

Rifampicin 耐性結核菌の毒力に関する実験的研究(予報)

大 里 敏 雄

結核予防会結核研究所附属療養所

清 水 久 子

結核予防会結核研究所

受付 昭和 47 年 2 月 25 日

VIRULENCE OF RIFAMPICIN-RESISTANT TUBERCLE BACILLI
FOR EXPERIMENTAL ANIMALS (PRELIMINARY REPORT)*

Toshio OHSATO and Hisako SHIMIZU

(Received for publication February 25, 1972)

The virulence of rifampicin-resistant tubercle bacilli for guinea pig and mouse was reported.

The rifampicin-resistant strain was prepared by repeated cultivation of Kurono strain (freeze-dried and stored tubercle bacilli) on Dubos Tween Albumin media containing increasing concentration of rifampicin.

For the evaluation of virulence in guinea pig, index of macroscopic findings, root spleen index and number of viable bacilli in spleen were used; in mouse, specific lung weight and number of viable bacilli in lung were used.

The methods and results of examination were summarized as follows:

Experiment 1: The virulence of tubercle bacilli resistant to 10 mcg rifampicin (RFP) for guinea pig and mouse.

The strain resistant to 10 mcg RFP was prepared by cultivation of freeze-dried Kurono strain on Dubos media containing increasing concentration of rifampicin. The concentrations of rifampicin in Dubos media for making the rifampicin resistant strain were,(1) 0.02 mcg → (2) 0.1 mcg → (3) 1 mcg → (4) 2.5 mcg → (5) 10 mcg. The same subculture in Dubos media not containing rifampicin was performed for original strain as the control strain.

The virulence of strain resistant to 10 mcg rifampicin attenuated markedly for guinea pig but not for mouse (Table 1, Figure 1 and Table 2, Figure 2).

To elucidate the relationship of degree of rifampicin resistance and virulence for guinea pig, the following experiments were performed.

Experiments 2 and 3: The virulence of tubercle bacilli resistant to 0.1 and 1 mcg rifampicin for guinea pig.

The strains resistant to 0.1 and 1 mcg rifampicin were made by cultivation of freeze-dried Kurono strain on Dubos media containing increasing concentration of rifampicin. The concentration of rifampicin for making the rifampicin resistant strain were,(1) 0.01 mcg → (2) 0.02 mcg → (3) 0.04 mcg → (4) 0.05 mcg → (5) 0.1 mcg (Inoculated for guinea pig) → (6) 0.4 mcg → (7) 1 mcg (Inoculated for guinea pig) → (8) 2.5 mcg → (9) 5 mcg (Inoculated for guinea pig) → (10) 10 mcg.

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

The virulence of strain resistant to 0.1 mcg rifampicin attenuated markedly comparing with the original strain which was performed the same number of subculture in Dubos media not containing rifampicin (Table 3, Figure 3 and 4).

The strain resistant to 1 mcg rifampicin also showed the decreased virulence for guinea pig (Table 4, Figure 5 and 6).

In conclusion, rifampicin-resistant tubercle bacilli showed markedly attenuated virulence for guinea pig.

緒 言

従来の抗結核薬に耐性を獲得した結核菌の毒力は原株に比べて著しい変動の認められないものが多いが、INH 耐性菌——とくに高度耐性菌の毒力は減弱しており^{1)~6)}、この毒力の低下はマウスよりもモルモットに対して著明で⁶⁾、著者ら⁷⁾も INH 高度耐性菌による感染発病例の少ない理由の1つとして、毒力の低下減弱が考えられることを報告した。

最近登場した新抗結核薬 Rifampicin (RFP) は漸次広く使用されるようになっていくが、RFP 耐性菌の毒力については渡辺⁷⁾がネズミチフス菌および黄色ブドウ球菌の RFP 耐性変異株はマウスに対する毒力が減弱していることを報告しているのみであり、RFP 耐性結核菌の毒力について検討した成績はみられない。

著者らは試験管内で作製した RFP 耐性結核菌のモルモットおよびマウスに対する毒力を検討した結果、モルモットに対する毒力は明らかに減弱していることが認められたので現在までに得られた成績を報告する。

実験方法

今回の実験に用いた菌株はクロノ株で、継代培地および RFP 含有培地はすべて Dubos Tween Albumin 培地を用いた。RFP はプロピレングリコールに溶解し、培地の 1/50 量を加えて必要な濃度の RFP 含有培地を作製した。

第1実験

RFP 耐性菌の作製：凍結乾燥して保存したクロノ株を溶解し、1 mg/ml の菌液とし、これを Dubos 培地にうえ、この培養液から次のように漸次高濃度の RFP 含有培地にうえついで 10 mcg 耐性菌を作製した。

