

INH 耐性出現機序に関する実験的研究

I. supporting factor を要求する INH 耐性株の分離と supporting factor について

加 賀 董 夫

名古屋大学医学部内科第一講座 (主任 日比野進教授)

国立神戸療養所 (所長 橋本郁博士)

受付 昭和 34 年 9 月 11 日

Fisher^{1) 2)} は人型結核菌 H₃₇Rv 株の高濃度の INH に対する one step mutants が、簡単な合成培地においてはその発育に Hemin の添加を必要とすることを報告したが、その菌株を 3~4 回、INH を添加することなく Tween-Albumin 培地中に継代するならば、INH に対する抵抗性を失うことなく Hemin の要求性がなくなるとしている。Cohn³⁾ は H₃₇Rv 株の INH 耐性株には、growth factor の要求性において異なつた 2 つの菌株、Rx 株および Ry 株があると考え、Rx 株は Ry 株よりその growth factor 要求性が高いとした。そして彼らは両株の混合よりなる R 株と、要求性の低い Ry 株を分離した。さらに Cohn⁴⁾、Middlebrook⁵⁾、Barry⁶⁾ も INH 耐性株の growth factor の要求性について種々検討を行なつてゐる。これらの INH 耐性株が growth factor を必要とすることは、INH 耐性株の生物学的特性、たとえば発育速度の遅延、カタラーゼ活性およびペルオキシダーゼ活性の減弱ないしは消失、毒力の減弱などにも関連すると考えられ、INH の結核菌に対する作用機序、あるいは INH に対する耐性出現機序の解明の根本的問題と思われる。

著者は 1.5% Sauton 寒天培地上の発育に Hemin, あるいはその他の薬剤 (supporting factor—菌の発育に直接的、あるいは間接的に役立つ物質という意味で—広義の growth factor—) を必要とする鳥型菌 INH 耐性株を分離し、その菌株が supporting factor の必要性に関して純粋かつ安定であることを知つたので、分離の方法およびその supporting factor について若干の検討を行なつた。

実験材料および方法

1. 菌株：鳥型菌竹尾株

菌懸濁液の作り方；1.5% Sauton 寒天培地上の 7 日培養菌をかきとり、湿菌量を秤量し、ガラス玉入りナスコルペン中に約 10 分間、手振り法にて振盪し、所定の滅菌生理食塩水を注加、さらに 3 分間ほど振盪して単

個菌浮遊液をつくる。

接種の方法；菌懸濁液を、あるいは菌懸濁液をさらに生理食塩水にて稀釈し、所定の濃度となし、平板培地には 0.1 ml 宛、液体培地には 0.05 ml 宛接種する。

2. 培地

Sauton 培地 (変法)

グルタミン酸ソーダ	8 g
第 2 磷酸カリ	0.5 g
クエン酸	2 g
硫酸マグネシア	0.5 g
クエン酸鉄アンモン	0.05 g
グリセリン	60 ml

蒸溜水を加えて 1,000 ml となし、pH 7.2 に補正、オートクレーブにて 13 封度、20 分間、加圧加熱滅菌を行なつたのち、滅菌小試験管中に滅菌駒込ピペットにて無菌的に 2 ml 宛分注して用う。

Sauton 寒天培地；滅菌前に Sauton 培地に 1.5% の割に寒天末 (栄研製) を加え、加圧加熱滅菌後、径約 9 cm のペトリー氏皿に 25 ml 宛分注し、平板培地として使用する。

3. 添加薬剤

Hemin；滅菌 NaOH 溶液中に溶解。

焦性ブドウ酸ナトリウム、クエン酸鉄アンモン、クエン酸、コハク酸、フマル酸；それぞれ水溶液となし、(Hemin, クエン酸, コハク酸, フマル酸は NaOH あるいは HCl にて pH 7.2 に補正後) 100°C, 10 分間加熱滅菌を行なう。

ブドウ糖, ビタミン B₆；注射液をそのまま使用。

INH；80~85°C, 20 分間、乾熱滅菌後、滅菌蒸溜水にて溶解、液体培地においては使用直前、平板培地においては培地が滅菌せられたのち、60~70°C に冷却せられたときに添加する。

