

## マウス結核症に関する研究

## 第10報 INAH 耐性菌のマウスに対する毒力

渡 辺 元 洋

北里研究所 (指導 水之江公英博士)

受付 昭和 34 年 1 月 30 日

## 結 言

化学療法における薬剤耐性の問題は治療面においては由々しき問題であるが、変異ひいては遺伝学の研究に興味深い問題を提供、これら両方面についての報告はきわめて多い。

INAH 耐性菌についても、耐性獲得、耐性の安定性、耐性と Catalase との関係また耐性菌のモルモットおよびマウスに対する病原性等についての報告が関係雑誌の紙上を賑わしている。なかでも耐性菌のモルモットおよびマウスに対する病原性またその病原性と Catalase との関係については、細菌学的に興味ある問題であつて研究者の間はまだ一致した結論が得られていない。私はマウス体内で INAH 耐性を獲得した耐性菌のマウスに対する病原性および耐性の変動を臓器の定量培養によつて観察し、あわせて菌の Catalase を調べたのでここに報告し、大方の御批判を仰ぎたい。

## 実験材料および実験方法

## 1. 実験材料

使用菌株：当研究所保存の強毒人型結核菌黒野株感染マウスに経口的に INAH を投与してマウス体内で INAH 耐性を獲得した INAH 10  $\gamma$ 、100  $\gamma$  耐性株でおのおの INAH 10  $\gamma$  耐性培地 および 100  $\gamma$  耐性培地から INAH を含有しない培地に植えついでものを用いた。対照としては INAH 感性黒野株を使用した。菌液には各菌株 10 日間培養のものを用いた。Catalase は発泡法によつた。

使用培地：小川培地を用い、耐性測定にはこの培地による 0  $\gamma$ 、1  $\gamma$ 、10  $\gamma$ 、100  $\gamma$  の系列を用いた。

使用動物：マウスは d・d・N- 系の雄 14 g 前後のものを使用した。

## 2. 実験方法

マウスに Catalase 陰性の INAH 10  $\gamma$  および 100  $\gamma$  耐性黒野株と、INAH 感性 Catalase 陽性の黒野株を尾静脈に 1 mg/cc 菌液の 0.1 cc を接種、第 3 週後および第 40 日後に屠殺剖検し、肺、脾の重量を測定、肺は小川培地の INAH 0  $\gamma$ 、1  $\gamma$ 、10  $\gamma$ 、100  $\gamma$  含有培地の系列を用いて定量培養を実施し、その耐性の分布状態

を観察した。斃死マウスは剖検して肺の結核性病変の有無をたしかめ、結核死であることを確認し、それ以外の原因による斃死例は本実験より除外した。

## 実 験 成 績

感染菌液の生菌単位および耐性は表 1 のごとし。

表 1 感染菌液の生菌単位および耐性

使用菌株	10 <sup>-6</sup>			
	INAH ( $\gamma$ )			
	0	1	10	100
INAH 10 $\gamma$ 耐性黒野株 Catalase (-)	2.5	1	2	0
INAH 100 $\gamma$ 耐性黒野株 Catalase (-)	1.0	2.5	3.0	1.0
原株 (黒野株) Catalase (+)	2.5	0	0	0

肺の重量および肺菌数の比較 (表 2)

肺の重量は第 3 週後では INAH 感性黒野株感染群が一番重く、ついで INAH 10  $\gamma$  耐性株群、100  $\gamma$  耐性株群の順に軽くなつていく。脾の重量はこの逆であつた。肺の菌数は第 3 週後では、耐性菌感染群は感性菌感染群との間に約 10 倍の差があつて、INAH 感性黒野株感染群が一番多く、ついで INAH 10  $\gamma$  耐性株感染群、INAH 100  $\gamma$  耐性株感染群の順で少なくなつていく。第 40 日後では、INAH 100  $\gamma$  耐性株感染群以外は全部斃死して、その菌数の観察はできなかつた。

第 3 週後と第 40 日後臓器の重量の比較では、肺の重量は重く、その菌数も増加しているが、脾の重量には変化がみられない。第 3 週後の耐性 (表 3) は 10<sup>-4</sup> 稀釈では INAH 10  $\gamma$  耐性菌感染群の 3 匹のうち 1 匹にまた INAH 100  $\gamma$  耐性菌感染群の 3 匹では全例に 100  $\gamma$  耐性菌がみられた。10<sup>-6</sup> 稀釈では、INAH 10  $\gamma$  耐性菌感染群は INAH 10  $\gamma$  不完全耐性を、一方 INAH 100  $\gamma$  耐性菌感染群は全例 INAH 10  $\gamma$  完全耐性 (対照の  $\frac{1}{3}$  以上の集落数を有するものを完全耐性と

