

## INH 耐性菌のビルレンツに関する研究

## 第3報 結核菌の生存に対する乳酸の影響と乳酸脱水素酵素活性について

深津 睿 知

東京大学伝染病研究所臨床研究部 (部長 北本 治)

受付 昭和34年1月8日

イソニコチン酸ヒドラジット (INH) に対して耐性を獲得した結核菌は、他の薬剤に対する耐性菌と異なり感受性母株に比べその virulence が低下する。Middlebrook らはこの事実と関連して INH 耐性菌のカタラーゼ活性の消失を指摘した<sup>1</sup>。その他、結核菌の virulence の差異と菌の 2, 3 の性状との関連が検討されているが<sup>2)~4)</sup>、結核菌の病原性のすべての因子を菌の側にもみ求めることは困難で、結核症の消長に關与する重要な因子として宿主の抵抗性の表現である炎症反応を無視することはできない。

先に INH 耐性菌のモルモットに対する virulence を検討したさい、virulence の減弱を示す菌株が炎症部位に存在すると考えられる諸条件に対して著しく抵抗性が弱いことを報告した<sup>5)</sup>。そのさい乳酸の産生による pH の低下および嫌気状態が INH 耐性菌を含む数種の結核菌の菌液中における生存に及ぼす効果を検討した。

以下の実験ではこれらのうちのいずれの因子が INH 耐性菌の生存に阻害作用を及ぼすかを検討しその virulence 減弱の機作の解明を試みた。

## 実験方法

## 1) 結核菌の生存阻止に關与する諸因子の検討

結核菌の菌液中における生存に阻害作用を及ぼす乳酸の存在、pH の低下、嫌気状態のうちいずれが決定的意義をもつかにつき  $H_2$ 、 $H_2$ -RINH の2株を用いて検討した。

前報と同じ組成の無機塩類溶液を IN の NaOH で pH 5.5 および 7.0 に修正した溶液、およびこの塩類溶液に乳酸を終末濃度 0.025 M になるごとく添加し、IN の NaOH で pH 5.5 に修正した溶液の3種を作り高圧滅菌後、菌液の作製に用いた。1%  $KH_2PO_4$  培地に培養3週後、発生した集落をかきとり滅菌蒸留水で洗滌後上記の溶液を加え、マイクロガラスホモゲナイザーで 0.5 mg/cc の菌液を各株につき3種類ずつ作製した。この菌液を小試験管5本に分注してピロガロールと苛性カリを入れたガラス瓶に納め、37°C の卵

卵器中に嫌氣的に保存した。同時に乳酸を加えた pH 5.5 の菌液は別に好氣的に孵卵器中に保存した。

保存1, 2, 3, 5, 7日後に各小試験管を取出して10倍段階稀釈法を行い、0.1 cc ずつを3本の1%  $KH_2PO_4$  培地に流し37°C に4週間培養後発生集落数を計算し、菌液0.1 cc (湿菌量 0.05 mg) 中の生存菌数を計算した。

## 2) 乳酸脱水素酵素活性の測定

$H_{37}Rv$ ,  $H_{37}Ra$ , BCG,  $H_2$  および  $H_2$ -RINH の5株を Sauton 培地に培養、4週後発生した菌苔を滅菌蒸留水で2回洗滌して pH 7.4 の 1/15 M 磷酸緩衝液を加え、5 mg/cc の菌液を作製した。Thunberg 管の反応管に菌液 2 cc, pH 7.4 の磷酸緩衝液 1 cc を入れ、側室に 10,000 倍のメチレン青水溶液 1 cc, 基質として 0.2 M の乳酸ソーダ 1 cc を入れ、水流ポンプで5分間吸引し内部の空気を十分排除して閉鎖し37°C の恒温槽に10分間浸漬したのち内容を混和した。

別に 10,000 倍のメチレン青水溶液を原液として倍數稀釈法を行い、BCG の菌液を 2 mg/cc になるごとく加えた比色用基準液を作り色調の変化を比較観察した。

## 実験成績

表1にみるごとく嫌気状態において菌液の pH が酸性であつても乳酸の存在しない場合は結核菌は相当長期間にわたつて生存し7日目においてもその減少は1/10程度にすぎない。また INH 耐性株と感受性株との間にもその生存状態に大きな差異は認められない。しかし乳酸の存在のため pH が低下するときは表2のごとく、好氣的条件および嫌氣的条件のいずれにおいても菌液中の結核菌は漸次減少し、感受性株の好氣的条件下における消滅はむしろ嫌気状態における場合より早く保存後5日目からその生存を証明することができなかつた。INH 耐性株についてはその生存阻止作用はさらに著明でいずれの場合も1日後から最早その生存を証明できなかつた。

