

マウス結核症に関する研究

第13報 マウス体内におけるINH耐性菌の、SMおよびINH投与によるINH耐性の変動ならびにSM耐性

中野 昭

北里研究所(指導 水之江公英博士)

国立中野療養所(所長 佐々虎雄博士)

受付 昭和34年10月30日

I 緒言

結核菌のストレプトマイシン(SM)耐性は試験管内継代によって耐性度の変動を認めず^{1)~5)}、臨床的にもまた動物実験においても一般に安定したものとする報告が多い^{4)~7)}。これに対してイソニコチン酸ヒドラジド(INH)耐性結核菌は *in vitro* で耐性が低下ないし消失すると報告されている^{8)~17)}。一方、変動を認めない報告もみられる^{5) 10) 11) 13) 16) 18)~26)}。患者から直接分離される結核菌のINH耐性は変動がひどく安定でないとする成績が多い。動物体内のINH耐性菌の耐性度の変動に関しては、未だ意見の一致がみられない^{5) 10) 15) 23) 24) 27)~38)}。

私は、結核菌を感染させてINH治療を施したマウスの体内より分離したINH耐性菌をマウスに感染せしめ、INHおよびSMを投与して、臓器内生菌分布とそのINH耐性分布およびカタラーゼ活性の推移を追求、あわせてSMとの2重耐性に関して検討を加えたので報告する。

II 実験材料および方法

1) 使用菌株：強毒人型結核菌黒野株の尾静脈感染マウスをINH治療することにより渡辺³⁹⁾がその治療マウスの肺から分離したカタラーゼ反応陰性、100 γ/ml INH耐性株 No. 90 の、3% KH_2PO_4 培地 10 日間培養のものを用いた。

2) 使用培地：3% KH_2PO_4 培地、およびその所要濃度にINHまたはSMを含有する耐性測定用培地。

3) 使用動物：生後2~3週間の体重11g前後(最大±1g)のddN系マウス。

4) 実験方法：表1のごとき耐性度 Population を示すINH耐性黒野株 No. 90 の1 mg/ml 菌液を0.1 ml 宛マウスの尾静脈に接種感染せしめた。(接種生菌単位 82×10^4) マウスを、

第I群：対照として放置

第II群：INH 0.03 $mg/0.1ml$ 宛連日皮下注射第III群：SM 0.5 $mg/0.1ml$ 宛連日皮下注射第IV群：SM 1.0 $mg/0.1ml$ 宛連日皮下注射

の4群に分けて、治療群は翌日より注射を開始し、毎週体重を測定して2過後、5過後、8過後にそれぞれ6匹宛屠殺剖検し、その3匹宛について肺、脾、肝、腎の各全臓器を定量培養し、INHおよびSM耐性測定を直接法で同時に行なった。臓器定量培養は各臓器を無菌的に剔出し、重量測定後1% NaOH水とともにホモジナイザーにて磨碎均等乳化し、さらに1% NaOH水を加えて10段階稀釈を行ない適当と思われる稀釈度3段階の各0.1 ml 宛を2本の3% KH_2PO_4 培地にそれぞれ定量培養した。また耐性測定には、INHについては0.1, 1, 10, 100 γ/ml 、SMについては1, 10, 100 γ/ml の濃度系列を用いた。

判定はいずれも4週間培養後の算定可能な菌集落数に基づいて行ない、またその耐性分布を求めた。

表1 接種生菌単位およびPopulation構成

接種生菌 単位	カタラー ゼ反応	INH濃度 γ/ml				SM濃度 γ/ml			PAS濃度 γ/ml		
		0.1	1	10	100	1	10	100	1	10	100
82×10^4	—	77	95	71	47	95	—	—	—	—	—

さらにこの菌集落について Middlebrook, G. の方法⁴⁰⁾を用い、30% H_2O_2 水と10% Tween 80 水溶液の等量混液にて発泡状態よりカタラーゼ活性度を調べた。なお一部発育集落数の僅少なものについては継代増菌したのち実施した。実験期間中の死亡マウスは剖検して結核死を確かめた。

III 実験成績

1. 体重の推移

菌接種時のマウス平均体重は11.0 g で、以後4群の各平均体重増加率は図1のごとく、各群とも増加を認

図1 各群マウス平均体重増加率

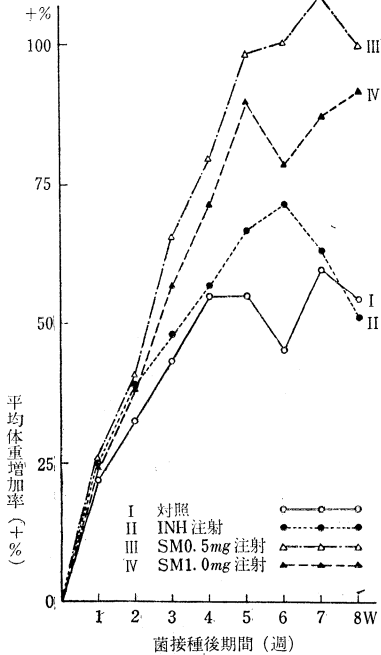
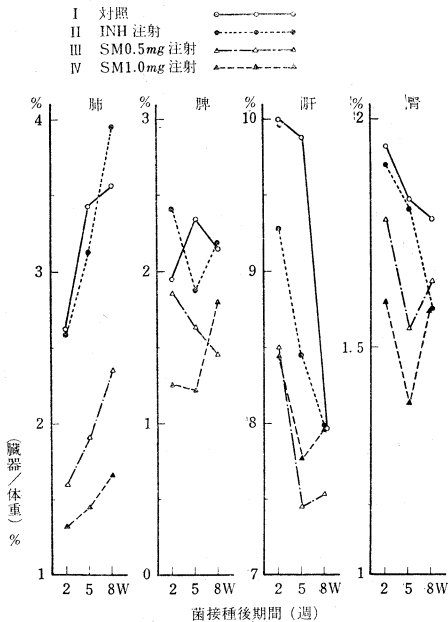


