

結核菌のマウスに対するウィルレンス，とくに INH 耐性菌についての研究

中山 昇 二

慶応義塾大学院医学研究科

(指導 内科学教室 三方一沢教授)
細菌学教室 牛場大蔵教授)

受付 昭和 36 年 4 月 28 日

緒 言

結核菌がイソニコチン酸ヒドラジッド (INH) の高濃度に耐性となると、カタラーゼ活性が低下するとともに、モルモットに対してウィルレンスが低下することが 1953 年ころから相ついで報告されてきた^{1)~12)}。しかしマウスについては一定でなく、INH 耐性菌はマウスに対しウィルレンスを保持しているという成績^{13)~15)}、弱毒化しているという成績¹⁶⁾¹⁷⁾、または一定の傾向がみられない成績⁶⁾¹⁸⁾、等種々である。そこでマウスに対する INH 耐性菌のウィルレンスを検討するため、強毒人型結核菌より得られた INH 耐性株のマウス生体内増殖能を原株と比較することによりウィルレンスを追求した。

なお一般に結核菌のウィルレンスは生体内増殖能により規定されるといわれるけれども¹⁹⁾、また生体内増殖能によつてのみ結核菌のウィルレンスを云々しようとするに疑問がないとはいえない。そこでウィルレンスを構成するもう 1 つの因子であると考えられる毒素産生性とも関連させる意味で、各菌株死菌の毒性についても検討した。

実験材料および方法

I. 実験材料

〔使用菌株〕

- 1) 強毒人型結核菌黒野株 (当教室保存株)
- 2) i) 黒野-100 株 (黒野株より INH 100 γ /ml 含有小川培地で one step に分離した INH 耐性株)
ii) 黒野 A, B, C, D, E, F, G 株 (黒野-100 株と同様にして、それぞれ異なつた 7 つの clone より別個に分離した耐性株)
- 3) 強毒人型結核菌水木株 (北大結核研究所、高橋教授より分与)
- 4) i) 水木-R 株 (北大高橋教授より分与の INH 100 γ /ml 耐性株で患者から分離のもの)
ii) 水木-100 株 (水木株より INH 100 γ /ml 含有小川培地で one step に分離した INH 耐性株)

以上の INH 耐性株はすべてカタラーゼ陰性 (Middlebrook 氏法¹⁾) で、耐性度は INH 100 γ /ml 完全耐性、長期間継代使用しているも耐性度は安定である。

〔使用動物〕

- 1) SM 系雄マウス (生後 3 週)
- 2) ddN 系雄マウス (生後 5~6 週)
- 3) 市販の白色雄マウス (生後 3 週)

II. 方法

1) 生死観察群

黒野、黒野-100、水木、水木-100 の各株をそれぞれ Dubos-albumin 培地に 5 代継代し、その 0.2 ml の生後 3 週 of SM 系雄マウスの尾静脈より接種感染、各群 6 匹を使用し、生死を観察した。接種生菌単位は、黒野 1.3 $\times 10^7$ 、黒野-100 1.6 $\times 10^7$ 、水木 1.4 $\times 10^7$ 、水木-100 1.2 $\times 10^7$ である。

2) 臓器定量培養群

i) 第 1 回実験

上記 4 菌株のほかに、水木-R を加えて同様に SM 系雄マウスに接種感染した。水木-R の接種生菌単位は 1.8 $\times 10^7$ である。

観察は黒野株およびその INH 耐性株感染群については、感染後 1 時間、24 時間、72 時間、1 週、2 週、4 週、6 週、11 週に、また水木株およびその INH 耐性株感染群については、1 週、2 週、4 週、6 週、11 週に各 2 匹屠殺し、各臓器の病変を肉眼的に観察すると同時に、肺、脾、肝、腎の全量を定量培養した。定量培養の方法は 1 匹の臓器全体に 1% NaOH 溶液を 10 cc 加え、1 分間 5,000 回転のホモジナイザーに約 1 分間かけて、これを 1% NaOH で稀釈、1% KH₂PO₄ 加小川培地で培養した。この方法は阿部²⁰⁾の実験法を踏襲したものである。

ii) 第 2 回実験

前述の黒野 A~G の 7 株と黒野株を Dubos-albumin 培地に 3 代継代し、その 10 日培養菌液を用いて、上述の方法により市販の白色雄マウスに接種感染し、感染後 4 週、6 週に屠殺し、各臓器の病変を観察するとともに肺全量を定量培養した。