4. 培養：37°C, 空気中にて。

判定：液体培地は 10 日間毎日。平板培地は 5 日、7 日および 10 日後に行なう。

実験結果

I. I N H 耐性 supporting factor 要求株の分離と安定性の検討

(1) 鳥型菌竹尾株感性株の 10 mg/ml (生菌数 2.952 × 10⁸) の菌懸濁液を, I N H 100 μg/ml 加 1.5 % Sauton 寒天培地に 0.1 ml 宛接種すると, 1 平板当り 286 コロニーの one step mutants を得る (分離率: 9.68 × 10⁻⁶)。

この one step mutants の数コロニーをかきとり, 実験方法に示したとおりに菌懸濁液をつくり, 1.5 % Sauton 寒天培地および 5 μg/ml Hemin 加 1.5 % Sauton 寒天培地上に, 培地 1 コロニー当り湿菌量 0.01 μg 宛の生菌を含む単個菌浮遊液を接種した。

同様の実験を繰返し行なつた結果を表 1 に示した。Sauton 寒天培地上のコロニー数 (supporting factor 非要求株——S F (-) と略——) と, Hemin 加 Sauton 寒天培地上のコロニー数 (S F (-) 株と supporting factor 要求株——S F (+) と略——の混合) との比は実験により異なる。

表 1 I N H 100 μg/ml 加 Sauton 寒天培地に分離せられた one step mutants の Hemin 要求性 (培養 5 日間, コロニー数算定)

培地	* 1.5% Sauton 寒天培地	△ 5μg/ml Hemin 加 1.5% Sauton 寒天培地	全コロニーにおける Hemin 要求株の割合
実験 1	2	249	99.2 %
” 2	12	106	88.7 %
” 3	26	201	87.1 %
” 4	30	192	84.3 %

* Hemin 非要求性株
△ Hemin 要求性株と非要求性株の混合 (全コロニー数)

表 2 S F (+) 株の分離と継代 (培養 10 日間, コロニー数算定)

培地	1.5% Sauton 寒天培地	5μg/ml Hemin 加 1.5% Sauton 寒天培地
分離	0	872
継代1代	0	720
” 2代	0	1,180
” 3代	0	868
” 4代	0	664
” 5代	0	272
” 6代	0	922

(2) 表 1 の実験 1 の, Hemin 加培地上の数コロニーをとり, 菌懸濁液を作製し, Hemin 5 μg/ml 加 1.5 % Sauton 寒天培地と 1.5 % Sauton 寒天培地に接種して, 表 2 に示すとおりに純粋に S F (+) 株を分離した。

(3) 常に実験方法に示された方法に従い, この S F

(+) 株の菌懸濁液をつくり, 培地当り 0.01 μg を接種して 5 μg/ml Hemin 加 Sauton 寒天培地に継代したところ, 表 2 に示すとおりに, この S F (+) 株は supporting factor 要求性に関して全く安定であつた。

(4) S F (+) 株の 1 mg/ml 菌懸濁液, およびその 10⁻⁴ 稀釈菌液を 1.5 % Sauton 寒天培地, および 5 μg/ml Hemin 加 1.5 % Sauton 寒天培地に接種したところ, 表 3 に示すとおりに S F (+) 株より Sauton 寒天培地に発育する菌株を得た。分離率は 1.71 × 10⁻⁴ であつた。同菌株は表 4 に示すとおりに I N H に対して抵抗性を有し, Sauton 寒天培地においては発育の遅い菌株と S F (+) 株の混合であつた。

表 3 S F (+) 株より Sauton 寒天培地に発育する菌株の分離 (培養 5 日間)

培地	1.5 % Sauton 寒天培地	5μg/ml Hemin 加 1.5 % Sauton 寒天培地
接種菌量	0.1 mg / 0.1 ml (湿菌量)	0.1 mg / 0.1 ml × 10 ⁻⁴ (湿菌量)
発育コロニー数 (平板培地)	189	88
	114	72
	137	97
	112	94
	157	88
	192	79
	208	108
	105	76
106	86	
162	80	
総菌数/1ml	1,482	868
* 分離率	1.71 × 10 ⁻⁴	