図2 各臓器平均重量(対体重%)の推移



めるがI群ははじめてから最小で4週以後変動が少なく、II群では6週以後減少しはじめた。各群の差は2ないし3週以後次第に明らかとなり、8週目にはIII、IV群はI、II群に比して著明な増加を示し、それぞれ前者は22.5gおよび22.0gで、後者は16.0gおよび16.3gであった。

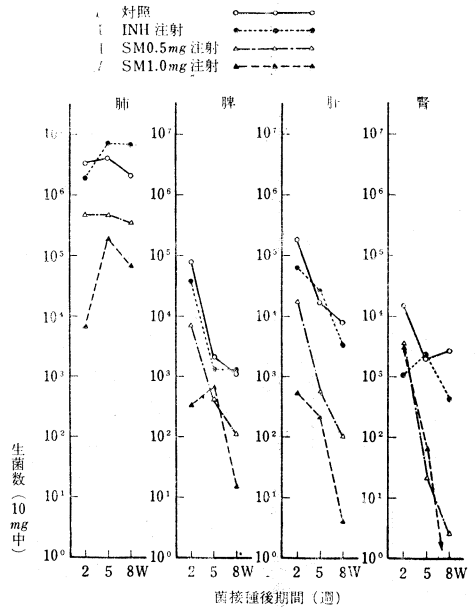
2. 臓器重量の推移

各臓器の平均重量の変動をそれぞれの平均体重に対する比(%)として図2に示す。肺においては各群の差がもつとも著明で2週目よりすでにI、II群とIII、IV群との間に大差を認め、この傾向は8週後まで持続して後に述べるごとく各群の生菌単位の消長と平行的である。脾においてもやや差がみられる。肝、腎では2週、5週にて差がみられるが、8週にいたつて各群の間に明らかな差はみられなかった。

3. 臓器内生菌単位数の消長

各臓器10mg中の平均生菌単位数の消長を図3に示し、また各動物の全臓器内のそれぞれの生菌単位数は表2(1)(2)のごとくである。

図3 各臓器10mg中平均生菌単位の消長



1) 肺: I, II, III群は著明な変動なく経過し、IV群では5週目に増加するが以後減少する。8週後における生菌単位数はII, I, III, IV群の順であった。

2) 脾: I, II群は差がなく5週目に著明な減少をみるが以後変動をみない。III群は5週、8週と減少を続け、IV群では5週目不変で以後減少する。8週後においてI, II群は等しく、III群さらにIV群は前2者の生菌単位数より著明に少ない。

3) 肝: 各群いずれも経過とともに減少を続けた。III, IV群ではI, II群に比して著明な減少をみるが、IV群の8週後なお7×10²の生菌数を認めた。

4) 腎: 2週目はI群がもつとも多いが各群の間の差は僅少で、以後I, II群の変動少なるに比しIII, IV群は急激に減少して8週後のIV群では10⁻²において菌集落の発生を認めなかった。