表2 INAH 感性ならびに耐性菌感染マウスの肺、脾の平均重量および肺の菌数

感染菌株	経過週 感染生菌 単位	第 3 週 後			第 40 日 後		
		肺重量 (g)	脾重量 (g)	肺菌数	肺重量 (g)	脾重量 (g)	肺菌数
INAH 10 $\gamma$ 耐性株 Catalase (-)	2.5 $\times 10^5$	0.45	0.29	8.5 $\times 10^7$			
INAH 100 $\gamma$ 耐性株 Catalase (-)	1 $\times 10^5$	0.37	0.35	1.2 $\times 10^7$	0.51	0.32	1.1 $\times 10^7$
原感性黒野株 Catalase (+)	2.5 $\times 10^5$	0.48	0.19	6 $\times 10^8$			

表3 INAH 感性ならびに耐性菌感染マウスの第3週後の肺、脾の重量および肺の菌数

	マウス番号	肺重量 (g)	脾重量 (g)	カタラーゼ	10 <sup>-4</sup>			10 <sup>-6</sup>			10 <sup>-8</sup>		
					0 $\gamma$	INAH			0 $\gamma$	INAH			0 $\gamma$
						1 $\gamma$	10 $\gamma$	100 $\gamma$		1 $\gamma$	10 $\gamma$	100 $\gamma$	
INAH 10 $\gamma$ 耐性株 Catalase (-)	1	0.48	0.18	-	+	+	+	+	200	25	55	0	
	2	0.44	0.24	+	+	95	120	0	36.5	2	1	0	
	3	0.36	0.45	+	+	103	84	0	17.5	3	3	0	
INAH 100 $\gamma$ 耐性株 Catalase (-)	1	0.45	0.60	-	+	+	+	4	3.5	5	3	0	
	2	0.33	0.30	-	+	+	+	4	9	13	15	0	
	3	0.35	0.15	-	+	+	+	11	22	32	14	0	
原 株 感性黒野株 Catalase (+)	1	0.53	0.15	+	+				+				7
	2	0.55	0.17	+	+				+				9.5
	3	0.36	0.25	+	+				+				1.5

た)を示した。

第40日後の耐性(表4)は生残したのは INAH 100 $\gamma$  耐性感染群のみであるが、10<sup>-4</sup> 稀釈では6例中5例は INAH 100 $\gamma$  不完全耐性を、しかし10<sup>-6</sup> 稀釈では6例全部 INAH 10 $\gamma$  完全耐性を示している。感染後3週における各感染群の肺の培養における INAH を含有しない0 $\gamma$ の培地より分離した菌について Catalase を調べると、INAH 10 $\gamma$  耐性株感染群の2例はともに Catalase 陽性であり、INAH 100 $\gamma$  耐性株感染群の3例はともに Catalase 陰性であった。また前群の No. 1 のマウスより分離した Catalase 陰性の菌は継代培養中に Catalase 陽性となった。黒野株感染群の3例はいずれも Catalase は陽性であった。マウスの生死状態を表5でみると INAH 10 $\gamma$  耐性株および INAH 感性黒野株感染群のマウスは全例斃死したのに反し、INAH 100 $\gamma$  耐性株感染群では16匹中6匹が斃死、10匹が生残した。

TDM (斃死日数中央値)をみると、INAH 10 $\gamma$  耐

性株感染群は黒野株感染群よりも、4日延長しており、100 $\gamma$  耐性株感染群は41日以上であった。すなわち耐性株感染群と黒野株感染群との間には、肺の菌数および生死状態の比較において差が認められた。また耐性株を感染させた場合、10 $\gamma$  耐性株と100 $\gamma$  耐性株の比較では100 $\gamma$  耐性株の方が10 $\gamma$  耐性株よりも毒力の弱いことを示している。

考 案

今日結核菌の毒力についての考え方はいろいろなされているが、生体内における増殖力の如何で毒力が決定されるというものが多い<sup>1)</sup>。また金<sup>2)</sup>はマウスの結核症では結核菌の毒力の強弱はマウス肺内の菌の増殖力に平行関係にあると述べている。INAH 耐性菌の毒力については幾多の報告がみられる。それらを検討してみると、その成績は区々であつて、北本<sup>3)</sup>はマウスならびにモルモットに対し、全般的に弱毒化の傾向を示しているが、一部にはなお毒力を保持していると述べている。また佐



病巣を認めなかつた。しかしマウスでは耐性菌で Catalase 陽性と陰性との間には差が認められなかつたと述べている。以上のごとく INAH 耐性菌はモルモットに対する毒力は一般に無毒力または減弱しているが、マウスに対しては毒力の変動はみられないというのが現在の状況であろう。