3) 死菌流動パラフィン浮游液(流パラ死菌)の毒性
 黒野株, 黒野-100株, 水木株, 水木-100株の
 Sauton 培地 4 週~5 週培養菌を 100 °C 1 時間加熱し,
 菌体を十分水洗, 滅菌濾紙にて水分を吸収後, 化学天秤
 にて秤量, 滅菌流動パラフィンにて 20 mg / 0.5 ml に
 なるように菌液を作成して, ddN 系雄マウスの腹腔内
 に 0.5 ml 注射し, 体重の変化を追求するとともにその
 生死を観察した。各群 8 匹宛マウスを使用, 対照群に
 は流パラ 0.5 ml を注射した。

実験成績

1) 生死観察群

表 1 に示すごとく, 黒野株は接種後 3 週より 5 週
 の間にすべて死亡するに對し, その INH 耐性株(黒
 野-100)では 8 週まで死亡するものは見られず, 明ら
 かなウィルレンスの差がみられた。水木株と水木-100
 株においては, 黒野株と黒野-100 株におけるごとき著
 明な差は認められなかつたが, 耐性株に生残期間の延長
 が認められた。

表 1 観察期間中におけるマウスの斃死状況

菌株	接種 生菌単位	斃死状況(週)								生存数
		1	2	3	4	5	6	7	8	
黒野	1.3×10^7			●●●●●						0
黒野-100	1.6×10^7									6
水木	1.4×10^7		●●●●●							0
水木-100	1.2×10^7					●●●●●				2

● 斃死マウス

2) 臓器定量培養群

i) 第 1 回実験

黒野株と黒野-100 株を比較すると, 図 1 に示すご
 とく, 肺, 腎における菌の消長はいずれの菌株でも菌接
 種後 3 日までに生菌数は減少するも以後増加し, その
 増殖能は原株と耐性株との間に明らかな差が認められ
 た。すなわち原株は 10~100 倍以上の菌数を示し, そ
 の差はとくに肺において著しかった。

これに反し肝, 脾においては図 2 に示すごとく, 両
 菌株の間に全く差が認められなかつた。また肺, 腎にみ
 られたような初期の減少がなく, 初期からやや多数の菌
 が著明な増加を示さずに経過した。

水木株とその耐性株(水木-100, 水木 R)において
 は, 図 3, 4 に示すごとく, 肺, 腎, 肝, 脾いずれにお
 いても原株と耐性株との間に増殖能の差はほとんど認め
 られなかつたことが, 黒野株とその耐性株との場合に比
 べて著しい相違といえる。ただ肺においてはとくに 4
 週目の水木-R 株の菌数が他に比して少ない成績であつ
 たが, その原株との差は黒野株と黒野-100 株間の差に