以上各群とも生菌単位数は肺にもつとも多く、肝、脾で

表 2 (1) 臓器別全生菌単位数, 耐性分布およびカタラーゼ反応の推移

臓器	接種後 マウス 実験群	2 週 後				5 週 後				8 週 後			
		全生菌 単位数		INH耐性 (γ/ml) S/M耐性		全生菌 単位数		INH耐性 (γ/ml) S/M耐性		全生菌 単位数		INH耐性 (γ/ml) S/M耐性	
		カタラーゼ	0.1 1 10 100	0.1 1 10 100	1 10 100	カタラーゼ	0.1 1 10 100	0.1 1 10 100	1 10 100	カタラーゼ	0.1 1 10 100	0.1 1 10 100	1 10 100
肺	I 対照	1	70 × 10 ⁶	120 90 50 80	60 - -	59.5 × 10 ⁷	-	19 - 49 13	54 - -	13.5 × 10 ⁷	-	9 14 10 -	20 - -
		2	15.5 × 10 ⁷	18 21 24 8	16 - -	40 × 10 ⁶	-	40 10 40 -	60 - -	11.5 × 10 ⁷	-	6 4 8 -	10 - -
		3	12.5 × 10 ⁷	12 8 21 C	2 - -	65 × 10 ⁶	-	100 80 80 30	40 - -	-	-	-	-
	II INH	M	12 × 10 ⁷	14 13 17 8	8 - -	23 × 10 ⁷	-	11 3 30 5	21 - -	13 × 10 ⁷	-	8 9 9 -	15 - -
		1	10 × 10 ⁶	4 10 6 9	7 - -	68 × 10 ⁷	-	134 88 76 44	72 - -	15 × 10 ⁷	-	12 29 18 -	24 - -
		2	35 × 10 ⁶	50 10 50 20	70 - -	36 × 10 ⁷	-	62 38 60 27	38 - -	20.5 × 10 ⁷	-	27 16 25 -	36 - -
	III 0.5mg SM	3	80 × 10 ⁶	60 C -	-	90 × 10 ⁶	-	50 60 90 -	50 - -	94 × 10 ⁷	-	114 C 87 87	95 - -
		M	72 × 10 ⁶	50 10 37 37	47 - -	38 × 10 ⁷	-	67 44 48 24	38 - -	43 × 10 ⁷	-	51 23 40 22	51 - -
		1	50 × 10 ³	20 280 360 -	130 - -	25 × 10 ³	-	20 60 50 10	-	17.5 × 10 ⁶	-	12 24 16 10	5 - -
	IV 1.0mg SM	2	17 × 10 ⁶	15 0.2 -	13 - -	10 × 10 ⁶	-	20 40 10 20	10 - -	26 × 10 ⁶	-	24 24 17 12	25 - -
		3	13 × 10 ⁶	7 10 4 -	4 - -	25 × 10 ⁶	-	10 30 10 -	-	13 × 10 ⁶	-	19 9 13 13	11 - -
		M	10 × 10 ⁶	7 4 2 -	6 - -	20 × 10 ⁶	-	17 43 23 10	3 - -	19 × 10 ⁶	-	18 19 15 12	14 - -
脾	I 対照	1	25 × 10 ⁴	25 - 25 -	25 - -	10 × 10 ⁶	-	50 20 10 10	30 - -	20.5 × 10 ⁵	-	18 37 24 8	42 - -
		2	0 × 10 ⁴	60 10 10 -	90 - -	61 × 10 ⁵	-	65 56 60 31	69 - -	55 × 10 ⁴	-	60 160 100 -	70 - -
		3	25 × 10 ⁴	25 - -	13 - -	66 × 10 ⁵	-	91 35 77 3	41 - -	69 × 10 ⁵	-	47 56 40 20	65 - -
	II INH	M	17 × 10 ⁴	37 3 12 -	43 - -	76 × 10 ⁵	-	210 97 79 45	137 - -	32 × 10 ⁵	-	24 36 23 9	38 - -
		1	15 × 10 ⁵	14 19 10 1	14 - -	20 × 10 ⁴	-	10 20 40 -	20 - -	14.5 × 10 ³	-	8 6 4 1	9 - -
		2	25.5 × 10 ⁵	15 C C C	1 - -	34 × 10 ³	-	35 20 30 -	10 - -	59 × 10 ³	-	10 83 62 -	56 - -
	III 0.5mg SM	3	27.5 × 10 ⁵	15 22 5 6	-	29 × 10 ³	-	2 29 20 4	4 - -	-	-	-	-
		M	23 × 10 ⁵	15 21 8 4	8 - -	88 × 10 ³	-	45 83 150 1	71 - -	37 × 10 ³	-	9 45 33 0.5	33 - -
		1	22 × 10 ⁵	13 4 7 1	19 - -	96 × 10 ³	-	108 113 121 19	84 - -	62.5 × 10 ³	-	54 55 47 10	47 - -
	IV 1.0mg SM	2	57 × 10 ⁴	70 20 30 -	50 - -	29 × 10 ³	-	43 22 17 3	13 - -	21 × 10 ³	-	38 21 25 -	25 - -
		3	11.5 × 10 ⁵	6 - -	3 - -	40 × 10 ²	-	30 30 60 20	20 - -	45.5 × 10 ³	-	45 41 63 35	40 - -
		M	13 × 10 ⁵	9 2 3 0.3	9 - -	43 × 10 ³	-	51 46 48 8	33 - -	43 × 10 ³	-	46 39 45 15	37 - -
平均値	1	0 × 10 ⁴	13 - -	6 - -	21.5 × 10 ³	-	21 25 26 19	3 - -	0 × 10 ²	-	20 - 20 -	-	
	2	40 × 10 ⁴	10 - -	-	22 × 10 ³	-	18 3 4 2	2 - -	65 × 10 ²	-	20 30 10 20	50 - -	
	3	15 × 10 ⁴	10 10 10 -	30 - -	20 × 10 ²	-	10 30 20 -	20 - -	45 × 10 ²	-	20 70 30 30	70 - -	
雑菌	M	18 × 10 ⁴	11 3 3 -	12 - -	15 × 10 ³	-	13 10 11 7	2 - -	37 × 10 ²	-	20 33 20 17	40 - -	
	1	0 × 10 ⁴	12 - 3 -	6 - -	54 × 10 ³	-	41 25 58 10	29 - -	10 × 10 ²	-	- 20 10	-	
	2	0 × 10 ³	32 - 17 -	6 - -	12 × 10 ³	-	2 2 5 1	4 - -	5 × 10 ²	-	- 10 -	-	
平均値	3	10 × 10 ⁴	5 - -	-	25 × 10 ²	-	40 20 40 10	30 - -	5 × 10 ²	-	- - -	-	
	M	33 × 10 ³	216 - 16 -	22 - -	23 × 10 ³	-	16 10 22 4	12 - -	7 × 10 ²	-	- 10 3	-	

