

結核菌の Thiacetazone 耐性に関する研究

第2編 未治療小児結核患者より分離した結核菌のモルモット
に対する毒力と Thiacetazone 感受性

大 里 敏 雄

結核予防会結核研究所附属療養所

塚 越 兼 吉・清 水 久 子

結核予防会結核研究所

受付 昭和 45 年 10 月 23 日

STUDIES ON THIACETAZONE RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI*

Part II. The Relation between Virulence in Guinea-pigs and
Thiacetazone Sensitivity of Tubercle Bacilli Isolated from
Previously Untreated Tuberculous Children

Toshio OHSATO, Kenkichi TSUKAGOSHI and Hisako SHIMIZU

(Received for publication October 23, 1970)

Many workers reported that the virulence in the guinea-pigs of tubercle bacilli isolated from previously untreated tuberculous patients differs markedly in various countries. Some workers showed that South Indian strains demonstrated the low virulence in the guinea-pigs and the low virulence was related to thiacetazone resistance. The other reports showed the high virulence in the guinea-pigs and the low resistance for thiacetazone of East African strains. The high virulence and the high thiacetazone resistance of Hong Kong strains were also reported.

In part I, the authors reported the thiacetazone sensitivity of 40 strains isolated from previously untreated tuberculous children in Japan. This paper presents the virulence in the guinea-pigs and the thiacetazone sensitivity of 30 strains out of 40 strains used for the experiment in part I.

Six guinea-pigs were inoculated 0.1 mg each subcutaneously and autopsied at six weeks after the infection. The method for the preparation of bacillary suspension was described in part I.

The virulence in the guinea-pigs of the test strains was interpreted by Macroscopic Index, Root Spleen Index and the number of viable bacilli in the spleen. The maximum macroscopic index of tuberculous lesion was 4+ in the lymph nodes and 5+ in the viscera (lung, liver and spleen). Root spleen index was calculated as follows: $\sqrt{\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}}} \times 100$. For getting the viable number of tubercle bacilli in the spleen, approximately 300 mg of spleen was removed into the glass homogenizer and 1% sodium hydroxide was added to the homogenates to make 10 mg/ml suspension. The suspension was inoculated 0.1 ml each

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

on the two sloupes of 1% Ogawa's medium and 10 folds diluted suspension was also inoculated on the two sloupes of 1% Ogawa's medium. The reading of bacillary growth was performed at 4 weeks after the inoculation.

The Table and Figures shows the results of macroscopic index, root spleen index and the number of viable bacilli in the spleen in each thiacetazone MIC group. The virulence to guinea-pigs differs markedly by the strains. The strains showed 0.5 mcg/ml or less thiacetazone MIC demonstrated 6.75 to 12.25 median value of macroscopic index, 0.4585 to 0.7621 of root spleen index and 130 to 1,630 of number of viable bacilli in the spleen. The strains showed 2 mcg/ml or more thiacetazone MIC demonstrated 6.6 to 14.75, 0.4296 to 0.5989 and 80.5 to 553, respectively. But as seen in the table and the figures, the relationship between the virulence in the guinea-pigs and thiacetazone sensitivity was not close.

Conclusively, the thiacetazone resistance of Japanese strains is moderate and the virulence in the guinea-pigs is not related to the thiacetazone sensitivity.

緒 言

南インドの未治療結核患者から分離された結核菌は、英国人の未治療患者から分離した結核菌に比べて動物に対する毒力が著しく弱いことが報告され¹⁾²⁾て以来、新しく分離した結核菌の毒力が検討され、わが国においては昭和38年および昭和39年の結核実態調査で分離された結核菌の Maus およびモルモットに対する毒力が岩崎ら³⁾⁴⁾によつて報告されている。その結果、患者から分離された結核菌の毒力は決して一様ではないが、わが国の菌株ではインド株ほど毒力の弱いものは認められなかつたという。

その後結核菌の毒力は H_2O_2 感受性、PAS 感受性などとの関連のほか、Thiacetazone (Tb1) 感受性との関連において研究が進められたが、Mitchison ら⁵⁾⁶⁾、Joseph ら⁷⁾、Lefford ら⁸⁾によれば、インド株は Tb1 耐性とモルモットに対する毒力は関連があり、Tb1 耐性の高い株は毒力が弱いという。しかし香港株は Tb1 耐性が高いものが多いが、Tb1 耐性と毒力の間には関連が認められていない。

われわれは第1編において未治療小児結核患者から分離した結核菌の Tb1 感受性は菌株によつて著しい差がみられるが、Mean MIC は英国・東アフリカ株と南インド・香港株の中間の 0.966 を示したことを報告した⁹⁾。

