

2) 使用菌株：H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>Ra, BCG, H<sub>2</sub> および H<sub>2</sub> より分離した INH 耐性株 (H<sub>2</sub>-R INH) の 5 株を使用した。H<sub>2</sub>-R INH は INH 加 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地上で 10<sup>7</sup>/cc 完全、50<sup>7</sup>/cc 不完全の耐性を示した。いずれの株も 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に 3 ないし 4 代継代され、H<sub>2</sub>-R INH 株も 10<sup>7</sup>/cc INH 加鶏卵培地上に良好な発育を示した。

3) 感染方法：1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地上に 3 週間培養後発生した集落をかき取り滅菌蒸溜水で 2 回洗滌したのち、滅菌蒸溜水を加えマイクロガラスホモゲナイザーで 2 分間磨砕し、2,000 r.p.m. で 15 分間遠心して粗い菌塊を除いた。その上清をとり日立製の光電比色計により赤色フィルター No. 65 を用いて透過光を測定し、あらかじめ BCG で作った検量曲線から菌量 (湿菌量) を求めた。さらに滅菌蒸溜水を用いて稀釈し 0.3mg/cc の菌液を作り、その 0.2 cc をマウスの尾静脈内に接種した。なお塗抹標本を作りチール・ネールセン染色を行つて鏡検したが大多数の菌が単個菌の状態で菌液中の結核菌の分散状態は良好であつた。

4) 培養方法：感染後 2 日、1, 2, 4, 6 週後それぞれの接種群から各 3 匹ずつとり出し体重測定、剖検後剥皮し全身を細かく切断して 4 倍量の滅菌蒸溜水を加えてホモゲナイザー中で 3,000 r.p.m. 1 分半 ずつ 2 回ホモゲナイズし、その 5 cc に 2% NaOH 5 cc を加えてよく混和、すなわち 1% NaOH による全身組織の 10 倍稀釈液を作り、これを原液とし以下滅菌蒸溜水をもつて 10 倍段階稀釈法を 2 回行い、それぞれ 0.1 cc ずつ 3 本の 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に流した。培養は 37°C で 4 週間行い発生集落数を計算したが、4 週判定時集落発生を認めない培地はさらに 8 週まで保存観察し、マウスの全身中の生菌数を算出しその平均値を図示した。

5) カタラーゼ活性測定法：発泡法と比色法の 2 法を試みた。

発泡法<sup>24)</sup>：スライドガラス上に 3% 過酸化水素水 1 滴をとり、培地斜面よりかき取つた菌をよく混和し発泡状態を観察、1 分以内に著明な発泡をみたものを陽性とした。

比色法<sup>25)</sup>：菌液作製時に管底に沈澱した菌塊より内径 2 mm のエーゼをもつて小試験管中の pH 7.0 の 1/15M 磷酸緩衝液 0.4 cc に再浮遊し、0.3% の過酸化水素水 0.2 cc を加え 1 時間 6°C の氷室中に保存後、6% クエン酸、1.1% モリブデン酸アンモンをおのおの 0.2 cc ずつ加え、生じた黄色を 0.04% のクロム酸カニ溶液を 100% とし、以下蒸溜水をもつて 1/2 ずつ倍数

稀釈をして作った標準液と比色した。

実験成績

1) カタラーゼ活性：各菌株のカタラーゼ活性は表1に示すごとく H<sub>2</sub>-R I N H 株は全くカタラーゼ活性を消失していたが、I N H 感受性株はすべて両法に明瞭な活性を示した。しかし B C G は比色法でその活性度は中等度に減弱し、発泡状態も H<sub>37</sub>Rv, Ra 株に比しやや弱かった。

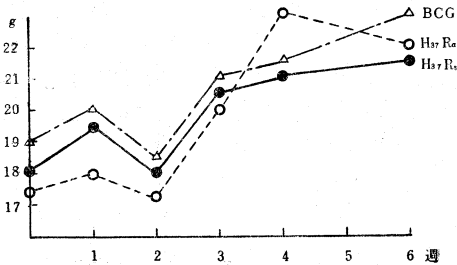
表1 各菌株のカタラーゼ活性

菌株	H <sub>37</sub> Rv	H <sub>37</sub> Ra	B C G	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> -R I N H
測定法					
発泡法	+	+	+	+	-
比色法	0	0	50	0	100