M: 平均値 C: 雑菌入り

表 2(2) 臓器別全生菌単位数, 耐性分布およびカタラーゼ反応の推移

臓器	2 週 後			5 週 後			8 週 後								
	接種後 マウス 成績	全生菌 単位数	I NH耐性 (γ/ml) SM耐性	全生菌 単位数	I NH耐性 (γ/ml) SM耐性	全生菌 単位数	I NH耐性 (γ/ml) SM耐性	カタラーゼ	I NH耐性 (γ/ml) SM耐性						
		0.1 1 10 100	1 10 100	0.1 1 10 100	1 10 100	0.1 1 10 100	1 10 100	0.1 1 10 100	1 10 100						
肝	I 対照	1	10 × 10 ⁸	-	64.5 × 10 ⁵	23 20 30	-	-	10 × 10 ⁵	9 12 8	-	21	-		
		2	40 × 10 ³	10	75 × 10 ⁴	40 40 40	-	-	10.5 × 10 ⁵	6 8 4	-	10	-		
		3	25 × 10 ⁶	-	12.5 × 10 ⁵	C C 4	-	10	-	-	-	-	-	-	
	II I NH	M	25 × 10 ⁶	3	28 × 10 ⁵	14 12 13	-	3	-	10 × 10 ⁵	8 10 6	-	16	-	
		1	15 × 10 ⁶	-	85.5 × 10 ⁵	-	91 128 102 8	-	56	30 × 10 ⁴	10 10 30	-	-	-	
		2	11.5 × 10 ⁶	7	20.5 × 10 ⁵	8 2 4	-	11	-	40 × 10 ⁴	20 30 40	-	80	-	
	III 0.5mg SM	3	0 × 10 ⁶	8	20 × 10 ⁴	6 - -	-	10	-	65 × 10 ⁴	110 50 40	-	60	-	
		M	9 × 10 ⁶	5	35 × 10 ⁵	5 7 11 3	-	23	-	45 × 10 ⁴	47 30 37	-	47	-	
		1	0 × 10 ⁵	-	13 × 10 ⁴	46 34 10	-	9	-	35 × 10 ³	10 20 10	-	-	-	
	IV 1.0mg SM	2	18.5 × 10 ⁵	-	12 × 10 ⁴	47 - 15	-	0.3	-	42 × 10 ²	14 40 16 9	-	18	-	
		3	47.5 × 10 ⁵	17	31 × 10 ³	- - -	-	5	-	80 × 10 ²	80 90 60 30	-	130	-	
		M	22 × 10 ⁵	6	94 × 10 ³	31 11 8	-	33	-	18 × 10 ³	8 17 8 4	-	10	-	
	腎	I 対照	1	0 × 10 ⁴	70	56.5 × 10 ³	38 38 39 6	-	9	-	20 × 10 ²	10 20 20 15	-	50	-
			2	0 × 10 ⁴	10	15 × 10 ²	110 - 10	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-
			3	25 × 10 ⁴	13	61 × 10 ³	25 - 13	-	24	-	0 × 10 ²	-	-	-	-
II I NH		M	80 × 10 ³	308	40 × 10 ³	750 - 208	-	11	-	7 × 10 ²	3 7 7 5	-	17	-	
		1	31 × 10 ¹	4	20 × 10 ⁴	48 48 69 12	-	-	-	10 × 10 ²	30 40 30	-	30	-	
		2	85 × 10 ⁴	-	55 × 10 ²	50 40 60 20	-	-	-	15 × 10 ¹	16 18 15 7	-	18	-	
III 0.5mg SM		3	35 × 10 ⁴	10	10 × 10 ²	10 70 C	-	10	-	-	-	-	-	-	
		M	41 × 10 ⁴	3	69 × 10 ³	22 38 33 7	-	0.3	-	76 × 10 ¹	82 92 76 35	-	92	-	
		1	71 × 10 ³	26	90 × 10 ²	123 86 100 13	-	20	-	90 × 10 ²	30 200 90 20	-	110	-	
IV 1.0mg SM	2	21 × 10 ³	-	20 × 10 ¹	12 38 34	-	12	-	12 × 10 ³	9 15 11 3	-	20	-		
	3	0 × 10 ³	5	25 × 10 ²	46 1 1	-	20	-	10.5 × 10 ¹	5 11 13 2	-	4	-		
	M	31 × 10 ³	10	71 × 10 ¹	60 42 45 4	-	35	-	11 × 10 ³	6 15 11 2	-	12	-		
平均値	1	0 × 10 ³	1	10 × 10 ²	- 1 -	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-		
	2	20 × 10 ¹	40	5 × 10 ²	30 - 10	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-		
	3	71 × 10 ³	9	5 × 10 ²	116 15 -	-	-	-	3 × 10 ²	-	-	-	-		
	M	90 × 10 ³	137	7 × 10 ²	139 5 33	-	-	-	1 × 10 ²	-	-	-	-		
	1	0 × 10 ³	2	65 × 10 ²	2 - -	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-		
2	0 × 10 ³	5	5 × 10 ²	- - -	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-			
3	35 × 10 ⁴	-	0 × 10 ²	- - -	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-			
M	12 × 10 ⁴	0.2	23 × 10 ²	0.1 - -	-	-	-	0 × 10 ²	-	-	-	-			

M: 平均値 C: 雑菌混入

は大差なく、腎においてもつとも少なかった。また各臓器とも I と II 群および III と IV 群はそれぞれほぼ等しいが、両者の間の差は著明であった。対照群 (I 群) においても経過中、脾、肝では次第に生菌数の減少をみる、肺、腎での変動は僅少で、肺においては INH 投与群 (II 群) の菌増殖がもつとも著明であった。また SM 投与群 (III, IV 群) の生菌単位の減少は肺ではほとんど認められないが、脾、肝および腎では急速にみられ腎においてもつとも著明であった。なお INH および SM の治療群において臓器内の生菌単位のマウスの個体差がみられた。

4. 分離菌のカタラーゼ活性度

前記各群の臓器より分離された菌集落のカタラーゼ反応は表 2(1)(2)に示すごとく、すべて陰性で陽性化は 1 例もみられなかった。

5. 分離菌の INH 耐性度の変動

各臓器における 4 群の INH 耐性度の推移を一括して表 2(1)(2)に示す。INH 10 γ/ml 以上の耐性菌の変動をみると、

1) 肺: 2 週後屠殺マウスの対照群では 3 匹とも完全耐性を示しているが、II, III および IV 群すなわち INH および SM 治療群の各 1 匹宛に INH 10 γ 以上耐性菌がみられなかった。5 週以後では各群ともに 10 γ 以上耐性菌の培養できないマウスはみられなかった。

2) 脾: INH 10 γ 以上耐性菌のみられなかったマウスは 2 週目では II 群に 1 匹、III 群に 2 匹、IV 群に 1 匹、また 8 週後の IV 群に 1 匹みられた。

3) 肝: INH 耐性 10 γ 以上の菌がみられなかったのは 2 週では I 群 2 匹、II 群 1 匹、III 群 1 匹、8 週では IV 群に 2 匹みられた。しかし 8 週後の IV 群のマウスでは薬剤を含有していない試験管すなわち対照培地にも集落が認められなかったため、菌数が減少して培養できなかったものであろう。