図 1 感染マウスの臓器別菌の消長

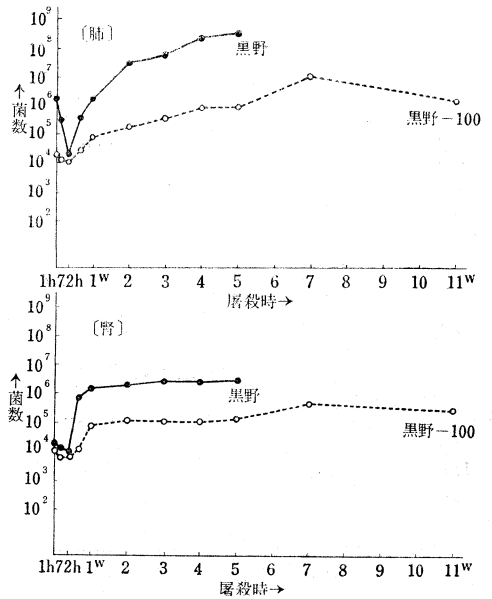
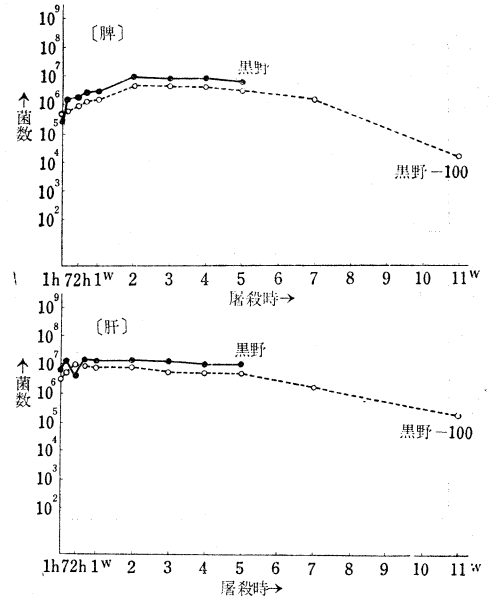


図 2 感染マウスの臓器別菌の消長



比較すれば, かなり小さいものといえる。また水木株の
 実験においても黒野株でみられたと同様に, 肺および腎
 の菌消長は脾および肝のそれと異なることを示す成績が
 得られた。

臓器の肉眼的な変化は, 黒野原株においては, 接種後
 3 週ころより肺に結節の形成が認められたが, 耐性株で
 は結節の形成は著明でなかつた。しかし水木株およびそ

図 3 感染マウスの臓器別菌の消長

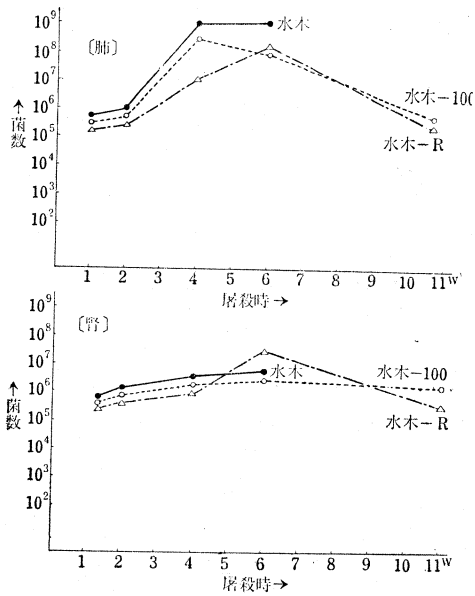
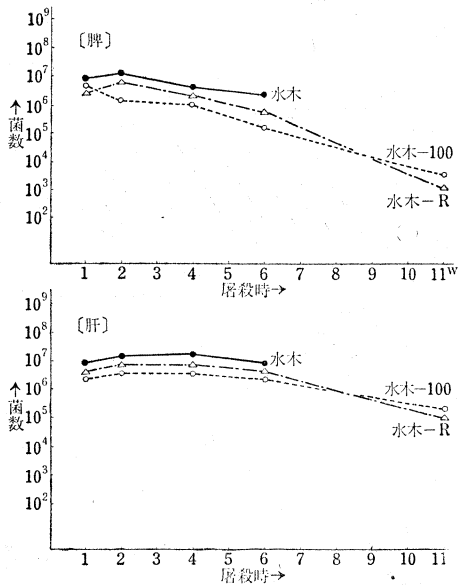


図 4 感染マウスの臓器別菌の消長



の耐性株においては、肺における結節形成等の肉眼的所見に差はみられなかつた。なおいずれの菌株においても、腎、肝、脾には著明な肉眼的変化は認められなかつた。

ii) 黒野 A~G 株

clone を別にして分離した 7 株の耐性株も、肺のみによる比較ではあるが、表 2 に示されたごとく、感受性原株に比して一般に増殖能は弱いことが認められた。

表 2 黒野 A~G 株のマウス肺内菌消長

菌 株	接種生菌数	肺 内 生 菌 数	
		4 週	6 週
A	8×10^6	1.4×10^5	2.6×10^5
B	1×10^7	1.4×10^6	3.7×10^5
C	5×10^6	2.3×10^6	5.6×10^6
D	7×10^6	1.4×10^5	5×10^5
E	7×10^6	1×10^5	6×10^6
F	1×10^7	1.2×10^5	3×10^5
G	8×10^6	6.2×10^4	2.6×10^5
黒野株	4×10^6	1.2×10^7	2×10^7