(1) 0.02 mcg/ml → (2) 0.1 mcg/ml → (3) 1 mcg/ml → (4) 2.5 mcg/ml → (5) 10 mcg/ml。

対照としたクロノ株(原株)も同時期に RFP 非含有培地にうえついで。

動物接種：5 代目に得られた 10 mcg 耐性クロノ株と対照の 5 代培養クロノ株の Dubos 培地の Density が 0.2 (日立 EPO-B 型光電比色計, 530 μ フィルター,

RFP 培地は橙赤色を呈するので、660 μ も用いていただいたの Density を測定) に達したものを 4 mg/ml と推定し、これを 4 倍に希釈して 1 mg/ml の菌液とし、モルモット(♀)にはこれを 5 倍希釈した 0.2 mg/ml 菌液の 0.5 ml (0.1 mg) を右下腹部皮下に接種した(両菌株とも 8~9 匹のモルモットを使用)。マウスは dd 系マウス(♀)を使用し、1 mg/ml 菌液の 0.1 ml を尾静脈より接種した(両菌株とも 8~9 匹のマウスを使用)。

剖検：菌接種 6 週後に実施した。

毒力の判定：モルモットでは全身のリンパ節、脾、肝および肺の肉眼所見は工藤⁸⁾の判定方法によつて Index を算出し、また脾重量を測定して青木⁹⁾の方法によつて Root spleen index $\left(\sqrt{\frac{\text{脾重量(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100}\right)$ を算出したほか、脾内生菌数をみるため脾の一部(200 mg 前後)をとり、1% 小川培地を用いて定量培養を行なつた。

マウスでは肺重量を測定し、青木⁹⁾の方法によつて Specific lung weight $\left(\frac{\text{肺重量(mg)}}{\text{体重(g)}} \times 10\right)$ を算出し、脾内生菌数をみるため肺の一部をとつて 1% 小川培地を用いて定量培養を実施した。

第2実験、第3実験

RFP 耐性菌の作製：凍結乾燥して保存したクロノ株の 1 mg/ml 菌液を Dubos 培地にうえ、この培養液から次のように漸次高濃度の RFP 含有 Dubos 培地にうえつぎ、0.1 mcg および 1 mcg 耐性菌を作製しこれらをモルモットに接種してその毒力を検討した。

(1) 0.01 mcg/ml → (2) 0.02 mcg/ml → (3) 0.04 mcg/ml → (4) 0.05 mcg/ml → (5) 0.1 mcg/ml (モルモットに接種) → (6) 0.4 mcg/ml → (7) 1 mcg/ml (モルモットに接種) → (8) 2.5 mcg/ml → (9) 5 mcg/ml (モルモットに接種) → (10) 10 mcg/ml

対照としたクロノ株は RFP を含有しない Dubos 培地に同様にうえつぎを行ない、同じ継代数のものをモルモットに接種した。

動物接種：第2実験では 0.1 mcg 耐性菌、第3実験では 1 mcg 耐性菌を接種した(5 mcg 耐性菌を接種した第4実験はまだ剖検の時期にいたっていない)。接種部位は右下腹部皮下、接種菌量は 1 mg と 0.1 mg の 2

段階で、各群 2~3 匹のモルモット (♀) を用いた。

剖検：菌接種 6 週後に実施した。

毒力の判定：第 1 実験のモルモットの毒力判定法と同様に実施した。

成 績

第 1 実験

(1) モルモットに対する毒力：RFP 10 mcg 耐性クロノ株を皮下に接種し、6 週後に剖検したモルモットの成績はクロノ原株の成績と比較して表 1、図 1 に示した

Table 1. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 10 mcg Rifampicin (RFP) for Guinea Pig (0.1 mg subcutaneous inoculation)

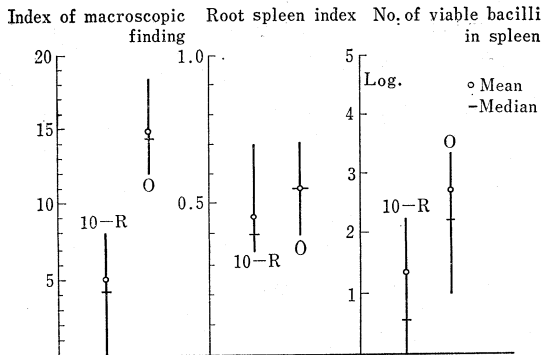
Strain		RFP-resistant Kurono (10 mcg)	Kurono (Original)
No. of viable bacilli inoculated		2×10 ⁶	2.15×10 ⁶
Index of macroscopic finding	Minimum	0	12
	Maximum	8	18.5
	Mean	4.28	14.7
	Median	5	14.25
Root spleen index* (√SI)	Minimum	0.344	0.394
	Maximum	0.698	0.705
	Mean	0.438	0.5488
	Median	0.402	0.552
No. of viable bacilli in spleen (/10 mg)	Minimum	0	9.5
	Maximum	130	2,180
	Mean	22.6	574.15
	Median	3.5	165

Notes: Dubos culture of each strain was used. 8 to 9 animals were used for examination of each strain. Autopsy was performed at 6 weeks after inoculation.