比色法欄の数字は過酸化水素の残量%で示した

2) 各接種群における体重変化および臓器の肉眼的所見：各群の感染後の体重変化は図1に示すごとく感染後第1週は増加するが、第2週に著明な体重減少を示し以後再び増加する。いずれの菌株接種群でも同様な傾向を示した。

図1 各群の体重変化

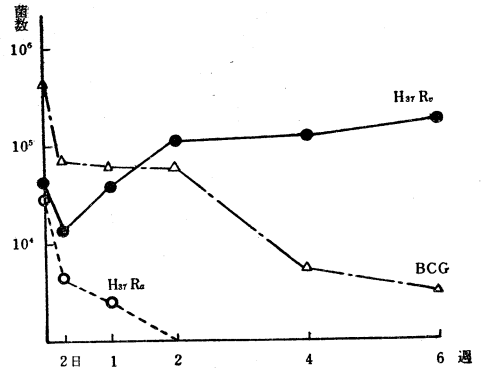


H<sub>2</sub> および H<sub>2</sub>-R I N H 接種群でも同様な結果を得たが表から割愛した

H<sub>37</sub>Rv 接種群では感染2週後から脾腫を認め4週後には肺表面に灰白色の結節をみ、6週後も肺の結節は増加の傾向を示したが、脾腫は4週剖検時より縮小した。H<sub>37</sub>Ra 接種群および B C G 接種群ではいずれも全経過を通じて肺、脾に著明な変化を認めえなかつた。H<sub>2</sub> 接種群も脾の所見は H<sub>37</sub>Rv 群と同様な傾向を示したが接種4週後も肺に結節の発生をみなかつた。H<sub>2</sub>-R I N H 接種群では2週後脾腫を認めたが4週後には早くも縮小傾向を示し、肺には全期間を通じて病変を認めなかつた。なお実験期間中死亡した動物は1匹もなかつた。

3) 各菌株のマウスの全身中における生菌数の推移：H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>Ra, B C G について接種後の生菌数の推移は図2に示すごとく、H<sub>37</sub>Rv では感染後2日目に菌数は約1/2に減少するが以後2週間著明に増加する。その後4週まで大きな変動をみないが感染6週後にわずかな

図2 マウスの全身中における結核菌の消長(1)



から再び増殖の傾向をみせている。一方 H<sub>37</sub>Ra では持続的な生菌数の減少を示し第2週以降はもはやその生存を証明することができなかつた。B C G は同様に第2日目に一たん急激に減少するがその後ほぼ同じ水準を保つてほとんど生菌数に変動なく、感染4週後に至つて再び減少し以後6週まで大きな変動をみなかつた。すなわち B C G についても H<sub>37</sub>Ra と同様全経過を通じて増殖傾向を認めることができなかった。

以上の実験から静脈内に接種された結核菌のマウスの体内における推移は接種後4週以内に決定されると考え、以下 H<sub>2</sub> および H<sub>2</sub>-R I N H の2株についてはその観察を4週に止めた。その結果は図3に示すごとく、H<sub>2</sub> 株では感染初期の回復生菌数の減少は感染1週後まで及んでいるが、2週後には急激に増殖し以後わずかに減少の傾向を示すがほぼ同じ水準を保つて第4週に至つている。H<sub>2</sub>-R I N H 株は2日目に約1/2に減少し1週間目にはほぼ接種時の菌数まで回復するが以後漸次減少の傾向を示している。

各菌株の接種量 (0.06 mg) 中に含まれる生菌数および感染後4週以内にみられる回復生菌数の最低、最高値とそれから計算した増殖率を表2に示した。

図3 マウスの全身中における結核菌の消長(2)