4) 腎: INH 耐性 10 γ 以上の菌がみられなかったのは 2 週の III 群に 2 匹、IV 群に 3 匹、5 週でも III 群に 2 匹、8 週では III, IV 群の各 3 匹にみられた。しかしこれら SM 投与の III, IV 群においてはいずれも菌数が著明に減少し、また培養できないものが多く 8 週後の対照培地に集落を認めたものは III 群の 1 匹のみであった。

6. SM 耐性

接種菌株は INH 100 γ/ml , SM 1 γ/ml の耐性を示しているが (表 1), 各臓器における分離菌の SM 耐性の推移は表 2(1)(2)に示すごとく、I 群の肝、腎において 2 ないし 5 週目に一時減少がみられるが 8 週後は変化をみない。II 群では経過中変動を認めなかった。SM を投与した III, IV 群の臓器内生菌数は減少し、それに伴って IV 群の脾においては 8 週後 SM 1 γ/ml 含有培地に集落が認められなかった。また腎では 2 週後すでに激

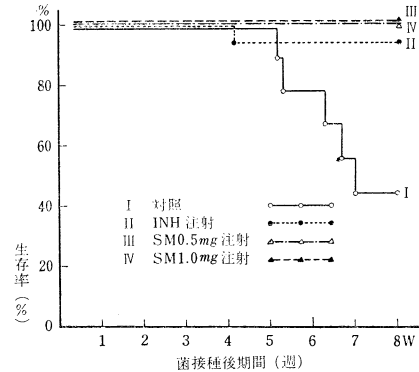
減し、III, IV 群とも 5 週後より SM 1 γ 耐性菌を培地上に認めることができなかった。

すなわち INH 耐性菌感染マウスに SM を投与しても、感性強毒菌を感染させて SM を投与した場合のように SM 耐性の上昇はみられなかった。

7. マウス斃死状況

一定時期 (感染後 2, 5, 8 週目) に屠殺剖検、定量

図 4 マウス生存率



培養したものおよび結核以外の死亡を除外したマウスの生存率は図 4 のごとくで、対照群において著明に低く、SM 投与群では 8 週までの間に結核死はみられなかった。且して INH 耐性結核菌感染マウスに INH を皮下注射することによって延命効果がみられた。

IV 総括および考察

INH 耐性菌のモルモット皮下接種では Virulence が減弱していることは、Tuczek, H. (1952) 41) 以来、平野ら 42), Middlebrook, G. 40), その他多くの研究者によつて報告されているが、マウスの静脈内接種においては Virulence の減弱を認めない報告が多い 27) 31) 40)。一方減弱しているとする成績 10) 29) 43), または高度耐性の場合には減弱しているが低耐性菌では不変であるとの成績 44) もみられる。Steenken, W. et al. 45), 堀 36), その他は INH 耐性度と Virulence との間には明らかな関係がみられないと述べているが、Mitchison, D. A. 44) 以来両者の間に一定の関係を認める報告が多い。

本実験における INH 耐性菌のマウスに対する Virulence は各臓器の生菌単位および斃死状況からみて、原株感性菌に比較すると減弱しているようにみうけられる。すなわち渡辺 43) の成績と一致する。

INH 感性の黒野株感染マウスにおいて、五味 46) は、INH はマウス体内ではアセチル化を受けにくく、経口、皮下いずれの投与方法によつても効果が著明で平均生存日数および死亡率に差がなかったと述べている。また Osako, Y. 47) は本実験と同一の INH 耐性株感染マウスに INH を経口投与して、対照に比べて生存率

の上昇を認められない成績を得ているが、本実験においては臓器内生菌数の減少が著明でないにかかわらず、INH を皮下注射した群に延命効果がみられた。このことは、INH は INH 耐性結核菌の増殖を阻止することはできないが、直接注射することによって、結核菌の生体に与える毒性を中和するためであろうか。

牛場²⁵⁾はモルモット単核細胞内増殖阻止実験において INH 耐性菌は SM に対して感受性になっており、試験管内実験でも INH 耐性株は SM によって原株よりも有意差をもって抑えられたことを報告している。また堀³⁴⁾はカタラーゼ活性の増強が SM によって著明な阻害を受けることから、INH 治療によりカタラーゼ活性の減弱した INH 耐性菌が高率に検出される患者には、SM の投与がより優れた効果を発揮する可能性があるのではないかと推論している。そこで本実験における SM の効果を、INH 感性の黒野株感染マウスに対して SM 1,000 γ 宛毎日治療を行なった水之江ら⁴⁸⁾の成績と比較すると、2 週目における肺、脾の定量培養の(対照群/治療群)平均生菌単位比は、INH 耐性菌感染時のほうが肺においては 1 Order 少ないが、脾ではほぼ同一であった。すなわち INH 感性菌と耐性菌とに対する SM の効果の差はあまり著明でないが、これらの点に関してはなお検討を要するものと思われる。

INH 耐性菌の耐性度は動物体内通過により接種時と同様変わらないという報告があるが、一方 INH 耐性菌と感性菌を混合して試験管内で継代培養したり動物に接種すると INH 耐性菌の占める比率が低下すること、また INH 治療を受けた患者材料を直接モルモットに接種した場合耐性度が低下ないし消失することが報告されている^{13) 14) 16) 23) 30)}。その原因は、混在する INH 感性菌と耐性菌の増殖力、発育速度の差によるものと考えられている。中山¹²⁾は INH 耐性菌を 0.01~0.001 % 以上に混在した菌株においても、耐性菌の発育がみられ菌株全体としての耐性度は変化しないと述べている。また Fisher, M.W.¹⁸⁾は INH 耐性菌はその発育に血清分画または特殊の発育要素を必要とすると述べている。東村⁴⁹⁾、三浦ら^{20) 22)}は SM 耐性株の Population 構成は均一であるが INH 耐性株は不均一であると報告している。Meissner, G.⁵⁰⁾は完全耐性を示すものの中にもなお感性菌が混在すると述べており、また Szybalski, W. et al.⁹⁾らも強調するごとく耐性菌の純粋性が重要である。佐藤¹¹⁾は耐性検査は直接法によるほうが菌群構成の変動が避けられるからより正確であるが、間接法による場合は菌量として 10^{-4} mg 程度を培養すべきであるとしている。また Canetti, G.⁵¹⁾も種々の耐性測定法について最低 0.013 ないし 4 % より 100 % までの間に耐性菌が存在する菌株は