* 分離率 = $\frac{1.5\% \text{ Sauton 寒天培地上の総菌数}}{5\mu\text{g/ml Hemin 加 } 1.5\% \text{ Sauton 寒天培地上の総菌数}} \times 10^{-4}$

II. supporting factor について

(1) S F (+) 株の supporting factor を検討するために, 1.5 % Sauton 寒天培地に表 5 に示す薬剤を添加して, その supporting effect を検討した。supporting effect を示したものは Hemin, 焦性ブドウ酸ナトリウム, クエン酸鉄アンモンであつた。

(2) supporting effect を示した 3 種の薬剤の最低有効濃度を検討した。表 6 に示すとおりに Hemin 3.2 μg/ml, 焦性ブドウ酸ナトリウム 25 μg/ml, クエン酸鉄アンモン 500 μg/ml であつた。

III. supporting factor を必要としない菌株の I N H 耐性度の上昇について

表 1 実験 1 の, 1.5 % Sauton 寒天培地に発育したコロニー (S F (-) 株) を, I N H を階段状濃度に添

表4 SF (+) 株より Sauton 寒天培地上に分離せられた菌株の Hemin 要求性と INH の耐性度 (コロニー数算定)

菌量	培養日数	1.5 % Sauton 寒天培地						5 $\mu\text{g/ml}$ Hemin 加 Sauton 寒天培地
		INH 10 $\mu\text{g/ml}$	INH 5 $\mu\text{g/ml}$	INH 2.5 $\mu\text{g/ml}$	INH 1.25 $\mu\text{g/ml}$	INH 0.64 $\mu\text{g/ml}$	INH 0	
0.01 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	5	0	0	0	0	0	0, 0	157, 164
	10	0	31	96	102	93	125, 122	157, 164
0.001 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	5	0	0	0	0	0	0, 0	21, 19
	10	0	2	9	7	12	10, 14	21, 19

表5 supporting effect の検討

(基本培地: 1.5% Sauton 寒天培地, 培養10日間)
 SF (+) 株および竹尾株感性株
 接種菌量: 0.01 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$, コロニー数算定

添加薬剤	濃度 $\mu\text{g/ml}$	SF (+) 株の発育	感性株の発育
添加せず		(-)	267
Vitamin B ₆	100	(-)	151 コロニー小
ブドウ糖	10,000	(-)	235
フマル酸	1,000	(-)	233
コハク酸	1,000	(-)	86 コロニー小
クエン酸	50,000	(-)	(-)
Hemin	5	118	229
焦性ブドウ酸ナトリウム	200	109	254
クエン酸鉄アンモン	500	104	318

表6 Hemin, 焦性ブドウ酸ナトリウム, クエン酸鉄アンモンの, SF (+) 株に対する supporting effect を示す最低濃度

(SF (+) 株, 接種菌量: 0.01 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ (培養10日間, 基本培地: 1.5% Sauton 寒天培地))

添加薬剤濃度 $\mu\text{g/ml}$	Hemin	発育コロニー数	焦性ブドウ酸ナトリウム	発育コロニー数	クエン酸鉄アンモン	発育コロニー数
100	100	コロニー小 68	6,400	114	1,000	75
	50	コロニー小 108	3,200	81	500	64
	25	コロニー小 92	1,600	114	250	0
	12.5	コロニー中 96	800	105	125	0
	6.4	72	400	73	64	0
	3.2	82	200	75		
50	1.6	コロニー小 11	100	89		
	0.8	0	50	73		
			25	36		
			12.5	0		

加した 1.5 % Sauton 寒天培地に継代し, 次第に耐性を上昇せしめ, 表 7 に示すとおり INH 10 $\mu\text{g/ml}$ 加培地に発育するコロニーを得た。

IV. SF (+) 株, SF (-) 株の INH に対する

表7 SF (-) 株の INH 耐性度の上昇 (培養5日間, 発育コロニー数算定)