本実験に用いたマウス体内で耐性を獲得した黒野株の Catalase 陰性 INAH 10 $\gamma$  および 100 $\gamma$  耐性株および原株たる黒野 Catalase 陽性 INAH 感性株をマウスの尾静脈内に感染させた実験では、感染3週後の肺の菌数を比較すると対照群すなわち感性菌感染群との間には約10倍の差が認められた。生死の観察によると、まず黒野株感染群、ついでやや遅れて INAH 10 $\gamma$  感染群が斃死し、感染後40日で INAH 10 $\gamma$  耐性感染群および黒野株感染群では生残マウスはみられなかつた。すなわち菌数および生死からみて INAH 10 $\gamma$  および 100 $\gamma$  耐性株は原株たる感性黒野株よりもマウスに対する毒力は弱いといえよう。しかしマウスに対する BCG のようにマウス体内で菌数の上昇する曲線のみられないのと比較して無毒とはいいがたい。本実験成績よりみて INAH 10 $\gamma$  と 100 $\gamma$  耐性株との間には、かなりの毒力の差がみられる。患者の喀痰の耐性の測定にさいして耐性菌が 0.1~0.01% 含まれていることによつて耐性の成績が得られると中山<sup>13)</sup> は述べている。小坂<sup>14)</sup> は INAH 耐性の低下した菌株は Catalase 反応陽性を示す傾向があり、耐性低下菌株では Bacterial Population において、感性菌の占める割合が増加したのではないかと考察している。耐性菌の培地上の感性復帰について安淵<sup>15)</sup> は完全耐性は15代後も動揺なく、INAH 不完全耐性は5代後に低下したと、また高度(1,000 $\gamma$ ) 軽度(1 $\gamma$ ) 耐性混合例では、1代で著明な変動をみたと述べている。三浦<sup>16)</sup> は INAH 10 $\gamma$  耐性株は継代培養することによつて Population 構成が不均一となつたが、100 $\gamma$  耐性株は比較的均一であつたと述べている。本実験におけるマウス体内での INAH 耐性の変動は INAH 10 $\gamma$  耐性株感染群では3週後には屠殺したマウス3匹中3匹とも肺の菌では10 $\gamma$  不完全耐性を示した Catalase も3匹中2匹に陽性となつていた。一方 INAH 100 $\gamma$  耐性株感染群では3匹とも10 $\gamma$  完全耐性で、Catalase も陰性であつた。100 $\gamma$  耐性から10 $\gamma$  耐性になつたのは耐性の低下も考えられないこともないが、測定時の培地によつてこのような成績が得られたものと考えられる。40日後における生残マウス6匹の肺の菌の耐性を検査した結果も6匹とも10 $\gamma$  完全耐性であつて、Catalase も全例陰性であつた。すなわち耐性度の高い100 $\gamma$  近くのもののはかなり安定した耐性を示すが、10 $\gamma$  程度以下のものでは感性復帰がかなりの

程度行われているものと思考される。そしてその感性に復帰した感性菌がマウス体内において強い増殖を示し、マウスに毒性を与えるものと想像される。また研究者によつて耐性菌の毒力についての成績の異なるのは、すなわち安定した高耐性菌を使用した研究者の成績では無毒あるいは毒力のかかなり弱いことを述べ、不安定の10 $\gamma$  程度の耐性菌を使用した成績では強い毒力の存することを報告しているからではないであろうか。

## 結 論

- 1) INAH 耐性菌のマウスに対する毒力は感性原株より減弱の傾向にある。とくに耐性の安定した高耐性菌(100 $\gamma$ )の毒力の低下は著明であつたが、無毒とはいえない。
- 2) INAH 高耐性(100 $\gamma$ )は動物体内で耐性度および Catalase に変動がみられなかつたが、INAH 10 $\gamma$  耐性菌では感性への復帰および Catalase の陽転化が認められた。
- 3) この感性復帰の菌がマウスに対して毒力を現わし高耐性菌よりも強い毒力を示す結果となるのであろう。

稿を終るに臨み、御校閲を賜つた牛場教授および御指導を戴いた水之江博士に深く感謝する。

## 文 献

- 1) 染谷四郎他：結核，26：28，昭26.
- 2) 金容鉉：日本細菌学雑誌，13：15，昭33.
- 3) 北本治：結核，32(特別号)：2，昭32.
- 4) 佐藤直行：医学と生物学，29：14，昭28.
- 5) Nassau, E. et al. : Tubercle, 36 : 281, 1955.
- 6) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 7) Rieux, CH. G. et al. : Ann. Inst. Pasteur de Lille, 6 : 1, 1953.
- 8) Morse, W.C. et al. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 464, 1954.
- 9) Peizer, L.R. et al. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 246, 1955.
- 10) 平野憲正：東京女子医科大学雑誌，25：1，昭30.
- 11) 平野憲正：東京医事新誌，70：19，昭28.
- 12) Peizer, L.R. et al. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 428, 1956.
- 13) 中山英一：九州大学結核研究所紀要，2：1，昭30.
- 14) 小坂久夫：医療，10：286，昭31.
- 15) 安淵義男：日本臨牀結核，14：987，昭30.
- 16) 三浦幸二：結核，32：570，昭32.