以上の実験から菌液中の結核菌の生存に阻止作用を及ぼす諸条件のうち乳酸の存在がもつとも重要な意義を有

表 1 嫌氣的条件下における菌液中の結核菌の消長と pH との関係

pH	菌株	日数					
		0	1	2	3	5	7
7.0	H <sub>2</sub>	8×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	"	"	"	5×10 <sup>4</sup>
	H <sub>2</sub> -RINH	9×10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>4</sup>	"	"	4×10 <sup>3</sup>
5.5	H <sub>2</sub>	7.10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	"	"	"	2×10 <sup>4</sup>
	H <sub>2</sub> -RINH	2.5×10 <sup>5</sup>	3.2×10 <sup>4</sup>	3×10 <sup>4</sup>	2.3×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>5</sup>	3.4×10 <sup>5</sup>

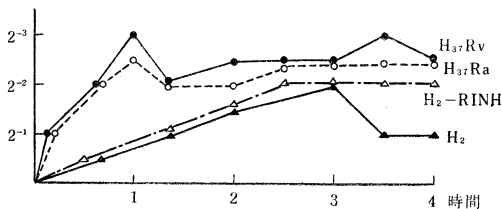
37°C に保存された 0.5 mg/cc の菌液 0.1 cc 中の生存菌数を示す

表 2 乳酸加菌液中の結核菌の消長と保存条件の関係

性質	菌株	日数					
		0	1	2	3	5	7
好気性	H <sub>2</sub>	1.2×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	3	0	0
	H <sub>2</sub> -RINH	1.7×10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0
嫌気性	H <sub>2</sub>	1.2×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>4</sup>	5.9×10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>	5	0
	H <sub>2</sub> -RINH	1.7×10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0

0.025 M の乳酸を含み pH 5.5 の菌液 (0.5 mg/cc) 0.1 cc 中の生存菌数を示す

図 1 各株の乳酸脱水素酵素活性



メチレン青基準液の希釈濃度を縦軸にとつた。BCG は活性弱く表から留愛した

することを知り、次に数種の結核菌について乳酸脱水素酵素活性を比較した。

BCG は測定開始 3 時間後にはじめてわずかに褪色をみたが 4 時間後にもその色調は開始時の 1/2 に達せず酵素活性はもつとも弱い。H<sub>37</sub>Rv 株は使用した 5 株のうちでもつとも強い酵素活性を示しメチレン青の褪色は 10 分後に測定開始時の 1/2 となり 1 時間後には 1/8 に達する。その後一たん色調がやや復元するが以後大きな変化をみなかった。H<sub>37</sub>Ra 株は H<sub>37</sub>Rv 株と全く同様な経過を示した。H<sub>2</sub> 株では 1 時間 20 分後に褪色は測定開始時の 1/2 となり 3 時間後は 1/4 に達するがその後 H<sub>37</sub>Rv 株と同じく色調は 2 倍に復元した。H<sub>2</sub>-RINH 株の経過は H<sub>2</sub> 株とほぼ同様であつたが色調の復元はみられなかった。

すなわち結核菌の乳酸脱水素酵素活性の間には株によりかなりの差異が認められるが、H<sub>37</sub>Ra、あるいは H<sub>2</sub>-RINH 株のごとく変異株とみなされる株は親株とほとんど同程度の酵素活性を示した。

考 察

先に炎症反応に伴う局所の物理化学的条件が I NH 耐性菌の生存に不利に作用する事実を報告したが<sup>5)</sup>、嫌気状態および pH の低下が結核菌の増殖を抑制することはすでに認められている<sup>6)~8)</sup>。厳密な嫌氣的条件を作することは非常に困難で、ここでは酸素分圧のきわめて小さいと考えられる条件で実験を行つたが、以上の著者の実験結果から I NH 耐性菌の生存を阻止する作用は単なる pH の低下、または嫌氣的条件よりもむしろ乳酸の存在にあると考えられる。

しかし同程度の乳酸脱水素酵素活性を示す H<sub>2</sub> および H<sub>2</sub>-RINH 株について乳酸の生存阻止作用がとくに H<sub>2</sub>-RINH 株に著明な事実、乳酸の菌液中の結核菌に対する抗菌作用の差異が菌の乳酸脱水素酵素活性の差に直接起因するものでないことを示している。またもつとも弱い酵素活性を示す BCG と、もつとも強い活性をもつ H<sub>37</sub>Rv 株との、乳酸を加えた菌液中における消長にほとんど差のないことは前報に報告した<sup>5)</sup>。

