

INH 耐性結核菌の人体に対する毒力 (第3編)

村 田 彰

国立療養所東京病院

受付 昭和42年10月16日

VIRULENCE OF INH RESISTANT TUBERCLE BACILLI
TO HUMAN BODY*Report III. Biological Properties of INH
Resistant Tubercle Bacilli

Akira MURATA

(Received for publication October 16, 1967)

In the Part III, the problem of virulence of INH resistant bacilli is discussed biochemically according to the results of oxydation-reduction dye test, catalase-reaction and peroxydase-reaction.

For this purpose, 73 M. tuberculosis strains obtained from patient's sputa when their exacerbation were detected röntgenologically, were collected from all national sanatoria from May thru September, 1966. The investigation revealed that:

- 1) Dye-test failed to prove that the virulence was reduced because the strain was high INH resistant.
- 2) In catalase-and peroxydase-reaction, the number of negative cases was increased as the degree of INH resistance was raised.
- 3) INH resistance test on 73 strains obtained from patients with radiographic exacerbation revealed a resistance over 5 mcg in 8.2%. A high INH resistant strain does not necessarily imply a harmless strain.

In view of the above results, there is little doubt that some biological change must take place in INH resistant strains, but it was difficult to establish a relationship between their virulence, especially to human body, and resistance to INH.

第1編¹⁾においては、INH 耐性菌が高度耐性を獲得すると感染力が低下するように思われるが、その Background factor の分析が不十分なため結論を差控えた。第2編²⁾においては、INH 獲得耐性と Schub との関係を検討し、INH が高度耐性を獲得しても、かつして Schub はまれなものではないことを報告した。

しかしながら第1編でもふれたように、INH 高度耐性菌の動物に対する毒力に関しては、それほど変化はな

いとする報告も 2, 3 あるが³⁾⁻⁵⁾、概してある種の動物に毒力の減弱を認めるものが多い⁶⁾⁻⁸⁴⁾。

一方結核菌の毒力を生化学的に検討する研究も種々行なわれているが、その 2, 3 をあげてみると、Subbaiah³⁵⁾の H₂O₂ 感性テストを利用して Nair ら³⁶⁾は、結核菌の毒力と 0.02% の過酸化水素水に生き残る菌の割合に一定の関係があるといい、Hever および Meissner³⁷⁾は Nitrat 還元酵素の測定で牛型と人型菌が鑑別

* From Tokyo National Chest Hospital, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

Table 1. Results of Biochemical Reaction of TBC-Bacilli Found While on Radiographic Exacerbation (On present inpatients in All National Sanatoria) (From May 1966 thru September 1966)

Dye-reaction (51 cases)		Peroxydase-reaction (70 cases)			Catalase-reaction (70 cases)		
(+)	4(7.8%)	(+)	33	47.1%	卅	1(1.4%)	} 82.9%
(±)	5(9.8%)	(+ -)	1(1.4%)	} 20.0%	++	24(34.3%)	
(-)	32(62.7%)	(±)	2(2.9%)		+	33(47.1%)	
Unknown	10(19.6%)	(+ -)	11(15.7%)		-	12	
		(-)	23	32.9%			

(+): Decolourized cases

できることを利用してINH耐性菌と感性菌を比較検討し、両者の間に差がなかったと報告している。また Neutral-Rot 反応³⁸⁾により毒力の強弱を知る方法、室橋ら³⁹⁾の紫外線照射による抗酸性の消失と結核菌の毒力との関連性に関する報告などがある。さらに室橋ら⁴⁰⁾は INH 耐性菌にこの方法を応用し、耐性菌では常に弱毒株のパターンを示したという。

また Wilson ら⁴¹⁾は 1952 年、後述のごとき色素還元反応を考案し、Wrinkle および Patnode⁴²⁾⁴³⁾ がこれをさらに詳細に研究し、本反応とモルモットへの毒力ならびにコロニー性状とを 706 株の菌について比較検討した結果、97.7% の一致率をみたと報告している。