* Root spleen index (√SI) was calculated as follows:

$$\sqrt{\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}}} \times 100$$

Fig. 1. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 10 mcg Rifampicin for Guinea Pig (0.1 mg subcutaneous inoculation)



Notes. O: Original strain, 10-R: 10 mcg resistant strain

が、表および図にみられるように肉眼所見、Root spleen index、脾臓内生菌のいずれでも RFP 10 mcg 耐性菌の毒力は明らかに弱減している。

(2) マウスに対する毒力：マウスの成績は表 2、図 2 に示したが、マウスに対する RFP 10 mcg 耐性菌の毒力は原株とほぼ同程度と考えられる。

第 2 実験

第 1 実験において RFP 10 mcg 耐性菌のモルモットに対する毒力は著明に減弱していることが判明したが、どの程度の耐性から毒力の減弱が認められるかについて検討するため、第 2 実験で 0.1 mcg 耐性菌のモルモット

Table 2. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 10 mcg Rifampicin (RFP) for Mouse (0.1 mg intravenous inoculation)

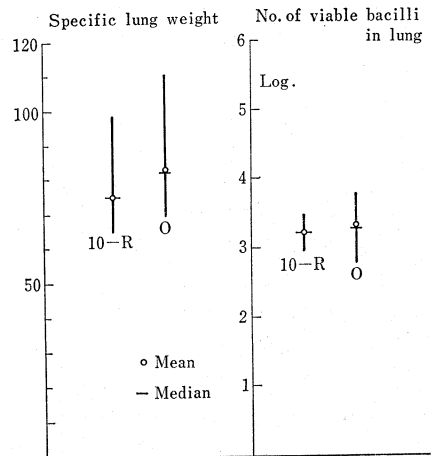
Strain		RFP-resistant Kurono (10 mcg)	Kurono (Original)
No. of viable bacilli inoculated		2×10 ⁶	2.15×10 ⁶
Specific lung weight*	Minimum	65.6	70.0
	Maximum	97.0	111.1
	Mean	75	82.66
No. of viable bacilli in spleen (/10 mg)	Minimum	980	640
	Maximum	3,000	6,000
	Mean	1,910	2,249
	Median	1,750	1,700

Notes: Dubos culture of each strain was used. 8 to 9 animals were used for examination of each strain. Autopsy was performed at 6 weeks after inoculation.

* Specific lung weight was calculated as follows:

$$\frac{\text{Lung weight (mg)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100$$

Fig. 2. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 10 mcg Rifampicin for Mouse (0.1 mg intravenous inoculation)



Notes. O: Original strain, 10-R: 10 mcg resistant strain

Table 3. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 0.1 mcg Rifampicin (RFP) for Guinea Pig

Strain		1 mg subcutaneous inoculation		0.1 mg subcutaneous inoculation	
		0.1 mcg RFP-resistant Kurono	Kurono (Original)	0.1 mcg RFP-resistant Kurono	Kurono (Original)
No. of viable bacilli inoculated		2.15×10 ⁷	2.1×10 ⁷	2.15×10 ⁶	2.1×10 ⁶
Index of macroscopic finding	Minimum	1.5	9.5	0.5	12
	Maximum	2	18.5	2	12.5
	Mean	1.75	14	1.5	12.25
Root spleen index (√SI)*	Minimum	0.4976	0.5463	0.3880	—
	Maximum	0.5231	1.1534	0.4410	—
	Mean	0.5104	0.8499	0.415	0.9495
No. of viable bacilli in spleen (/10mg)	Minimum	2.5	348	0	1,050
	Maximum	31	5,600	0	3,100
	Mean	16.8	2,974	0	2,075

* $\sqrt{SI} = \sqrt{\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100}$ 2 guinea pigs were used for each strain.

3 guinea pigs were used for each strain. Excluding 2 in original and 1 in resistant groups from \sqrt{SI} because of pregnancy.