今回は Tb1 の感受性の測定に用いた菌株 40 株のうち 30 株を用いてモルモットに対する毒力を調べ、わが国における未治療菌株の毒力と Tb1 感受性の関連について検討した結果を報告する。

研究 方法

使用菌株：未治療小児結核患者から分離し、第1編の実験に用いた菌株のうち No. 1 から No. 30 までの 30

菌株。

菌液の作製：第1編で述べたのと同様に凍結乾燥して保存した 5 mg/Amp. の菌株を 5 ml の滅菌蒸留水に懸濁しこの 0.2 ml を Dubos Tween Albumin 培地に接種し、10~14 日後に 0.18~0.2 の Density を示したものを 4 mg/ml の菌液と推定し、4 倍に希釈して 1 mg/ml の菌液とし、さらにこれを 5 倍に希釈した 0.2 mg/ml の菌液を動物実験に用いたが、1 mg/ml の菌液から 10^{-8} mg および 10^{-9} mg を Tb1 含有 1% 小川培地に接種して同時に Tb1 感受性の測定を行なつた。

モルモットに対する接種：上記 0.2 mg/ml の菌液 0.5 ml (0.1 mg) をモルモットの右側下腹部皮下に注射した。1 菌株につき 6 匹のモルモットを用いた。使用モルモットは体重 450 g 前後の♂である。

モルモットの剖検：感染 6 週後に剖検した。剖検前に頸動脈を切断し十分に放血し、内臓重量の測定の誤差を少なくするようにした。

毒力の測定：剖検時の局所および体内のリンパ節と肺、肝、脾の肉眼所見は工藤ら¹⁰⁾の判定法に従い、リンパ節病変は 4 段階に、内臓病変は 5 段階に分けた。また脾重量を測定し、青木¹¹⁾の方法によつて Root Spleen Index を算出すると同時に、脾の一部(300 mg 前後)をとりガラスホモディナイザーで均等化し、1% NaOH で処理した後、その 0.1 ml ずつを 2 本の 1% 小川培地に接種し (10^{-2} mg 接種)、さらに 10 倍に希釈した Homogenates の 0.1 ml ずつを 2 本の 1% 小川培地に接種し (10^{-9} mg 接種)、4 週後の発育菌数から脾臓 10 mg 当りの生菌数を算出した。

なお同時に実施した Tb1 感受性の測定方法は第1編で述べた通りであるが、本編の Tb1 の MIC は 10^{-3} mg 接種、4 週判定の MIC によつて分類した。

研究成績

未治療小児結核患者から分離した 30 株の菌株のモルモットに対する毒力は表に一括して示したごとくである。表は同じ Tb1 の MIC を示した菌株群を肉眼病変の中央値 (Median) の順に配列したが、肉眼病変の中央値は 3.75 から 18 の間に分布し、Root Spleen Index の中央値は 0.3829 から 0.9226 の間に分布し、また脾臓内生菌数の中央値は 0 から 3,000 と広い分布を示し

た。このようにモルモットに対する毒力は菌株によって著しく異なるが、同一菌株においては肉眼病変、Root Spleen Index、脾臓内生菌数は密接に関連している。

これら3つの毒力判定法によるモルモットに対する毒力と Tb1 感受性 10^{-8} mg 接種、4週判定 MIC の関連を図示すると図 a), b), c) のごとくであるが、0.5mcg/ml およびそれ以下の Tb1 の MIC を示した 8 株と、2 mcg/ml およびそれ以上の MIC を示した 7 株の毒力はいずれの判定法でも認められなかつた。

Table. Virulence in Guinea-pigs and Thiacetazone Sensitivity of 30 Japanese Strains Isolated from Previously Untreated Tuberculous Children