すべて耐性と表現される可能性があるため、耐性測定は種々の影響を少なくするためにまず直接法を行なうべきで、間接法による場合は接種菌量を少なく 10^{-5} mg 程度とすべきであると述べている。

耐性菌の感性復帰を起こす機序については、耐性菌株中の耐性個体の占める比率の低下(増殖速度差)による菌株全体としての耐性低下のほか、突然変異や接合または誘導変異等の考えがある⁵⁾。積極的に感性化を促す試みとしては、他種抗菌剤の添加接触、培養条件の変換および耐性菌感染動物に対する他感受性薬剤の投与、その他コーチゾン投与、レントゲン照射等についての報告がみられる⁵⁾²⁴⁾。

INH 耐性菌のモルモット皮下接種実験において、山上²³⁾は完全耐性菌のみの場合は耐性度は変化しないが、感性菌との混合菌株では耐性菌の占める比率が激減して菌株全体としての耐性低下を認めている。曾和²⁴⁾は INH 耐性菌は感性菌に比してモルモット体内では早く消失してゆくが、耐性度の低下消失および Virulence の回復はみられなかつたと述べている。また Meissner, G.³⁰⁾、沢田ら³⁵⁾もモルモットを用いて INH 投与に関係なく接種時と同一耐性を保持したと報告しているが、Wilde, W.²⁹⁾、Barnett, M. et al.¹⁰⁾、鈴木ら¹⁵⁾は INH 耐性の低下を認めている。北本³⁷⁾は単個菌培養により分離した INH 耐性菌において、モルモットでもマウスでも通過後の INH 耐性度は不変であったことを報告している。

INH 耐性菌のマウス尾静脈感染実験においては、Barnett, M. et al.¹⁰⁾は INH 耐性 $H_{37}Rv$ 株にて INH 耐性度の低下とマウス生存期間の延長から Virulence の低下を認めているが、佐藤²⁸⁾は 10 γ/ml 完全、100 γ/ml 不完全の INH 耐性 $H_{37}Rv$ 株を用いて、INH 投与の有無に関係なく 4 週までの肺、脾よりの分離菌は 10 γ/ml 完全耐性を示し、その Virulence も原株と等しかつたと報告している。また Karlson, A.G. et al.²⁷⁾は INH 10 γ/ml 耐性 $H_{37}Rv$ 株感染マウスにおいて、INH を投与した 11 例中 7 例の肺で培養陽性で 20~40 γ/ml 耐性を認め、INH を投与しない対照群では 10 例中 8 例が培養陽性でそのうち 6 例に 20~40 γ/ml INH 耐性があり、生存日数よりマウスに対して Virulence を有していたと述べている。小坂ら³¹⁾は患者材料より分離した菌株および $H_{37}Rv$ 株から作った、INH と他薬剤との 2~3 重高度耐性株を感染させて 30 日間放置後のマウスの肺、肝、腎よりの分離菌の間接法耐性について、部分耐性株では耐性の低下があるが完全耐性株では耐性の変動をみながつたという。堀³⁴⁾は患者材料より分離した INH 0.05~0.5 γ/ml の各低度耐性株を感染せしめたマウスの肝乳剤を各群別に集めて混和して直接耐性測定をしてみる

と、INH 皮下注射の有無に関係なく 4 週後において耐性度は変化しなかつたことを報告している。柳沢ら³⁸⁾も INH 10 γ/ml 耐性 H₃₇Rv 株感染マウスにおいて、INH 投与に無関係にその耐性を保持し Virulence も原株とほぼ等しかつたことを認めている。渡辺⁴³⁾は薬剤を投与しないマウスの肺内で、INH 10 γ/ml 耐性菌感染では耐性の低下をみたが 100 γ/ml 耐性菌感染時は耐性の変動を認めなかつたと述べている。一方、大藤ら⁵⁾は INH 10 γ/ml 完全耐性 H₃₇Rv 株を接種したマウスの肺において、無処置群では INH 耐性の低下はあまりみられないが、SM 0.5mg/0.1ml 宛連日注射の場合は 6 カ月以上の長期間で 8 匹中 2 匹に、また 1~2 カ月の短期間では 6 匹中 3 匹に INH 耐性の低下を認めている。江見³²⁾は INH 50 γ/ml 完全耐性 F 株接種後 15 日目から INH を皮下注射した群を設けたが、投与の有無に関係なく 8 週までの間に菌増殖の容易な肺においては同一耐性度を維持した。経過とともに投与群、対照群とも生育集落数の減少や菌の証明されない臓器が増加して、一部に耐性低下を認めた。INH 耐性度の 100 γ/ml への上昇をみたものは 66 例中 6 例にすぎなかつたと報告している。