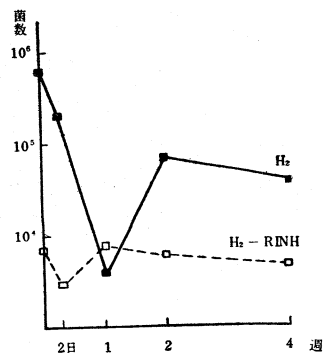


表2 各菌株のマウスに対する接種菌数、回復菌数および増殖率

菌 株	H <sub>37</sub> Rv	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> -R I NH	H <sub>37</sub> Ra	BCG
接種菌数	40	700	8	36	580
回生菌 復数					
最低値	15	4	3	—	—
最高値	122	68	9	—	—
増殖率	8	17	3	—	—

菌数  $\times 10^3$  はマウス 1 匹当りの全菌数となる

### 考 察

マウスの静脈内に virulence を異にする結核菌を接種し、各臓器内の生菌数の推移からこれらの菌の virulence を分類しようとした試みはいくつかある。しかしその結果は必ずしも一致せず、ことに H<sub>37</sub>Ra, BCG のごとき無毒ないし弱毒とされる菌株の臓器内における推移について得られた結果は研究者によつて異なる。Pierce らはマウスの臓器内で H<sub>37</sub>Ra の増殖を認めえず、BCG については感染後 2~5 週の間増殖をみており、それぞれ無毒 (avirulent), 弱毒 (attenuated) と分類し肺、脾における増殖状態が接種された結核菌の virulence を表現するとした<sup>26)</sup>。しかし Mackaness らは感染初期に H<sub>37</sub>Ra に BCG より強い増殖を認め<sup>27)</sup>、佐藤<sup>15)</sup> 28)、加藤<sup>2)</sup> らも同様に肺、脾内で H<sub>37</sub>Ra が増殖することを認めている。加藤らは全身ホモゲナイズ法によつて静脈内に接種された結核菌のマウスの全身中における生菌数の消長を追求し H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>Ra との間に明瞭な相違を見出した。しかし BCG 接種群では培養に用いた全身ホモゲネートの濃度の高いときにかえつて培地上の発生集落数が少ない結果を得て BCG は H<sub>37</sub>Rv, H<sub>37</sub>Ra と相違して高濃度のホモゲネートにより発育が抑制されると推論している<sup>20)</sup>。しかし本実験の結果では BCG についても他の菌株におけると同様ホモゲネートによる阻止効果は認められず、各稀釈段階における集落発生数に特別の差異をみず本法は BCG についても適用可能なことを知った。BCG 接種群の数匹の培養成績を表3に示した。しかし BCG は分離以来長期にわたる継代培養により、その生物学的諸性状を異にする多くの株が存在することが知られており、その増殖が pH その他の物理化学的諸条件に著しく左右される<sup>29)</sup>。したがって全身ホモゲネートによる発育阻止効果が株によつて異なることも考えられ、この点について今後一層詳しい検討を必要とする。

BCG の消長曲線は H<sub>37</sub>Ra と同様全経過を通じて菌数の増加をみながつたが、H<sub>37</sub>Ra が常に減少し続けるのと相違して感染直後一たん急激に減少するが以後 2

表3 BCG 接種群の培養成績

マウス No. ホモゲネート	1	2	3	4	5
	原 液	> 100	汚染	汚染	> 100
× 10	4.3	5.7	2.3	9	0
× 100	1	0	0	1	0

3本の1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地上に発生した集落数の平均値を表示した。なおマウスNo.1,2,3は接種2日後、No.4は1週間後、No.5は4週間後に屠殺培養した

週間はほぼ平衡状態を保ち、のち再び減少する。このことは H<sub>37</sub>Ra が感染2週以後はもはやこの方法をもつてその生存を証明しえなかつたこととともに Pierce らの述べるごとく、BCG と H<sub>37</sub>Ra の virulence に相違があることを示すと考えられる。しかし加藤らは H<sub>37</sub>Ra<sup>a</sup> について感染8週後にもマウスの全身中にその生存を認めている<sup>21) 23)</sup>。その主因として接種菌量の差が考えられるが実験動物の結核菌に対する感受性の相違もまた無視しえない。また加藤らは H<sub>37</sub>Rv, Ra 株について感染1日後に 90% 以上の接種菌回復率を示しているが<sup>20)</sup>、本実験に用いた5株ではいずれも第2日目に菌数の急激な減少をみ、とくに H<sub>2</sub> 株については1週間後にもなお減少を示している。この実験では接種直後の菌回復率は調べなかつたが、生体内に侵入した結核菌が増殖する前に一たん減少することは Bloch らも認めており<sup>30)</sup>、感染初期の菌の推移については今後検討を必要とする。