継代数	培地	INH 20 $\mu\text{g/ml}$ S-A	INH 10 $\mu\text{g/ml}$ S-A	INH 5 $\mu\text{g/ml}$ S-A	INH 2.5 $\mu\text{g/ml}$ S-A	INH 1.25 $\mu\text{g/ml}$ S-A	INH 0.64 $\mu\text{g/ml}$ S-A	S-A
1	代	0	0	0	* 216	185	247	335
2	代	0	0	* 44	46	325	312	262
3	代	0	* 3	58	339	573	487	489
4	代	0	33	387	379	421	392	353

継代は前回の最高濃度培地に発育したコロニーを使用する。-*印
 培地は INH 加 1.5% Sauton 寒天培地 (S-A と略)

耐性度

SF (+) 株, SF (-) 株の, INH に対する耐性度を焦性ブドウ酸ナトリウム 25 $\mu\text{g/ml}$ 加 Sauton 培地において検査した。使用した SF (+) 株は分離後, 5 $\mu\text{g/ml}$ Hemin 加培地に, SF (-) 株は分離後 Sauton 寒天培地に 2 代継代したものである。接種菌量

は培地当り 0.5 μg である。表 8 に示すとおり SF (+) 株, SF (-) 株いずれも低濃度の INH に対して耐性を示した。

考案

Fisher^{1) 2)} が液体の合成培地において, one step

表 8 INHのSF(+)株, SF(-)株および感性株に対するMIC (最小発育阻止濃度) $\mu\text{g/ml}$

(培地: 25 $\mu\text{g/ml}$ 焦性ブドウ酸ナトリウム加)
(Sauton 培地, 接種菌量: 0.5 $\mu\text{g}/2\text{ml}$)

菌株	SF(+)株	SF(-)株	感性株
培養日数			
3	32	16	2
5	32	16	2
7	32	32	2
10	32	32	4

selection method により得た, H₃₇Rv 株の INH 耐性株が growth factor として Hemin を要求することを報告して以来, 結核菌の INH 耐性株の栄養要求性に関して, Cohn ら^{3) 4)}, Middlebrook ら⁵⁾, Barry ら⁶⁾, Knox⁷⁾ により, 多くの仕事なされている。また Jensen⁸⁾ は SM 耐性の *Micrococcus pyogenes* において, Beljanski⁹⁾ は *Escherichia coli* において, Hemin 要求株を分離しその細菌学的, 生化学的意義について検討を行なっている。Fisher は彼の分離した Hemin 要求株が, 3~4 回, 7 日ごとに Tween-Albumin 培地中に, INH を添加することなく継代せられるならば, INH に対する抵抗性は保たれているが, growth factor の要求性は消失するとし, INH を 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 添加した Tween-Albumin 培地中に継代するならば, 10週間はその growth factor 要求性は安定であつたと述べている。Cohn らは前述したように, INH 耐性の R 株 (Rx 株と Ry 株の混合) および Ry 株を分離し, Rx 株は栄養要求性に厳格であり, Ry 株は栄養要求性に厳格でないとした。さらに Cohn らは Hemin, 焦性ブドウ酸ナトリウム, クエン酸鉄アンモンが真の growth factor ではなく, 夾雑する Mn イオンの発育抑制作用を中和するものと述べている。Barry らは 8 株の INH 耐性株が菌株により, それぞれ異なる栄養要求性をもつので, 単一な機構においてはその本質を説明できないとしている。

著者は実験結果に示したごとく, INH 100 $\mu\text{g/ml}$ の one step mutants より, 1.5 % Sauton 寒天培地上の発育に Hemin, 焦性ブドウ酸ナトリウム, あるいは通常量の 10 倍のクエン酸鉄アンモンを必要とする SF(+) 株を分離したが, この菌株から 1.71×10^{-4} の分離率で SF(+) 株と, 発育の遅延した supporting factor 非要求性の INH 耐性株の混合した菌株が得られるので, この SF(+) 株は実験に示されたような継代法によつてのみ, supporting factor 要求性に関して純粋性が保たれていると考えられる。またかかる菌株が Hemin などを含まない INH 100 $\mu\text{g/ml}$ 加 Sauton 寒天培地に分離せられたのは, 培地当り 1 mg (湿菌