私は、マウスの体内で INH 耐性を獲得し INH 100 γ/ml 含有培地上に増殖した菌で、その後 INH 非含有培地での継代によつてもほとんど変動のない、安定した Population の 100 γ/ml INH 耐性菌をマウス尾静脈に接種感染せしめて、マウス体内で耐性の変動があるかどうか、また SM, INH を投与した場合の耐性の変動を臓器別に比較観察した。肺では 2 週後に II 群および IV 群に 1 例ずつ INH 非含有培地にかんりの数の菌集落を認めるのに、INH 10 γ/ml 含有培地には全く集落のみられない、すなわち耐性の低下または消失と思われるものがみられたが、5 週および 8 週には全然みられないところから耐性の低下または消失とは論じがたいであろう。脾および肝でも 2 週後の定量培養したマウスの中に、肺にみられたような INH 10 γ/ml 耐性菌のみられない例が現われたが、5 週後のマウスにはそのような例がみられないところから耐性の低下または消失とは考えられない。また 8 週後では IV 群の SM 1.0 mg 治療群に INH 10 γ/ml 耐性菌のみられないものがあつたが、全菌数が減少し対照の薬剤非含有培地にも全然または少数の集落しか認められないところからであろう。腎では III および IV 群の SM 治療群の 2 週、5 週および 8 週後の定量培養したマウスに INH 10 γ/ml 耐性菌のみられないものが相当数認められるが、これは全菌数の減少したためで、脾および肝と同様耐性の低下または消失とは考えられぬ。すなわち全菌数が減少した数例に耐性の低下または消失のような成績が得られたが、定量培養した 4 臓器内では INH および SM

を投与しても、無処置でも、耐性の低下または消失はみられなかつた。INH 耐性度の安定な本菌についてのこのような成績は、逆にいえば生体内で耐性が変動(低下)する INH 耐性菌は元来がその耐性度が安定しないものであるとも考えられよう。

INH 高度耐性菌はカタラーゼ反応陰性でモルモットに対する Virulence が低下していることを Middlebrook, G. (1954)⁴⁰⁾ が発表して以来、カタラーゼ活性度は INH 耐性度と関連性があるとする報告が多い。また動物に対する Virulence と、より密接な関係があると強調するもの⁵²⁾ もあり、これら 3 者の間に一連の関係を認めるものが多い。しかしこれらに関連性のない菌株があることも報告されており³⁸⁾、感性菌がある程度以上混在する INH 不完全耐性株においてカタラーゼ陽性を示したりまた耐性低下時に陽性化すると報告もみられる⁴³⁾⁵³⁾。北本³⁷⁾は INH 耐性菌をモルモットおよびマウスに感染通過後に分離した菌はカタラーゼ陰性のままであつたが、Virulence を有するものもありまたほとんど Avirulent のものもあつたと報告している。曾和²⁴⁾、柴田³³⁾らはモルモット体内を通過して分離した INH 耐性菌のカタラーゼ反応は陰性のままで、耐性度の変動もなかつたと述べている。私の成績においても INH とか SM の投与の有無および臓器の種類に関係なく、すべてカタラーゼ反応は陰性のままで陽性化したものはみられなかつた。

耐性獲得の機序については突然変異と選択による説と誘導変異説があり、前者を主因と考えるものが多く⁵⁾、牛場ら⁵⁴⁾は耐性の突然変異菌が出現しうる菌数にいたるために菌の増殖が旺盛なことで、選択作用を受けるために適当な濃度の薬剤との接触期間が必要であると述べている。すなわちある程度の接種菌量と、菌の増殖が抑制されない程度の投与薬剤量とにおいて動物が比較的長期間生存しうる必要があるであろう。マウスにおいて感性菌を接種して SM 治療を行ない SM 耐性菌の分離をみた報告のうち、手塚⁵⁵⁾は黒野株 0.1 mg の感染により SM を毎日 1 mg 宛 4 カ月間治療したマウスの肺から 15 例中 7 例 (47%) に SM 耐性菌の出現をみている。INH 耐性菌における SM 耐性の獲得、すなわち 2 重耐性菌の出現に関して、君野⁵⁶⁾は in vitro で INH 耐性菌は SM 耐性になりにくいと報告、一方、中山¹²⁾は人型 F 株の INH 100 γ/ml 耐性株の SM に対する耐性上昇の様相は感性菌の場合と差がないとし、また築山⁶⁾は人型 F 株の SM 耐性株 (>10 γ/ml) は原株に比して INH 耐性獲得様相に差異がないと述べている。大藤ら⁵⁾は SM 耐性 H₃₇Rv 株 (>100 γ/ml) は原株に比して INH に対する耐性上昇は遅く、また INH 耐性 H₃₇Rv 株も同様に原株より SM 耐性の上昇が遅いと述べ、同様の結果を SM

0.5 mg 宛治療を行なつたマウスにおいても認めている。すなわち INH 耐性菌感染マウスに SM 0.5mg 宛毎日注射を行ない、6 カ月以上の長期間にて8匹中1匹に SM 耐性をみたのみで、1~2 カ月の短期間では1代では1匹もなく5代継代感染治療を繰返して12匹中3匹に SM 耐性を認めたと報告している。本実験では、SM 0.5 mg 毎日注射でも SM 1.0 mg 毎日注射の場合も、他の臓器では生菌数減少が著明であつたが、肺においては8週後なお 10^6 order 以上の生菌数を認めるにかかわらず SM 耐性の上昇はみられなかつた。マウス体内で SM 耐性菌を得るのに手塚⁵⁵⁾は、また IHMS 耐性菌を得るのに岩下⁵⁷⁾は同一菌株の強毒結核菌黒野株を用いている。渡辺³⁹⁾も増殖力の強い黒野株においてはマウス体内で INH 耐性菌の出現を認めたが、増殖力の弱い $H_{37}Rv$ および三輪株ではほとんどみられなかつたことを報告している。このように動物体内で耐性菌を分離するためには、牛場⁵⁴⁾のいうように動物体内で相当の増殖をすることが必要であろう。この意味から INH 耐性菌を動物体内で SM 耐性すなわち2重耐性にするには相当な困難が予想される。