Fig. 3. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 0.1 mcg Rifampicin for Guinea Pig (1 mg subcutaneous inoculation)

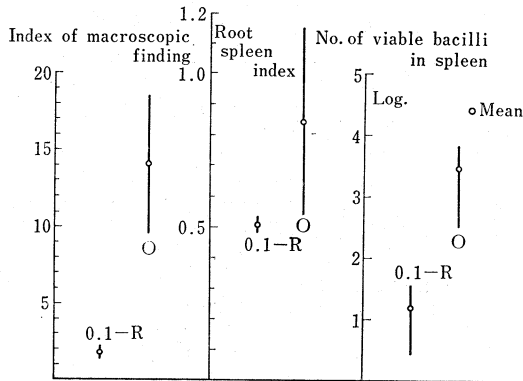
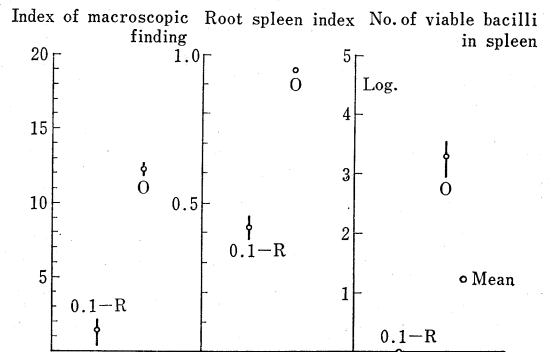


Fig. 4. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 0.1 mcg Rifampicin for Guinea Pig (0.1 mg subcutaneous inoculation)



Notes. O: Original strain, 0.1-R: 0.1 mcg resistant strain

トに対する毒力を調べた結果、表3、図3および4に示すような成績が得られた。すなわち 0.1 mcg 耐性菌もすでに明らかに毒力の減弱が認められ、肉眼病変はきわめて軽微であり、0.1 mg 接種群では2匹とも脾から生菌を培養することができなかつた。

第3実験

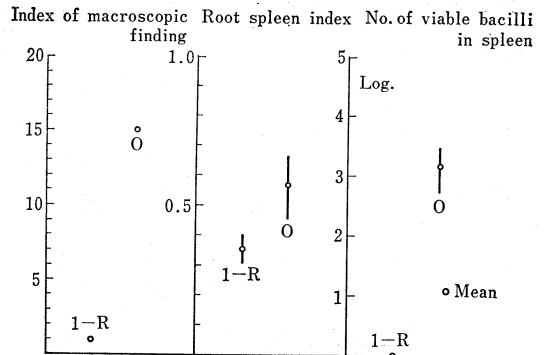
RFP 1 mcg 耐性菌を接種した モルモットの剖検成績は次の表4、図5および6に示したが、肉眼病変は 0.1 mcg 耐性菌接種群に比べてさらに軽い傾向がみられた。また 1 mcg 耐性菌では 1 mg を接種したモルモットの脾から生菌を培養することができなかつた。

なお、第4実験として RFP 5 mcg 耐性菌のモルモットに対する毒力を検討中である。

以上の成績からみると、Dubos 培地で RFP 0.1 mcg に耐性となつた菌のモルモットに対する毒力は明らかに減弱が認められたが、1 mcg、10 mcg と耐性度が高くな

るほど、菌の毒力がより減弱しているかどうかについては、各耐性度の菌の毒力の検討が同時に実施されたわけ

Fig. 5. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 1 mcg Rifampicin for Guinea Pig (1 mg subcutaneous inoculation)



Notes. O: Original strain, 1-R: 1 mcg resistant strain

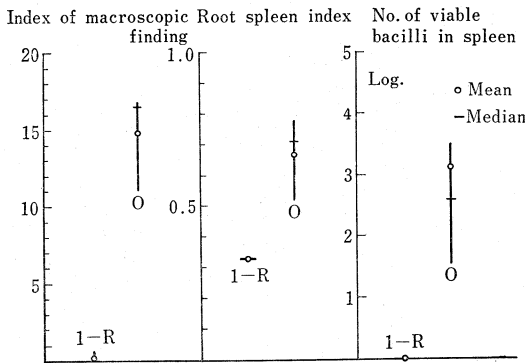
Table 4. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 1 mcg Rifampicin (RFP) for Guinea Pig