量) という多量の菌が接種せられ, 生残つた mutants は培地当り 286 コロニーにすぎないので, 生残つた菌が死滅した菌体内の有効成分を利用したと考えることが妥当と思われる。また逆に, SF(+) 株より 1.71×10^{-4} の分離率で Sauton 寒天培地に分離せられた菌が, 完全な supporting factor 非要求株でないことは, SF(+) 株の菌体内において少量ではあるが通常の Sauton 寒天培地においても生存できるような有効物質をつくつていていると考えられる。

supporting factor として有効であつた物質の相互関係については, supporting effect の本質を明らかにするために, 今後の実験において検討を行なう予定であるが, 少なくとも現段階においていいうことは, 焦性ブドウ酸ナトリウムは TCA-cycle の一員としての働きによるものではない。

次に SF(+) 株, SF(-) 株, 感性株の INH に対する耐性度を検討するさいに, Sauton 培地に焦性ブドウ酸ナトリウムを添加したのは, SF(+) 株の発育を支持するためであつたが, 焦性ブドウ酸ナトリウムは INH に拮抗するので INH の耐性度を見掛上や高めている点を考慮しなくてはならない。

これらの supporting factor の要求性と INH の耐性との間には, SF(-) 株の耐性上昇を通常の INH 加 Sauton 寒天培地上になしえた事実により直接的関係はない。しかしながら, SF(+) 株の分離の第 1 段階は, INH 100 $\mu\text{g/ml}$ 加培地においてなされ, また感性株にはかかる特性を有する菌株が得られないことにより, INH 耐性とは間接的な関係を有するものと思われる。これらの点に関しては, これらの菌の INH 耐性出現順序において占める役割, またこれらの菌の生物学的特性を今後の実験において確かめることにより明らかにせられなくてはならない。

結 論

1) 鳥型菌竹尾株から, INH に対して軽度の耐性 (焦性ブドウ酸ナトリウム 25 $\mu\text{g/ml}$ 加 Sauton 培地において, INH の MIC が感受性株の 8~16 倍) を有し, 1.5 % Sauton 寒天培地においてはその発育に supporting factor を必要とする菌株 SF(+) 株と, supporting factor を必要としない菌株 SF(-) 株をそれぞれ分離した。

2) SF(+) 株を Hemin 5 $\mu\text{g/ml}$ 加 1.5 % Sauton 寒天培地上に 6 代継代することにより, supporting factor の要求性に関して全く純粋かつ安定であることを知つた。

3) SF(-) 株を INH 加 1.5 % Sauton 寒天培地に継代することにより INH 耐性を上昇せしめ INH 10 $\mu\text{g/ml}$ 加 Sauton 寒天培地に発育するコロ

ニーを得た。

4) supporting factor として有効であつたのは He-min $3.2 \mu\text{g/ml}$, 焦性ブドウ酸ナトリウム $25 \mu\text{g/ml}$, クエン酸鉄アンモン $500 \mu\text{g/ml}$ であつた。

5) S F (+) 株より 1.71×10^{-4} の分離率で I N H 耐性の 1.5 % Sauton 寒天培地上においては, 発育の遅延する菌株と S F (+) 株の混合菌株を得た。

稿を終るにあたり, 御校閲を賜つた日比野進教授および橋本郁博士に深甚なる謝意を表わすとともに, 御指導を賜つた田中伸一博士に深謝いたします。

本論文の要旨は, 第 34 回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 626, 1952.
- 2) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954.
- 3) Cohn, M.L., Oda, U., Kovitz, C. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 465, 1954.
- 4) Cohn, M.L., Kovitz, C., Oda, U. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 5) Middlebrook, G., Cohn, M.L. & Schaefer, W.B. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 852, 1954.
- 6) Barry, V.C., Conalty, M.L., Denney, J.M., Gaffney, E.E. & Winder, F. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 785, 1955.
- 7) Knox, R. : J. Gen. Microbiol., 12 : 191, 1955.
- 8) Jensen, J. : J. Bact., 73 : 324, 1957.
- 9) Beljanski, M. : Compt. rend., 240 : 1351, 1955.

1) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 626,