I NH は結核菌の乳酸脱水素酵素活性を阻害し I NH に対して耐性を獲得した BCG に乳酸脱水素酵素活性の低下を認めた報告があるが<sup>9)</sup>、ここに使用した H<sub>2</sub>-RINH 株の酵素活性は H<sub>2</sub> 株と変りなかつた。乳酸脱水素酵素活性は H<sub>37</sub>Rv、H<sub>2</sub>、BCG の各株の間では明らかな相違を示すが H<sub>37</sub>Rv と H<sub>37</sub>Ra、H<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>-RINH 株のごとく変異株とみなされる株と親株との間にはほとんど差異をみない。また Geronimus らは人型菌、牛型菌および非病原性抗酸性菌について乳酸の呼吸促進作用を検討し、乳酸の存在による酸素消費量の増加と各株の virulence の程度との間に負の相関関係の存在を認めたが<sup>10)</sup>、本実験の示す結果では各菌株の乳酸脱水素酵素活性は全く virulence と関係しないと考えられる。一方乳酸の結核菌に対する増殖阻止効果は各菌株の virulence の程度と関連し、強毒株の増殖阻止に要する濃度は弱毒株に対する増殖阻止濃度より高いといわれる<sup>10)</sup>。この点については 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に種々の濃度の乳酸を添加し各株の増殖に対する影響を検討した。その結果 0.1% 以上の乳酸を含む培地で I NH 耐性株に軽度の増殖阻止傾向をみた。しかしその結果は一定せず図表から割愛したが BCG、H<sub>37</sub>Ra 株については増殖阻止を認めなかつた。したがつて必ずしも各菌株に対する乳酸の増殖阻止濃度とその virulence との間に相関関係があるとは考えられない。

乳酸は結核菌の呼吸作用を促進する<sup>10)11)</sup>。しかしそ

の増殖を必ずしも促進せずある程度以上の濃度ではかえって阻止作用を示す<sup>12)~14)</sup>。Bloch は種々の物質について結核菌の呼吸促進作用と増殖に対する影響との間に、なんらの相関関係のないことから、両者が全く異なる代謝機構による可能性を推論している<sup>15)</sup>。また Dubos は嫌気状態下では 0.1% 以上の濃度の乳酸が結核菌に対して殺菌作用を有することを示したが<sup>13)</sup>、この実験では乳酸を加えた菌液中の  $H_2$  株はかえって好気的条件下のもとに早く消滅している。このことはしかし乳酸の阻害作用は嫌気状態下ではじめて有効に作用するという Dubos の結論に必ずしも背反するものではなく、菌のおかれた環境の相違に起因すると考えられる。すなわち Dubos の実験では Tween-albumin 培地が使用されているが、本実験では乳酸以外に有機物質を含みぬ無機塩類溶液を用いた。すなわち溶媒から栄養物質を摂取しえない菌液中の結核菌は乳酸によつて呼吸作用を促進される結果、好気状態下においては遂には生存に必要なエネルギーをも呼吸作用のため消費しつくして嫌気状態下における場合より早く死滅するのであろう。

INH 耐性菌が乳酸の抗菌作用に対して抵抗性が低いことは注目に値する。Middlebrook は INH 耐性菌の virulence の減弱に関連してそのカタラーゼ活性の消失を重視し、生体内においてグルタチオン、システインのごとき SH 基をもつ化合物が酸化される結果生ずる  $H_2O_2$  が INH 耐性菌に阻止作用を及ぼす可能性を論じているが<sup>16)</sup>、結核菌が乳酸を酸化するさいにも  $H_2O_2$  が産生される可能性がある<sup>17)</sup>。INH 耐性菌が感受性母株とはもちろん  $H_{37}Ra$ , BCG のごとき無毒ないし弱毒株を含めた各種の結核菌に比し乳酸による生存阻止が著明な事実、乳酸の酸化にさいして生ずると思われる  $H_2O_2$  がカタラーゼ活性を消失した INH 耐性菌の生存を阻止することにあるのではないかと考えられる。しかしカタラーゼ活性を消失した INH 耐性菌でも乳酸の抗菌作用に対する抵抗性が強く、同時に virulence 減弱の程度の少ない株が存在することは、結核菌における物質代謝の諸性状と virulence との関係の解明のために今後さらに広汎な研究をまたねばならないことを示している。また  $H_{37}Ra$ , BCG 等の無毒ないし弱毒株の諸性状がある場合は強毒株と全く差異がなく、乳酸の抗菌作用に対しても強い抵抗性をもつことは、結核菌の virulence がいくつかの限られた条件によつて決定されるものではなく宿主寄生物双方の諸条件の総合的表現であることを示している。