私は前報のとおり、INH 耐性菌について人体に対する毒力の差異を明らかにしえなかつたが、本編においては耐性菌を生化学的に検討し、INH 耐性菌と感性菌との間にはたして差異があるか否か、または生化学的な毒力の判定が臨床とどの程度の関連があるかを検討するため、全国国立療養所から Schub 時の結核菌を送付していただき、これについて Patnode らが報告した色素還元反応による毒力の検討を行なつた。同時に Catalase, Peroxydase 両反応をも実施し、これらの菌の耐性度と Schub との関係も追求した。

実験方法

全国国立療養所において昭和 41 年 5 月より 9 月まで、レ線上 Schub を認めた患者につき、その Schub 時の喀痰を当院宛郵送していただき、該菌について間接法により耐性検査を実施すると同時に、色素還元反応、Catalase 反応、Peroxydase 反応を実施した。

色素反応は Patnode ら⁴²⁾の方法に従い、色素は Phenol indophenol-Na のみを使用した。また Peroxydase, Catalase 反応は漆崎ら⁴⁴⁾の方法に従つた。

実験結果

[1] 全国国立療養所入所患者の

Schub 時の結核菌の生化学的反應成績 (表 1)

集まつた菌株は 73 株で、そのうち色素反応、Catalase 反応、Peroxydase 反応が実施できたものは、菌量や発育などの関係からそれぞれ 51 例、70 例、70 例であつた。

色素反応についてみると脱色されたもの、すなわち毒力が弱いと判定されたもの 7.8%、脱色されなかつたもの 62.7%、中間のもの 9.8%、菌発育悪く判定できないもの 19.6% となり、全例 Schub を起こした菌であるにもかかわらず、生化学的に毒力減弱と考えられたものが 7.8% あつたことになる。

次に Peroxydase 反応では、陽性 47.1%、陰性 32.9%、その中間が 20% となり、Catalase 反応では、陽性 82.9%、陰性 17.1% となつたが、これら諸反応と INH 耐性との関係は次のごとくであつた。

[2] Peroxydase 反応 (P-反応と略) と INH 耐性との関係 (表 2)

P-反応を実施できたものは 70 例で、そのうち耐性検査ができたもの 68 例あつた。その成績は表 2 にみるごとく、P-反応陽性のもの 0.1 mcg ≤ では 63.9%、1 mcg ≤ で 24%、5 mcg ≤ で 33.3%、10 mcg ≤ は 0 となり、高耐性になるに従つて陽性のものが少なくなつていくが、陰性のものは 0.1 mcg ≤ で 22.2%、1 mcg ≤ で 44%、5 mcg ≤ で 50%、10 mcg ≤ で 100% となり、高耐性になるに従つて P-反応陰性が多くなる。

すなわち P-反応と INH 耐性度との間に一定の関係があることは先人の報告したとおりであるが、毒力との

Table 2. Relation between Peroxydase-Reaction and Degree of INH Resistance (68 cases)

Degree of reaction	Drug resistance				
	<0.1 mcg	0.1 mcg ≤	1 mcg ≤	5 mcg ≤	10 mcg ≤
+		23(63.9)	6(24)	2(33.3)	0
+ -		0	1(4)	0	0
±		0	1(4)	1(16.7)	0
+ -		5(13.9)	6(24)	0	0
-		8(22.2)	11(44)	3(50.0)	1(100)
Total		36(100)	25(100)	6(100)	1(100)

(): %

関係については一定した見解がない。

[3] Catalase 反応 (C-反応と略) と INH 耐性との関係 (表3)

P-反応と同一症例 68 例に実施した成績は表3に示すごとくで、C-反応陽性のは INH 耐性 0.1 mcg ≤ で 94.4%, 1 mcg ≤ で 76%, 5 mcg ≤ で 50%, 10 mcg ≤ は 0 となり、C-反応陰性は、0.1 mcg ≤ は 5.6%, 1 mcg ≤ は 24%, 5 mcg ≤ は 50%, 10 mcg ≤ で 100% となつた。すなわち INH 耐性の上昇とともに陰性率が高くなる。

[4] 色素還元反応と INH 耐性との関係 (表4)