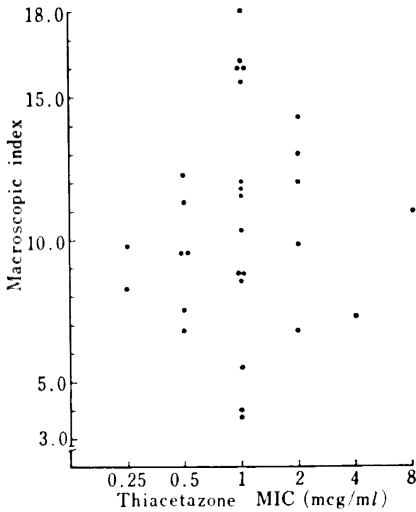
Thiaceta- zone MIC	Strain No.	Macroscopic index				Root spleen index				No. of viable bacilli in spleen/10mg			
		Minimum	Maximum	Me- dian	Mean	Minimum	Maximum	Me- dian	Mean	Minimum	Maximum	Me- dian	Mean
0.25 mcg/ml	3	4.5	19	8.25	10.6	0.3866	0.8548	0.4825	0.5457	15	715	130	213.5
	17	9	12.5	9.75	10.16	0.5017	0.6119	0.5557	0.5538	26	630	145	210
0.5 mcg/ml	4	5	15	6.75	7.9	0.3758	0.6496	0.512	0.5747	7	820	158	233.7
	5	5.5	15.5	7.5	9.08	0.3616	0.9132	0.4585	0.5817	20	1,170	110	343.6
	13	4.5	11	9.5	8.7	0.4022	0.5054	0.4627	0.4549	12.5	575	106	199
	18	8	11.5	9.5	9.5	0.4968	0.7694	0.5345	0.5621	125	1,205	370	489
	16	9.5	17.5	11.25	12.1	0.4333	1.0997	0.5623	0.6633	50	4,000	935	1,307
	28	10	15.5	12.25	12.8	0.6423	0.8351	0.7621	0.7446	1,110	1,800	1,630	1,570
	19	2	5	3.75	3.58	0.3597	0.5	0.3954	0.4064	0	0	0	0
	1	2	11	4	5.2	0.4211	0.8551	0.4258	0.542	25	2,330	113	502.4
1 mcg/ml	5	3.5	6	5.5	5.1	0.3682	0.4315	0.3529	0.39	2	118.5	14.8	32.1
	20	6	12	8.75	8.4	0.4234	0.7895	0.5303	0.5679	22.5	1,180	618	617
	22	7	14.5	8.75	9.5	0.5209	0.8767	0.6139	0.6414	270	1,390	658	720
	15	7.5	15.5	8.5	9.83	0.4081	1.1588	0.5534	0.6434	360	2,100	588	932
	30	7	12.5	10.25	9.91	0.4941	0.8090	0.5893	0.6002	785	2,500	1,025	1,421
	11	7.5	14.5	11.5	11.6	0.4171	0.5927	0.5358	0.5623	36.5	955	420	411.8
	7	9.5	18	12	12.6	0.3281	0.8160	0.5439	0.5788	28.5	990	345	373.9
	27	8	14	11.75	11.7	0.4743	1.189	0.5493	0.7081	295	5,000	830	1,753
	23	11.5	20.5	15.5	15.5	0.6939	1.2407	0.9226	0.9378	700	4,000	2,195	2,295
	24	15	16.5	16	15.8	0.5960	0.8587	0.7552	0.7390	960	1,850	1,250	1,400
	29	12	21	16	16.1	0.555	1.0774	0.8750	0.9074	460	5,000	3,000	2,586
	25	13.5	20	16.25	16.5	0.5650	1.2407	0.8843	0.9181	970	6,000	2,100	3,062
	26	13.5	21	18	17.7	0.6577	1.2349	0.8498	0.8894	900	6,000	1,700	3,040
	2 mcg/ml	2	4.5	8.5	6.75	6.6	0.4307	1.048	0.5477	0.609	19.5	1,910	50.5
10		7	12	9.75	9.83	0.4262	0.6542	0.5989	0.5685	248	1,520	455	598
21		8	16.5	12	11.9	0.4960	1.0557	0.5906	0.6489	165	1,240	553	596
12		9	20	13	14.1	0.4124	0.6807	0.4632	0.5136	38.5	1,065	95	281
4 mcg/ml	14	11.5	21	14.25	14.75	0.4873	0.8160	0.5848	0.6159	14	1,785	428	480
	9	5	16.5	7.25	8.66	0.3937	0.9012	0.4296	0.5147	9.5	965	154	279.3
8 mcg/ml	6	8	13.5	11	10.8	0.4688	0.9140	0.5920	0.6327	33.5	1,375	112	308

Notes: Thiacetazone MIC was interpreted by the result of 4 weeks' reading on 10^{-8} mg inoculation.
6 Guinea-pigs were used for each strain and autopsied at 6 weeks after infection.
The results were arranged in the order of macroscopic index in each MIC group.

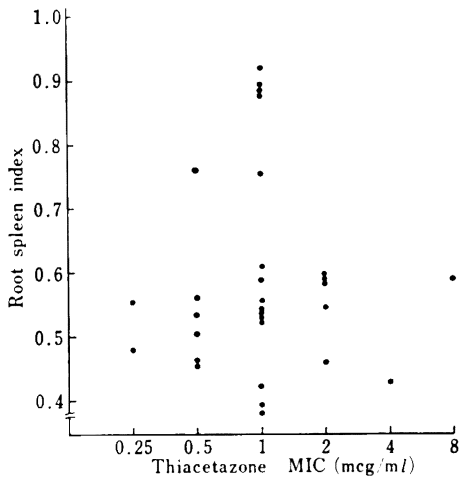
Root spleen index was calculated as follows: $\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100$.