3) 流パラ死菌液の毒性 (マウス腹腔内接種) 成績は図 5~9 にマウス体重曲線 (死亡は黒丸) とし

図 5 対 照

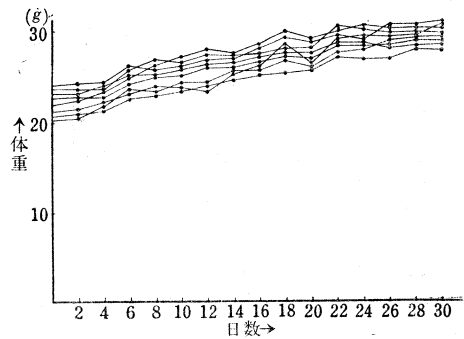


図 6 黒野株の毒性

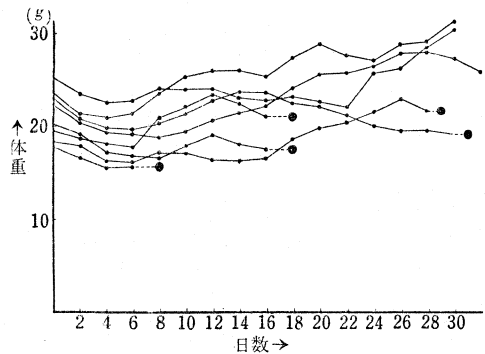
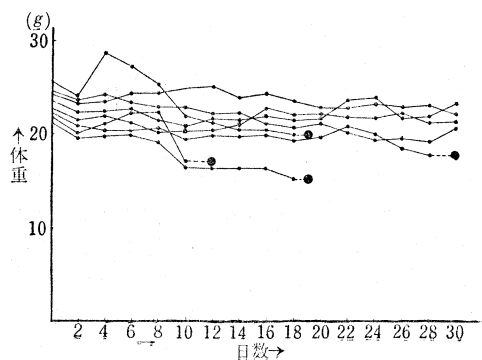


図 7 黒野 - 100 株の毒性



て示されている。すなわち黒野株および黒野-100株のマウスに対する毒性には著明な差が認められず、これは両菌株のウィルレンスに著明な差が認められた成績とは著しく趣を異にする(図6, 7)。

一方、水木株および水木-100株のマウスに対する毒性はいく分差が認められるようであるが、この差は両菌株のウィルレンス(マウスの斃死状況)の差と同程度のものであつた(図8, 9)。なお水木株および黒野株の原株同士を比べてみると、マウスに対するウィルレンスの差は著明でないにもかかわらず、両菌株流パラ死菌液のマウスに対する毒性にはかなり著明な差が認められ、水木株のほうが黒野株よりも強い毒性をもつように思われた。

図8 水木株の毒性

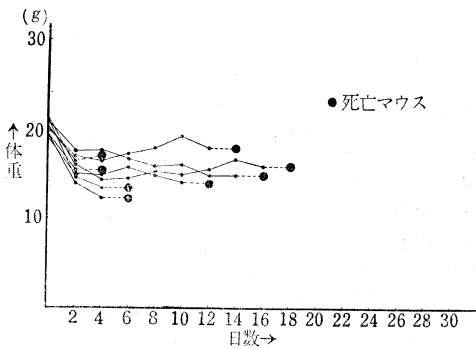
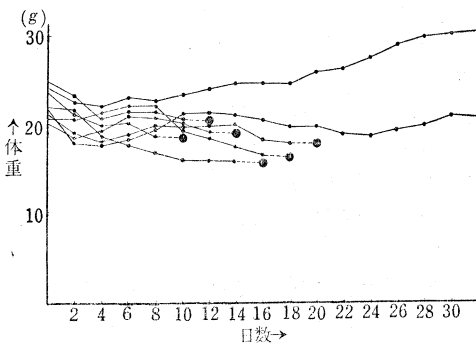