本実験は菌量の関係で実施できたもの 51 例で、そのうち菌量の関係で成績判定不確実と思われるもの 10 例すなわち 24.4% あり、結局 44 例についての成績で、表4にみられるような結果となつた。これで見ると還元脱色の起こつたもの、すなわち毒力が弱いと判定されたものが、INH 耐性 0.1 mcg ≤ に 11.5%, 1 mcg ≤ で 9.1%, 5 mcg ≤ は 0 であつた。なお 10 mcg ≤ 耐性菌が 1 例あつたが、残念ながら菌発育不良で実験できなかった。これに反し還元されなかつたもの、すなわち毒力ありと判定されたものは 0.1 mcg ≤ で 77%, 1 mcg ≤ で 72.7%, 5 mcg ≤ で 100% となつた。これらはすべて Schub を起こした菌であるが、その中にも本反応による毒力の強弱が認められ、かつ高度耐性なるがゆえに毒力が弱くなつていくという結果はみられなかつた。また 0.1 mcg ≤ の低耐性の中に逆に毒力減弱のものがみられる結果となつた。

[5] Schub 時の結核菌についての耐性検査成績 (全国国立療養所, 昭和 41 年 5 月~9 月まで) (表5)

当院へ送付されてきた Schub 時の結核菌 (略痰中) についての耐性検査成績は表5のごとくで、SM についてみると ≤ 5 mcg, 5 mcg <, 10 mcg ≤, 100 mcg ≤ でそれぞれ 16.4%, 37%, 32.9%, 12.3% となり、PAS では < 1 mcg, 1 mcg ≤, 10 mcg ≤ でそれぞれ 41.1%, 54.8%, 2.7% となつたが、INH では < 0.1 mcg, 0.1 mcg ≤, 1 mcg ≤, 5 mcg ≤, 10 mcg ≤ でそれぞれ 1.4%, 53.4%, 37%, 6.8%, 1.4% となつ

Table 3. Relation between Catalase-Reaction and Degree of INH Resistance (68 cases)

Drug resistance Degree of reaction	<0.1 mcg	0.1 mcg ≤	1 mcg ≤	5 mcg ≤	10 mcg ≤
+++		1 (2.7)	0	0	0
++		15 (41.7)	4 (16.0)	0	0
+		18 (50.0)	15 (60.0)	3 (50.0)	0
-		2 (5.6)	6 (24.0)	3 (50.0)	1 (100)
Total		36 (100)	25 (100)	6 (100)	1 (100)

(): %

た。しかし Background にかなる耐性度の患者が何人いるか不明のため、Schub 率を知ることはできないが、73 例の Schub 例中、INH 5 mcg 耐性以上が 8.2% もあることをみれば、INH 高耐性といえども安心できないと思われる。

考案ならびに総括

1952 年 Patnode ら⁴²⁾は人型結核菌と非病原性 Mycobacteria の鑑別に彼らの考案した色素還元反応を実施して表6にみるごとく、培地上的の性質が人型結核菌であつ

Table 5. Results of Sensitivity Test to Bacilli Found at the Time of Radiographic Exacerbation (In all National Sanatoria, May~September 1966)

SM (73 cases)

Drug resistance	≤ 5 mcg	5 mcg < 10 mcg	10 mcg ≤	100 mcg ≤	Unknown
Cases	12	27	24	9	1
%	16.4	37.0	32.9	12.3	1.4

PAS (73 cases)

Drug resistance	< 1 mcg	1 mcg ≤	10 mcg ≤	Unknown
Cases	30	40	2	1
%	41.1	54.8	2.7	1.4

INH (73 cases)

Drug resistance	< 0.1 mcg	0.1 mcg ≤	1 mcg ≤	5 mcg ≤	10 mcg ≤
Cases	1	39	27	5	1
%	1.4	53.4	37.0	6.8	1.4

Table 4. Relation between Oxydation-Reduction Dye Test and Degree of INH Resistance (51 cases)

Drug resistance Dye-test	< 0.1 mcg	0.1 mcg ≤	1 mcg ≤	5 mcg ≤	10 mcg ≤	Undetermined due to too small number of colony
+		3 (11.5)	1 (9.1)	0		
±		3 (11.5)	2 (18.2)	0		
-		20 (77.0)	8 (72.7)	4 (100)		
Total		26 (100)	11 (100)	4 (100)		10 (24.4)