Fig. Virulence in Guinea-pigs and Thiactetazone Sensitivity of 30 Japanese Strains

a) Macroscopic index (Median value)



b) Root spleen index (Median value)

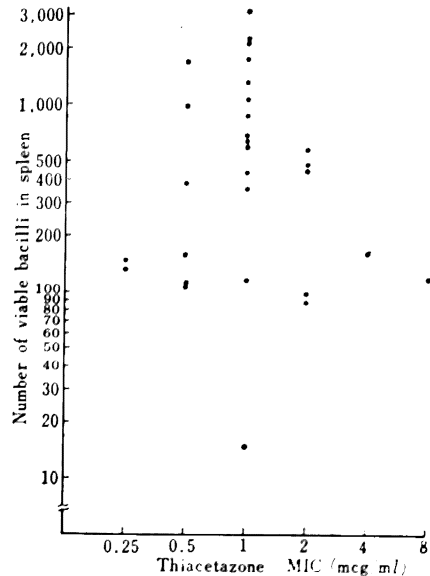


考 案

Mitchison ら⁵⁾⁶⁾, Joseph ら⁷⁾, Lefford ら⁸⁾はインド株においては Tb1 耐性とモルモットに対する毒力は相関があり, Tb1 耐性株はモルモットに対する毒力の弱いことを報告している。

著者ら⁹⁾はわが国の未治療株の Tb1 感受性は一様でなく, 菌株によって著しく差があるがインド株より Tb1 耐性の低いことを報告したが, 今回はこれらの菌株のモルモットに対する毒力が Tb1 感受性と関連があるかどうかを検討した。モルモットに対する毒力は Mitchison ら¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾の Root Index of Virulence と異なり, 工藤ら¹⁰⁾の方法による肉眼病変の判定法と青木¹¹⁾の提唱する Root Spleen Index のほかに, 脾臓内の生菌数によって判定したが, いずれの判定法を用いても Tb1 感受性と

c) Number of viable bacilli in spleen (Median value)



Note: No viable bacilli was isolated from the spleen of guinea-pigs inoculated No.19 strain (1mcg/ml Thiactetazone MIC)

毒力の間に関連は認められなかつた。毒力の判定法としては Root Spleen Index が実際的で個体差の少ない方法であり, Mitchison ら⁵⁾⁶⁾の Root Index of Virulence とよく相関すること¹¹⁾から考え, わが国の未治療株はインド株と異なりモルモットに対する毒力と Tb1 感受性の間に関連はないと考えてよいであろう。香港株の Tb1 の MIC はわれわれの成績より高いが, Tb1 感受性と毒力の間に関連はなかつたと報告されているが⁵⁾, これはわが国の菌株と同様の傾向と考えられる。

結 論

未治療小児結核患者より分離し凍結乾燥して保存した結核菌 30 株を用い, その Dubos 培養菌 0.1 mg ずつを 6 匹のモルモットの皮下に接種し, 6 週後に剖検して肉眼病変, Root Spleen Index, 脾臓内生菌数によって菌株の毒力を判定し, 同時に実施した菌株の Tb1 感受性(第1編報告)との関連を検討した。その結果, いずれの判定法によつても毒力と Tb1 感受性の間に特別な関連は認められなかつた。

本研究の要旨は第 24 回実験結核研究会総会および第 45 回日本結核病学会総会において大里が報告した。

文 献

- 1) Mitchison, D. A., Wallace, J. G., Bhatia, A. L., Selkon, B., Bubbaiah, T. V. and Lancaster, M. G.: Tubercle, 41: 1, 1960.
- 2) Mitchison, D. A., Bhatia, A. L., Radhakrishna,

- S., Selkon, J. B., Bubbaiah, T. V. and Wallace, J. G.: Bull. Wld Hlth Org., 25: 285, 1961.
- 3) 岩崎龍郎・統木正大・青木正和・工藤賢治・室崎豊穂・佐藤直行・染谷四郎: 結核, 40: 359, 昭40.
 - 4) 同上: 結核, 40: 427, 昭40.
 - 5) Mitchison, D. A. and Lloyd, J.: Tubercle, 45: 360, 1964.
 - 6) Mitchison, D. A.: Tubercle, 49, Suppl.: 38, 1968.
 - 7) Joseph, S., Mitchison, D. A., Ramachandran, K., Selkon, J. B. and Subbaiah, T. V.: Tubercle, 45: 354, 1964.
 - 8) Lefford, M. J., Dickinson, J. M. and Mitchison, D. A.: Tubercle, 50: 1, 1969.
 - 9) 大里敏雄・塚越兼吉・清水久子: 結核, 46: 65, 昭46.
 - 10) 工藤賢治・統木正大: 結核, 41: 355, 昭41.
 - 11) 青木正和: 結核, 42: 301, 昭42.