強毒株 H<sub>2</sub> および H<sub>37</sub>Rv は接種後著明な増殖をみたが感染2週以降はある平衡状態に達したかのごとく大きな変動を示さない。また接種後一たんある水準に落ちついた BCG の生菌数も2週以後著明に減少する。これらの事実と相まって感染経過中の体重がいずれの菌株についても接種菌の増殖最盛期に当る第2週に一たん減少したのち再び増加し、菌増殖のみられなかつた H<sub>37</sub>Ra, BCG 接種群についても同様な傾向を示したことは、この時期に宿主体内でなんらかの変化が生じその後の宿主体内における結核菌の消長に大きな影響を与えるものと考えられ、各菌株の生菌数消長曲線が宿主側の複雑な諸条件を反映していることを示唆する。

カタラーゼ活性を失つた I NH 耐性結核菌のモルモットに対する virulence が低下することは多くの研究者によつて報告されているがマウスに対する virulence に関してはその低下を認めないとする報告が多い。本実験に使用したカタラーゼ活性を失つた H<sub>2</sub>-R I NH 株のマウス体内における消長は感染初期に一時増加し、H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub> 等の強毒株に類似するがその増殖率は低い。さらに第2週以降は漸次減少し BCG に類似する経過を示す。また臓器の肉眼所見でも同様な傾向をみた。このさい接種に用いた H<sub>2</sub>-R I NH 株が湿菌量を一定に

したにかかわらず、その中に含まれる生菌数がきわめて少なく  $H_2$  株の約 1/100 にすぎなかつたことは考慮せねばならない。なお以下の続報にみるごとく数種の試験で比濁法によって、湿菌量を一定にした菌液中に含まれる  $H_2$ -R I N H 株の生菌数は常に  $H_2$  株の数十分の一以下であつた。I N H 耐性菌の培地上における増殖が遅延することは広く知られているが、菌液作製時の磨碎等の機械的作用に対しても、I N H 耐性菌は感受性菌に比し抵抗力が弱いのではないかと考えられ、その virulence の検討に当つて接種菌液中に含まれる湿菌量と同時に生菌数をも考慮すべき必要を知つた。したがつてこの実験でただちに  $H_2$  株と  $H_2$ -R I N H 株との virulence の差異を比較することはできない。しかしマウス体内における  $H_2$ -R I N H の増殖率が他の強毒株に比し低いことおよび感染早期から増殖を停止し漸次減少することは注目に値する。モルモットに接種された I N H 耐性菌は各臓器内で一たん増殖するが間もなく減少し発生した病変も治癒傾向を示す<sup>7) 8) 31) 32)</sup>。本実験の示す結果はマウスの体内でも I N H 耐性菌の消長はモルモットにおけると同様な経過をとることを示唆し、宿主体内に発生した結核性病変の諸性状が I N H 耐性菌の増殖に阻止効果を及ぼす可能性が考えられる。I N H 耐性菌の virulence の減弱に関して従来そのカタラーゼ活性の消失が重視されているが、以上の事実は同時に宿主体内で感染菌の曝される諸条件について慎重に考慮すべき必要を明らかにしている。また結核菌のカタラーゼ活性が必ずしもその virulence の強弱に関係しないことは表 1 に明かであり、ある菌の virulence が菌のもつ 2, 3 の性状にのみ依存するのではなく宿主との間の総合的な関係—host-parasite relationship—として把握されるべきことを示している。

なお本方法を使用するに当つて全身ホモゲネートの培養にさいし非病原性雑菌の混入のため集落数計算に誤りを生ずる可能性を考慮し、あらかじめ対照として未接種のマウス 3 匹を用い同様に処理し培養したが、抗酸菌菌の發育のないことを確かめた。