+ : Reduced decolourized cases - : No reduction cases (): %

Table 6. Results of Oxidation-Reduction Dye-Test By 327 Wild-Strains of Mycobacteria (n/Patnode)

Dye-test	Colony characteristics	No. of strains
No reduction	M. tuberculosis (hominis)	322
Reduction	Acid-fast saprophyte	5

	E ₀ (volt)
Phenol indophenol	-0.227(pH 7)
Sodium benzenone indophenol	-0.228(pH 7)
Sodium benzenone indo-3'-chlorophenol	-0.225(pH 7)
Sodium 2,6-dibromobenzenone indophenol	-0.221(pH 6.39)

た 322 例 (日常の病理材料から分離) すべてが反応陰性で、非病原性のものは 5 例とも陽性であったので、両者の判別ができると考え、さらにモルモットに対する毒力と色素還元反応との比較実験を試みた。その成績は表 7 のごとくで、本反応陰性のものすなわち病原性ありと判定されたもののうち、モルモットに毒力がなかつたものは、結核菌 301 株中 1 株と、BCG 1 例、非病原性 Mycobacteria 3 株の計 5 例のみであった。また本反応陽性すなわち毒力なしと判定したもので、モルモットに毒力があつたものが非病原性 Mycob. 128 株中 8 株にみられた。すなわち彼らが実施した全例 757 株中本反応の適中率は 97.7% であつたという。この反応を実施するにあつて、彼らは 4 つの指示薬、phenol indophenol, sodium benzenone indophenol, sodium benzenone indo-3'-chlorophenol, sodium 2,6-dibromobenzenone indophenol の 4 種を用いている。しかし私が予備実験に用いた M. phlei, Smegma, H₃₇Rv に対し、phenol indophenol-Na 以外はその変色が不明確なため、本実験を Schub 時の結核菌に応用するにあつて、主に phenol indophenol-Na のみを使用した。なお Patnode らの実験が結核菌と非病原性抗酸菌の判別を目的としているのに対し、私の実験では、INH 高耐性菌の病原性が落ちるとすれば、本反応であるいは陽性となるものがあるかもしれないと思つたからである。

ところが本反応の実施成績をみると、前掲 (表 4) のように、低耐性であつても脱色の起こるものがあるにかかわらず、高耐性ではむしろ脱色するものがなかつた。このことは本反応を信ずるとすれば、(人型結核菌の耐性菌は非病原性抗酸菌と態度を異にするためか) INH に高度耐性になるにつれて毒力が低下するとは必ずしもいえない結果

となつた。

以上の成績は、前編²⁾の臨床調査成績において述べたように、人体における Schub ないしは悪化が、低耐性でも高耐性でも同じように起こつていて、耐性と毒力とは別の問題のように思われたことと共通点があるように思われる。

次に Catalase-, Peroxydase-反応については過去の報告^{7)18)20)21)45)~54)}のように、私の実験でも INH 高耐性になるにつれて陰性が増加し、INH 耐性ととの間に一定の関係があるように思われた。

しかし INH 耐性と P-反応, C-反応および毒力の関係になると問題は複雑で、現在までのところ動物実験でみると、Coulding⁹⁾, Karlson⁴⁾, Barnett ら⁵⁾は感性菌と INH 耐性菌で大差はないと報告したが、その後平野⁶⁾, Middlebrook⁷⁾, Steenken⁸⁾, 北本ら¹⁰⁾は毒力の低下ありと報告し、また Cohn¹⁶⁾は Cat-反応陰性の耐性菌はモルモットおよび家兎に毒力が減弱しているといい、Middlebrook ら¹⁷⁾は耐性菌でも Catalase-活性が低下しないと毒力が弱くならぬが、そのさい INH を大量に投与すると C-反応陽性の耐性菌出現を防ぐという。また Wolinsky¹⁸⁾も INH 高耐性でかつ C-反応陰性のものは弱毒だとしている。