図9 水木-100株の毒性



考 案

INH 耐性結核菌のウィルレンスに関する研究は1953年ころよりモルモットを使つて始められ、Middlebrook, Cohn^{1)~3)}は、試験管内でINH 耐性にした人型菌および牛型菌は、そのウィルレンスが原株に比し、モルモットに対して減弱していることを報告し、ついでINH 治療患者より分離したINH 耐性株についても、モルモットに対するウィルレンスの減弱を認めた。その後Barry⁴⁾, Karlson⁵⁾, Conalty⁶⁾, Peizer⁷⁾, 佐藤⁸⁾, 高橋⁹⁾, 金井^{10)~12)}によつて試験管内耐性株や、患者から分離した耐性株について、モルモットに対するウ

ィルレンスの実験が多くなされたが、試験管内で得られた耐性株であると、患者分離の株であるとを問わず、また感染方法の如何にかかわらず、いずれもウィルレンスの減弱をみており、INH 耐性菌のモルモットに対するウィルレンスの減弱は一般に肯定された所見といふことができる。

しかしながら、マウスに対するINH 耐性菌のウィルレンスについては、その成績はさまざまである。Morse¹³⁾, Karlson¹⁴⁾, 三木¹⁵⁾等はマウスに対しウィルレンスを保持している成績を示しているが、大岩¹⁶⁾, Barnett¹⁷⁾等は弱毒化している成績を示している。またBloch¹⁸⁾はINH 治療を受けている患者から分離した耐性菌のマウスに対するウィルレンスをみたが、菌株によつてまちまちであり一定の傾向がみられなかつたという。Conalty⁶⁾も試験管内および患者分離株を用い、菌株により異なつたウィルレンスを報告している。

以上のごとく、INH 耐性菌のマウスに対するウィルレンスは種々報ぜられているが、一定の所見に達したとはいえない。私は今回、マウスに対しほとんど同程度の病原性を示す人型結核菌の黒野株、水木株を用い、両菌株のINH 高濃度耐性菌(100 γ /ml 完全耐性)をone-step で分離して、原株とINH 耐性株との間におけるウィルレンスの差を追求するとともに、黒野株と水木株とにおいて耐性化によるウィルレンスの減弱程度に差があるか否かを検討した。その結果、黒野株においては採取した8株の耐性株のすべてにおいて、INH 耐性化によりマウスに対してウィルレンスの減弱が著明に認められたのに反して、水木株では使用した2株の耐性株とも、その減弱程度がきわめて少なかつたといえる。

かくのごとく原株の間では、マウスに対し同程度のウィルレンスをもつにかかわらず、INH 耐性化するとウィルレンスの減弱程度に差が現われてきたということは、興味ある問題と思われる。すなわち黒野株および水木株のウィルレンス構成因子にもともと本質的な差異があり、それがINH 耐性化という歪みによつて表現されてきたとも考えられる。

この点を解析する1つの企てとして、各菌株の流パラ加熱死菌のマウスに対する毒性を検討した。その結果はINH 耐性化によるウィルレンス減弱の程度に差を示した黒野原株と水木原株との比較において、死菌体の毒性に差がみられたことは(ウィルレンス減弱の少なかつた水木株のほうが強毒)、その関連性の意義については不明であるが注目すべきことといえよう。一方INH 耐性株の死菌体の毒性和原株のそれを比較すると、黒野株においてはほとんど差が認められないが、水木株にては耐性株の死菌体毒性の減弱がある程度認められた。このことからINH 耐性株のウィルレンスの減弱は、死菌体毒性の減弱によつては全く説明しえないと考えられ