## 結 論

$H_{37}Rv$ ,  $H_{37}Ra$ , B C G,  $H_2$  および I N H 10 $\gamma$ /cc の完全耐性を示す  $H_2$ -R I N H の 5 株をマウスの静脈内に接種し、全身ホモゲナイズ法により全身中における接種菌数の消長を追求し、同時に各株についてカタラーゼ活性を測定した。

1) 感染初期に一樣に生菌数の減少を認めたが、のち各菌株について特長な消長曲線を得、 $H_{37}Rv$ ,  $H_2$  のごとき強毒株と  $H_{37}Ra$  ないし B C G との間に明瞭な相違を認めた。また本法が B C G についても他の人型菌におけると同様用いることを知つた。

2) カタラーゼ活性を失つた  $H_2$ -R I N H 株は接種菌液中に含まれる生菌数が少ないため  $H_2$  株についての結果と比較できなかつたが、マウスの体内で一たん増殖したのち感染早期から減少することを知つた。

さらにマウスの体内における結核菌の消長について 2, 3 の考察を試みた。

終りに臨み本実験にさいし、終始快く御協力を頂いた伊豆通信病院の山岡院長、臨床検査科の諸氏および懇切な御指導、御校閲を賜つた伝染病研究所臨床研究部の北本教授、福原博士に深く謝意を表する次第である。

## 文 献

- 1) Meissner, G. : Beit. Klin. Tuberk., 110 : 538~546, 1954.
- 2) Meissner, G. : Beit. Klin. Tuberk., 113 : 62~74, 1955.
- 3) Morse, W.C., et al. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 464~468, 1954.
- 4) Cohn, M.L., et al. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641~664, 1954.
- 5) Peizer, L.R., & Widelock, D. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 246~251, 1955.
- 6) 金井 : 医学と生物学, 35 : 105~109, 昭30.
- 7) 北本 : 診断と治療, 44 : 326~329, 昭31.
- 8) 高橋 : 日本細菌学雑誌, 12 : 315~320, 昭32.
- 9) Neumayer, R.B., et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 89 : 468~471, 1955.
- 10) 海老名・高階 : 日本臨牀結核, 15 : 833~841, 昭31.
- 11) 大岩 : 日本細菌学雑誌, 12 : 291~296, 昭32.
- 12) Noufflaud, H. : Ann. Inst. Pasteur, 88 : 325~335, 1955.
- 13) 佐藤 : 結核, 30 : 455~460, 昭30.
- 14) 佐藤 : 医学と生物学, 29 : 14~17, 昭28.
- 15) Bloch, H. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 464~468, 1954.
- 16) Middlebrook, G., & Cohn, M.L. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 88 : 568~571, 1955.
- 17) Conalty, M.C., & Gaffney, E.E. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 799~809, 1955.
- 18) Dubos, R.J. : The bacterial cell, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1949.
- 19) Rich, A. : The pathogenesis of tuberculosis, Charles C. Thomas, Springfield, 1951.
- 20) 加藤他 : 医学と生物学, 34 : 161~165, 昭30.
- 21) 加藤他 : 結核, 30 : 638~642, 昭30.

- 22) 加藤 他 : 医学と生物学, 37 : 161~165, 昭30.
- 23) 加藤 他 : 結核, 31 : 158~163, 昭31.
- 24) 杉山・古賀 : 臨牀と研究, 32 : 40~44, 昭30.
- 25) Peizer, L.R., & Widelock, D. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 305~307, 1955.
- 26) Pierce, C.H., et al. : J. Exp. Med., 97 : 189~205, 1953.
- 27) Mackaness, G.B., et al. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 479~494, 1954.
- 28) 佐藤 : 医学と生物学, 34 : 90~94, 昭30.
- 29) Dubos, R.J., & Pierce, C.H. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 655~681, 1956.
- 30) Bloch, H. : Experimental Tuberculosis, 131~138, J. & A. Churchill, London, 1955.
- 31) Barnett, M., et al. : Brit. J. Exp. Path., 34 : 568~581, 1953.
- 32) Karlson, A.G., & Ikemi, Y. : Proc. Staff. Med. Mayo Clin., 29 : 119~124, 1954.