以上 3 報にわたる諸実験で各種の結核菌、とくに INH 耐性菌のマウスおよびモルモットに対する virulence と、菌株のいくつかの性状との関係について検討した。

その結果、一たん宿主体内で増殖した INH 耐性菌

が間もなく減少する事実および結核菌が INH に対し耐性を獲得すると乳酸の抗菌作用に対する抵抗性が著明に低下する場合があることを知った。これらの事実は INH 耐性菌の virulence 減弱の機作に関する推察を可能ならしめる。すなわち宿主体内に侵入後、増殖した結核菌は炎症を惹起しある場合はさらに増殖して進行性の病変を形成するが、INH 耐性菌は炎症部位に発生する種々の条件、とくに嫌氣的解糖作用により多量に産生される乳酸によつてその生存を阻止され、一たん成立した病変も漸次消褪するのであろう。この見地から INH 耐性菌喀出患者に新しい結核性病変の進展が少ないとする臨床的観察はきわめて興味深い<sup>18)</sup>。

結核菌の virulence の差異を菌の諸性状の差異に求めようとする試みは以前から行われいくつかの知見が得られている。現在のところそれらの試みは必ずしも満足すべき結果に達していないが、生体内における結核菌の消長とその代謝諸性状との関係の追究は、結核症の感染から発病にいたる経緯の解明に重要な示唆を与え、さらに結核症の治療と防止に大きな貢献を期待しうるのであろう。

## 結 論

先に菌液中における結核菌の消長が種々の条件に影響されることを知り、 $H_2$  および  $H_2-RINH$  の 2 株を用いてそれらの条件を検討し、さらに virulence を異にする数種の結核菌について乳酸脱水素酵素活性の測定を行い次の結果を得た。

1) 著者の採つた条件においては結核菌の生存に対し、嫌気状態および pH の影響は少なく乳酸に明瞭な阻止効果を認めた。またその影響は  $H_2$  株より  $H_2-RINH$  株に対して著明であつた。

2) 乳酸脱水素酵素活性は使用した 5 株のうち BCG にもつとも弱く  $H_{37}Rv$  でもつとも強い酵素活性を示したが、 $H_{37}Rv$  と  $H_{37}Ra$ ,  $H_2$  と  $H_2-RINH$  株のごとき変異株と親株との間にはほとんど差異を認めない。また各株の virulence の程度と乳酸脱水素酵素活性との間に相関関係は認められない。

以上の実験から INH 耐性菌の virulence 減弱の機作の一部は炎症部位における乳酸の抗菌作用に起因すると推定しその機作について考察を加えた。

欄筆にあたり本実験が今はじき伊豆通信病院の故山岡克巳院長の終始変りなき御好意と東京大学応用微生物研究所の藤田暉通氏の御協力によるものであることを付記し、あわせて懇切な御指導と御校閲を賜つた北本教授、福原博士に深甚の謝意を表する次第である。

## 文 献

- 1) Cohn M.L., et al. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 2) Dubos R.J., & Middlebrook G. : Am. Rev. Tuberc., 58 : 698, 1949.
- 3) Bloch H. : Experimental tuberculosis, 131, J. & A. Churchill, London, 1955.
- 4) Holmgren N.B., & Youmans G.P. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 416, 1952.
- 5) 深津 : 結核, 33 : 666, 昭33.
- 6) Dubos R.J. : Biochemical determinants of microbial disease, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1954.
- 7) Loebel R.C., et al. : J. Bact., 26 : 167, 1933.
- 8) Mizuno D. : Beit. Klin. Tuberk., 112 : 378, 1954.
- 9) 山本 : 結核, 29 : 195, 昭29.
- 10) Geronimus L.H., & Birkeland J.M. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 520, 1951.
- 11) Loebel R.C., et al. : J. Bact., 26 : 139, 1933.
- 12) Schaefer W.B. : Ann. Inst. Pasteur, 74 : 458, 1948.
- 13) Dubos R.J. : J. Exp. Med., 97 : 357, 1953.
- 14) Edson N.L. : Bact. Rev., 15 : 147, 1951.
- 15) Bloch H., et al. : Am. Rev. Tuberc., 55 : 540, 1947.
- 16) Coleman C.E., & Middlebrook G. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 42, 1956.
- 17) Edson N.L. : Biochem. J., 41 : 145, 1947.
- 18) Ostreicher R., et al. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 390, 1955.