その他モルモットに対し毒力低下ありと報告せるもの^{9)11)12)20)~29)}、モルモットに低下がみられてもマウスに毒力が保持されているとするもの^{30)~32)}、両者に毒力が減弱していると考えるもの¹³⁾¹⁴⁾³³⁾³⁴⁾、またマウスに対し一定の傾向がみられず毒力は菌株の差であろうとするもの²³⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾などあつて、INH 耐性と毒力の関係にはなお不明の点が多いように思われる。

一方また Heilmeyer¹⁹⁾はモルモットに対し毒力が低下していても、マウス、ハムスターには同様にいかぬし、かつ人体に対しては一定の関係がないといい、大藤ら⁵⁷⁾の報告でも、INH 耐性菌の Catalase 活性と毒力とは別

Table 7. Results of Guinea Pig Inoculation and of Tests for Decolorization of Dyes by Wild Strains of Mycobacteria (n/Patnode)

Dye-reaction	Virulence for guinea pigs	Colony characteristics	Number
No reduction (-)	Progressive tuberculosis	M. tuberculosis (hominis)	299
	Regional lymph nodes only	"	1
	Negative	"	1
	"	" (BCG)	1
Slight reduction (±)	"	"	1
	Progressive tuberculosis	"	1
Reduction (+)	"	"	1
	Regional lymph nodes only	"	7
	Negative	"	120
Total			435

々の因子に支配されているかもしれないといい、また下出²⁸⁾も P-反応陰性例で菌陰性化したものは菌再陽性化が多い傾向にあつて、P-反応、C-反応陰性菌の弱毒化を臨床的観察から断定することは慎重を要すると述べているなど、人に対する毒力は INH の耐性度のみで律することはできないように思われる。

いずれにしても、以上の報告をもとに私の実験成績を総括するに、INH 耐性菌は生物学的にはなんらかの変化を起こしていることは間違いないと思われるが、毒力とくに人体に対する毒力と耐性との関係については一定の関係を見出すことができなかつた。

すなわち耐性と毒力は別々の因子に支配され、INH 耐性菌の人体に対する毒力は、菌株の差異そのものが重要な因子であるのかもしれない。

〔本論文要旨は第 42 回日本結核病学会総会（昭和 42 年 4 月）のシンポジウムにおいて報告したものの一部である。〕

欄筆するにあたりご指導ご校閲をいただいた砂原院長に謝意を表するとともに、特別のご援助をいただいた下記国立療養所の関係各位に深甚の謝意を表します。

青野療養所、石川療養所、天竜荘、北潟臨湖園、京都療養所、銀水園、千葉東病院、菊地病院、高山荘、長野療養所、旭川療養所、中部病院、栃木療養所、阿久根療養所、浩風園、犀潟療養所、松戸療養所、臨浦園、光の園、高松療養所、北海道第二療養所、長崎療養所、松嶺荘、大阪福泉療養所、鳥取病院、岩手療養所、庄内療養所、村松晴嵐荘、貝塚千石荘、内野療養所、長良荘、高知療養所、愛媛療養所（順序不同）