V 結 論

マウス体内から分離し、安定した INH 耐性度(100 γ/ml)をもつ結核菌を用いて実験した結果、

1) 本菌はマウスに対して致死作用および臓器内生菌単位よりみて、原株よりは弱いが一定の Virulence を示した。

2) 本菌感染マウスに INH を皮下投与することによつて延命効果がみられた。

3) 本菌の INH 耐性度は、マウス体内では肺、脾肝および腎のいずれの臓器においても、SM を投与した場合でも、また期間にも無関係に著明な低下または消失は認められなかつた。

4) 分離菌のカタラーゼ反応はすべて陰性のままであつた。

5) 本菌感染マウスに SM を投与しても、SM 耐性の上昇(すなわち2重耐性の出現)は認められなかつた。

終りに御校閲を賜つた慶大牛場大蔵教授ならびに御指導を頂いた水之江公英博士に深謝します。

文 献

- 1) Feldmann, W.H. et al.: Am. Rev. Tuberc., 57: 162, 1948.
- 2) Wolinsky, E.: Am. Rev. Tuberc., 58: 335, 1948.
- 3) Canada, R.O.: Am. Rev. Tuberc., 62: 654,

1950.

- 4) 岡田景俊: 十全医学雑誌, 55: 645, 昭28.
- 5) 大藤真他: 綜合臨牀, 7: 1317, 昭33.
- 6) 築山明: 医学研究, 25: 178, 昭30.
- 7) 高橋金彌他: 結核, 30 (増刊号): 209, 昭30.
- 8) Pansy, F. et al.: Am. Rev. Tuberc., 65: 761, 1952.
- 9) Szybalski, W. et al.: Am. Rev. Tuberc., 65: 768, 1952.
- 10) Barnett, M. et al.: Lancet, 1: 314, 1952.
- 11) 佐藤直行: 医学と生物学, 31: 250, 昭29.
- 12) 中山瑛一: 九州大学結核研究所紀要, 2: 1, 昭30.
- 13) 安淵義男他: 日本臨牀結核, 14: 987, 昭30.
- 14) 佐藤直行: 結核, 30: 119, 昭30.
- 15) 鈴木九五他: 九州大学結核研究所紀要, 4: 98, 昭33.
- 16) 小酒井望: 結核, 32 (増刊号): 65, 昭32.
- 17) 柿下正道他: 結核, 34 (特別号): 59, 昭34.
- 18) Fisher, M.W.: Am. Rev. Tuberc., 66: 626, 1952.
- 19) Tompsett, R.: Am. Rev. Tuberc., 70: 91, 1954.
- 20) 三浦幸二: 結核, 31: 616, 昭31.
- 21) 柴田一郎: 結核, 32: 17, 昭32.
- 22) 三浦幸二他: 結核, 32: 567, 昭32.
- 23) 山上清: 大阪大学医学雑誌, 10: 941, 昭33.
- 24) 曾和健次: 大阪大学医学雑誌, 10: 951, 昭33.
- 25) 牛場大蔵: 結核, 32 (増刊号): 70, 昭32.
- 26) 勝沼六郎: 結核の化学療法 (医学書院), 263, 昭28.
- 27) Karlson, A.G. et al.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 27: 373, 1952. (結核抄録, 3: 758, 昭27. より引用)
- 28) 佐藤直行: 医学と生物学, 29: 14, 昭28.
- 29) Wilde, W.: Tbk. arzt, 8: 481, 1954.
- 30) Meissner, G.: Beitr. Klin. Tub., 113: 62, 1955.
- 31) 小坂久夫他: 医療, 10: 286, 昭31.
- 32) 江見勇: 京都大学結核研究所紀要, 7: 94, 昭33.
- 33) 柴田一郎: 結核研究の進歩, 22: 69, 昭33.
- 34) 堀三津夫: 結核, 33 (増刊号): 14, 昭33.
- 35) 沢田藤一郎他: 日本臨牀結核, 14: 873, 昭30; 16: 589, 昭32.
- 36) 堀三津夫: 第15回日本医学会総会演説要旨, 179, 昭34.
- 37) 北本治: 結核, 32 (増刊号): 51, 昭32.
- 38) 柳沢謙他: 結核の化学療法 (医学書院), 87, 昭28.
- 39) 渡辺元洋: 結核, 34: 503, 昭34.

- 40) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 41) Tuczek, H. et al. : Münch. Med. Wschr., 94 : 1307, 1952. (35より引用)
- 42) 平野憲正 他 : 東京医事新誌, 70 : 371, 昭28.
- 43) 渡辺元洋 : 結核, 34 : 533, 昭34.
- 44) Mitchison, D.A. : Brit. Med. J., (1) : 128, 1954.
- 45) Steenken, W. et al. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 548, 1953.
- 46) 五味二郎 : 結核, 32 (増刊号) : 1, 昭32.
- 47) Osako, Y. : Kitasato Arch. of Exp. Med., 30 : 37, 1957.
- 48) 水之江公英 他 : 北里実験医学, 26 : 19, 昭28.
- 49) 東村道雄 : 医学と生物学, 38 : 11, 昭31.
- 50) Meissner, G. : Beitr. Klin. Tub., 110 : 219, 1953.
- 51) Canetti, G. : Bull. Internat. Union Tuberc., 25 : 149, 1955. (結核抄録, 7 : 721, 昭31.より引用)
- 52) Peizer, L.R. et al. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 246, 1955.
- 53) 杉本一 : 結核, 33 : 655, 昭33.
- 54) 牛場大蔵 他 : 結核, 30 : 114, 昭30.
- 55) 手塚孝 : 結核, 31 : 17, 昭31.
- 56) 君野徹三 : The J. of Antibiotics, Ser. B, 7 : 93, 昭29.
- 57) 岩下一郎 : 結核, 32 : 489, 昭32.