Strain		1 mg subcutaneous inoculation		0.1 mg subcutaneous inoculation	
		1 mcg RFP-resistant Kurono	Kurono (Original)	1 mcg RFP-resistant Kurono	Kurono (Original)
No. of viable bacilli inoculated		3.9×10 ⁷	5.98×10 ⁶	3.9×10 ⁶	5.98×10 ⁵
Index of macroscopic finding	Minimum	1	15	0	11
	Maximum	1	15	0.5	17
	Mean	1	15	0.17	14.8
	Median	—	—	0	16.5
Root spleen index (√ST)*	Minimum	0.3151	0.4620	0.3231	0.5155
	Maximum	0.3976	0.6712	0.3367	0.7835
	Mean	0.3564	0.5666	0.3283	0.6676
	Median	—	—	0.3274	0.7094
No. of viable bacilli in spleen (10 mg)	Minimum	0	590	0	35
	Maximum	0	2,550	0	2,950
	Mean	0	1,570	0	1,127
	Median	—	—	0	390

* $\sqrt{ST} = \sqrt{\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100}$ 2 guinea pigs were used for each strain.

3 guinea pigs were used for each strain.

Fig. 6. Virulence of Tubercle Bacilli Resistant to 1 mcg Rifampicin for Guinea Pig (0.1 mg subcutaneous inoculation)



Notes. O: Original strain, 1-R: 1 mcg resistant strain.

ではないので結論は得られないが、これらの耐性度の間では毒力減弱の程度は著明な差はないと思われる。

考 案

INH 高度耐性菌のモルモットに対する毒力の減弱していることは諸報告の一致した見解である^{1)~6)}。

最近登場した新しい抗結核薬 Rifampicin の耐性菌の毒力はどうであろうか。少なくとも一度は検討しておく必要のあるテーマであると考え今回の実験を開始したが、第1実験で RFP 10 mcg 耐性菌——RFP の MIC は Dubos 培地で 0.02 mcg/ml 程度であり、MIC の 500 倍の高度耐性菌である——のモルモットに対する毒力を検討したところ明らかに毒力の減弱している成績が得られた。

そこで次に、どの程度の RFP 耐性から結核菌の毒力

減弱がみられるのかを検討するため第2, 第3の実験を行なった。その結果、0.1 mcg 耐性菌——MIC の5倍程度の耐性——でもモルモットに対する毒力は明らかに減弱していることが判明した。

RFP 耐性菌の毒力についての検討成績は、われわれの第1回の実験終了後に発表された渡辺⁷⁾の、ネズミチフス菌および黄色ブドウ球菌の RFP 耐性変異株のマウスに対する毒力の減弱を認めたという報告のみであり、RFP 耐性結核菌の毒力について検討された成績はみられないので、中間成績を発表した次第であるが、これらの成績の再現性についてはさらに検討を行なう必要がある。さらに他の菌株、とくに患者分離株を試験管内で RFP 耐性とした株、INH 耐性がないかあるいは INH 低耐性で RFP 耐性を示す患者株を用いてその毒力を検討することも必要であろう。

なおマウスに対しては RFP 耐性菌の毒力は減弱していなかったが、マウスとモルモットに対する毒力の違いは INH 耐性菌においても認められており、RFP 耐性菌の毒力減弱を否定することにはならないものと思われる。

結 論

試験管内で作製した RFP 耐性菌の毒力について検討し次のごとき結果を得た。

1) RFP 高度耐性菌 (10 mcg/ml Dubos 培地発育菌) のモルモットに対する毒力は著明な減弱が認められた。

しかしマウスに対する毒力の減弱は認められなかった。

2) RFP 耐性度と毒力の関係を検討した結果、0.1 mcg 耐性菌のモルモットに対する毒力も明らかに減弱

が認められた。

文 献

- 1) Barry, V. C. et al. : Lancet, No. 6768 : 978, 1953.
- 2) 平野憲正他 : 東京医事新誌, 70 : 19, 昭 28.
- 3) Middlebrook, G. et al. : Science, 118 : 297, 1953.
- 4) Meissner, G. : Beit. Klin. Tbk., 113 : 63, 1955.
- 5) Morse, W. C. et al. : Ame. Rev. Tbc., 21 : 429, 1957.

- 6) 大里敏雄他 : 結核, 43 : 473, 昭 43.
- 7) 渡辺力他 : 日本細菌学雑誌, 26 : 192, 昭 46.
- 8) 工藤賢治他 : 結核, 41 : 355, 昭 41.
- 9) 青木正和 : 結核, 42 : 301, 昭 42.

本論文投稿後 RFP 耐性菌の毒力低下を認めた報告が発表されたので文献を追記する。

モルモットに対する毒力低下の報告は :

Schröder, K. H. et al. : Zent. bl. Bakt. Paras. Infek. Hyg., 219 : 112, 1972.

マウスに対する毒力低下の報告は :

青柳昭雄 他 : 第 47 回日本結核病学会総会演説。