主要文献

- 1) 村田彰：結核，42：343，昭 42.
- 2) 村田彰：結核，43：61，昭 43.
- 3) Coulding, R. et al.: Lancet, 2: 69, 1952.
- 4) Karlson, A. G. et al.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 27: 373, 1953.
- 5) Barnett, M. et al.: Lancet, 264: 314, 1953.
- 6) 平野憲正 東京医事新誌, 70 (7) 昭 27.
- 7) Middlebrook, G. & Cohn, M. L.: Science, 118: 297, 1953.
- 8) Steenken, W., Jr. & Wolinsky, E.: Am. Rev. Tuberc., 68: 548, 1953.
- 9) 福永慶子：結核，29(特別号)・47，昭 29.
- 10) 北本治：日本臨床，14：619，昭 31.
- 11) 沼田尹典：結核，36：389，昭 36.
- 12) 大藤真：中谷照・相谷勝一：結核，36：384，昭 36.
- 13) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和：結核，40：359，昭 40.
- 14) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和他：結核，40：427，昭 40.
- 15) 岩崎竜郎・室橋豊穂・染谷四郎他：結核，41：47，昭 41.
- 16) Cohn, M. L. et al.: Am. Rev. Tuberc., 70: 641, 1954.
- 17) Middlebrook, G. & Dressler, S. H.: ibid, 70: 1102, 1954.
- 18) Wolinsky, E. et al.: ibid, 73: 768, 1956.
- 19) Heilmeyer, L. & Walter, A. M.: Dtsch. Med. Wschr. 82 941, 1957.
- 20) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc., 69: 471, 1954.
- 21) Barry, V. C., Conalty, M. L. & Gattney, E. E.: Lancet, 264: 978, 1953.
- 22) Karlson, A. G.: Am. Rev. Tbc., 70: 531, 1954.
- 23) Conalty, M. L. & Gattney, E. E.: Am. Rev. Tbc., 71: 799, 1955.
- 24) Peizer, L. R., Minkin, A. & Widelock, D.: Am. Rev. Tbc., 70: 728, 1954.
- 25) 佐藤直行：結核，30：247，昭 30.
- 26) 高橋正雄：日本細菌学雑誌，12：315，昭 32.
- 27) 金井興美：医学と生物学，34 154，昭 30.
- 28) 金井興美：医学と生物学，34：248，昭 30.
- 29) 金井興美：医学と生物学，35：105，昭 30.
- 30) Morse, W. C., Weiser, O. L., Kubus, D. M., Fusilio, M., Dail, M. C. & Evans, J. R.: Am. Rev. Tbc., 69: 464, 1954.
- 31) Karlson, A. G. & Ikemi, Y.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 29: 119, 1954.
- 32) 三木勝治・加藤允彦・松永清輝：結核，33：568，昭 33.
- 33) 大岩弘治：日本細菌学雑誌，12 291，昭 32.
- 34) Barnett, M., Bushby, S. R. M. & Mitchison, D. A.: Brit. J. Exper. Path., 34: 568, 1953.
- 35) Subbaiah: Tubercle, 45: 345, 1964.
- 36) Nair, C. N., Mackay S. et al.: Tubercle, 45: 345, 1964.
- 37) Hever, Ö., Meissner, G.: Beitr. Klin. Tuberc., 127: 366, 1963.
- 38) Mahapatra, B.: Ind. J. Tuberc., 11: 172, 1964.
- 39) 室橋豊穂他：日本細菌学雑誌，20：233，昭 40.
- 40) 室橋・吉田・加藤：日本細菌学雑誌，21：164，昭 41.
- 41) Wilson, F. J., Kalish, C. & Fish, C. H.: Am. Rev. Tuberc., 65: 187, 1952.
- 42) Wrinkle, C. K., Patnode, R. A.: Am. Rev. Tbc., 66: 99, 1952.
- 43) Patnode, R. A., Wrinkle, C. K. & Beasley, C.: Am. Rev. Tbc., 69: 599, 1954.
- 44) 漆崎・小川 結核研究の進歩，24：201，昭 34.
- 45) Knox, R., Meadow, P. M. & Worssam, A. R. H.: Am. Rev. Tbc., 73: 726, 1956.
- 46) 徳久：呼吸器診療，12：313，昭 32.
- 47) 庄司・小酒井・平沢：日本臨床結核，16：567，昭 32.
- 48) Tirunaryanan, M. O. & Vischer, W. A.: Am. Rev. Tbc., 75: 62, 1957.
- 49) Hedgecock, L. W. & Fauscher, I. O.: Am. Rev. Tbc., 75: 670, 1957.
- 50) 武田：結核菌の耐性研究班，第 2 回研究協議会，1957 (文献 44 による)。
- 51) 工藤：結核，32：551，昭 32.
- 52) 堀：第 33 回日本結核病学会演説，1958.
- 53) 漆崎・小川：日本臨床結核，17：851，昭 33.

- 54) 長岡他：臨床と研究, 36 : 102, 昭 36.
55) Bloch, H., Widelock, D. & Peizer, L.: Am. Rev. Tbc., 68 : 734, 1953.
56) 中山昇二：結核, 36 : 366, 昭 36.
57) 大藤・中谷・相谷：結核, 36 : 383, 昭 36.
58) 下出・浦野・柳橋：日本胸部臨床, 24 : 45, 昭 40.