る。

INH 耐性菌の死菌体の毒性物質について、山村²¹⁾は INH 耐性人型結核菌 MD 株の精製ロウからマウスに対する毒性物質を分離、その収量は H₃₇Rv と差がなかつたと述べている。大岩¹⁶⁾は、H₃₇Rv とその INH 耐性株との流パラ死菌をマウスの腹腔内に注射し、体重と生死を観察し、耐性株においては感性原株に比し死菌体の毒性が低下していることをみた。さらに BCG, H₃₇Ra の流パラ死菌と同様の実験を行ない、これら弱毒ないし無毒株では H₃₇Rv とほぼ同程度の毒性を示したことから、この毒性の低下が INH 耐性菌のウィルレンスの減弱にある種の役割を果たしているのではないかと推論している。

このように結核菌のウィルレンスを解析するうえで、流パラ死菌の毒性をみた実験は少なしとしないが、その成績からウィルレンスの本質との関係を推論することは必ずしも容易ではない。たとえば上記大岩の成績からの推論は、私の本実験成績からは導かれえない等の事態が起こつてくる。この問題についてはなお将来の追求を必要としよう。

結 論

1) マウスに対してはほぼ同様に強毒である人型結核菌黒野株と水木株とを用い、その INH 耐性化に伴うマウスに対するウィルレンスの変化を比較したが、黒野株においては 8 株の耐性株ともウィルレンスの減弱を認め、水木株においては 2 株の耐性株において著明な変化を認めえなかつた。そのウィルレンスの差は、肺内菌消長においてもつともよく表現され、脾および肝の菌消長によつてはほとんど認められなかつた。

2) 各菌株の加熱死菌流パラ浮游液のマウスに対する毒性を検討したが、黒野株に比し水木株は毒性が大であることが認められた。

また原株と耐性株の比較では、黒野株とその耐性株の毒性には著明な差がみられず、水木株およびその耐性株の毒性は後者がやや弱く現われた。

3) 以上の所見から流パラ死菌の毒性が結核菌のウィルレンスに関してもつ意義が考察されたが、少なくとも INH 耐性化に伴うウィルレンスの減弱は、流パラ死菌の毒性の変化によるものではないことが推論された。

本稿の概要は第 14 回日本細菌学会関東支部総会²²⁾

において発表された。

文 献

- 1) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 2) Middlebrook, G. & Cohn, M. L. : Science, 118 : 297, 1953.
- 3) Cohn, M. L., Kovitz, C., Oda, V. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 4) Barry, V. C., Conalty, M. L. & Gattney, E. E. : Lancet, 264 : 978, 1953.
- 5) Karlson, A. G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 531, 1954.
- 6) Conalty, M. L. & Gattney, E. E. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 799, 1955.
- 7) Peizer, L. R., Minkin, A. & Widlock, D. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 728, 1954.
- 8) 佐藤直行 : 結核, 30 : 247, 昭30.
- 9) 高橋正雄 : 日本細菌学雑誌, 12 : 315, 昭32.
- 10) 金井興美 : 医学と生物学, 34 : 154, 昭30.
- 11) 金井興美 : 医学と生物学, 34 : 248, 昭30.
- 12) 金井興美 : 医学と生物学, 35 : 105, 昭30.
- 13) Morse, W. C., Weiser, O. L., Kubus, D. M., Fusilio, M., Dail, M. C. & Evans, J. R. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 464, 1954.
- 14) Karlson, A. G. & Ikemi, Y. : Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 29 : 119 1954.
- 15) 三木勝治・加藤允彦・松永清輝 : 結核, 33 : 568, 昭33.
- 16) 大岩弘治 : 日本細菌学雑誌, 12 : 291, 昭32.
- 17) Barnett, M., Bushby, S. R. M. & Mitchison, D. A. : Brit. J. Exper. Path., 34 : 568, 1953.
- 18) Bloch, H., Widlock, D. & Peizer, L. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 734, 1953.
- 19) Rich, A. R. : The Pathogenesis of Tuberculosis (II Edit), Charles Thomas Publisher, 1951.
- 20) 阿部逸夫 : 結核, 28 : 374, 昭28.
- 21) 山村雄一 : 「抗酸菌の変異と分類」研究班, 第2回研究協議会, 昭34.
- 22) 小沢敦・氏家淳雄・中山昇二・牛場大蔵 : 日本細菌学雑誌, 15 : 338, 昭35.