

# 細菌の薬剤耐性に関する研究

## 第 13 報

### 結核菌の INAH 耐性化に関する一考察

#### 第 1 編 トリ型結核菌竹尾株の INAH 分解作用について

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

中 瀬 真 一

（受付：昭和34年5月15日）

### 緒 言

イソニコチン酸ヒドラジッド(INAHと略記)は管内実験における高度の菌発育阻止作用および臨床実験における著明な治療効果の点から、現在広く使用されている抗結核剤のうち、最もすぐれたものの一つである事は一般に認められているところである。しかし比較的早期に耐性菌の発現をみる点において遺憾とされている。そのため結核菌の INAH 耐性に関しては、既に先人により各方面より検討され多くの業績が相次いで発表されているが、その耐性発現の機構についてはいまだ解明されざる点が多く存するようである。

一般に細菌の薬剤耐性獲得の機構は複雑で単一ではないとされているが<sup>1) 2)</sup>、その一つとして細菌が薬剤を不活化する事が考えられる、Barclay<sup>3)</sup>らは H<sub>97</sub>Rv 株の感性菌および INAH 耐性菌を合成培地に培養し、発育を認めた後

C<sup>14</sup>-INAHを培地に加え一定期間の後菌のradioactivityを測定すると、INAH耐性菌では感性菌におけるよりもC<sup>14</sup>の含有が少ないにもかかわらず、培地中のINAHが感性菌培地中のそれより著しく少ない事を報告し、これはINAH耐性菌によるINAHの代謝分解の結果ではないかと言っている。また庄司<sup>1)</sup>もINAH添加グリセリンブイヨンにINAH耐性トリ型菌を表面培養し、培地中のINAHの消長をクロマトグラフィーを用いて検索した結果著しいINAHの減少を認めている。私はINAHの定量法として本学生化学教室岩崎教授の創製されたフェリチアンカリアゾトメトリー(Fe AZMと略記)を用い、INAH添加培地にトリ型菌を培養した場合のINAHの減少、更に洗浄菌および菌体分画成分等によるINAHの分解を検索し知見を得たので報告する。

### 実 験 材 料

1) 使用菌：感性菌としては教室保存のトリ型結核菌竹尾株を用いた。INAH耐性菌は同菌を試験管内にて逐次耐性化し、100r/mlの割にINAHを含むKirchner培地にて完全に発育するようになったものを使用した。保存には感性菌、INAH耐性菌ともにソー

トン合成培地を用いて7日ごとに継代したが、耐性菌の培地には100r/mlの割にINAHを加えたものを使用した。

2) INAHは第一製薬会社製のイスコチンを使用した。なおINAH溶液は実験ごとに新調して使用した。

## 実験方法

1) INAH の測定：フェリチアンカリアゾトメトリーを用いた。すなわち INAH のヒドラジン部をフェリチアンカリより分解せしめ、発生する  $N_2$  ガスを測定して INAH の量を計算する。この方法は他の測定方法よりも正確で、かつ他の芳香族アミン類が共存していてもその影響を受けない点においてすぐれてい

るとされている。実験方法は松田原法に従った。INAH 1M より 22.4 l ( $0^\circ C$ , 760mmHg) の  $N_2$  ガスが定量的に発生し、したがって INAH 100r/ml 溶液 2.0 ml より発生する  $N_2$  ガスの量は  $32.7mm^3$  ( $0^\circ C$ , 760 mmHg) である。

## 実験成績

I INAH 添加培地に菌を培養した場合の培地中の INAH の減少：

培養液としては 5% グリセリンブイヨンを用い、これに 100r/ml の割合に INAH を加えた。この INAH 添加グリセリンブイヨンを入れた 3 本のコルベンに、INAH 耐性竹尾株を表面培養し、培養後 2, 4 および 6 日目にそれぞれろ紙にて菌体をろ別し、各ろ液 2.0ml につき Fe AZM を行った。対照としては上記の 100r/ml INAH 添加 5% グリセリンブイヨンをそのまま  $37^\circ C$  に放置したものを使用した。表 I に示すごとく菌を培養した培地中の INAH は日数の経過とともに著明に減少し、6 日後にはほぼ初めの量の  $\frac{1}{2}$  となるが菌を培養しなかった対照では、わずかな INAH の減少が認められるのみである。

II トリ型菌による INAH の分解：

1) 5% グリセリンブイヨン培養の菌を使用した場合：

トリ型竹尾株の INAH 耐性菌を 5% グリセリンブイヨンに表面培養し、7 日後にろ紙にて菌体をろ別、この菌体に M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8) を加えて摩細し、遠心を繰り返して充分洗浄する (4~5 回)。この洗浄菌をろ紙にて可及的に水分を除去した後、菌体 5.0gm (湿菌量) を 100r/ml INAH 含有の M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 50.0ml に加え硝子乳鉢にて充分摩細し均等な菌懸濁液を作り、これをコルベンに 3 等分し、時々振とうしながら  $37^\circ C$  のふ卵器中に放置それぞれ 24, 48 および 96 時間目に取り出し、4,000rpm 30 分間遠心して得られた上澄液 2.0

ml につき Fe AZM を施行 INAH の量を測定した。同様な操作を感性菌についても行った。対照として菌を含まない 100r/ml INAH 含有 M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8) を  $37^\circ C$  に放置して INAH の量を測定した。表 II, 1) によれば対照における INAH の減少は著明である。また INAH 耐性菌を加えた場合は感性菌を加えた場合に比しその減少はことに著明でその間に明らかな差が認められた。すなわちトリ型菌は INAH を分解し、かつ INAH 耐性菌は感性菌よりも多くの INAH を分解する事が認められた。

2) ソートン培地培養の菌を用いた場合：

ソートン合成培地 (アスパラギンの代りにグルタミン酸ソーダ使用) に 7 日間培養した菌体を用いて前記と同様な実験を行った。結果は表 II, 2) に示すごとく感性菌ならびに耐性菌とも INAH 分解能を有するが INAH 耐性菌の分解能が感性菌よりまさるなど 5% グリセリンブイヨン培養菌を使用した場合と同じ成績が得られた。すなわち培地の差異による菌の INAH 分解能の変化は認められなかった。

3) 鉄を含まないソートン培地で培養した菌を用いた場合：

クエン酸鉄アンモンを加えないソートン培地を作り、これに培養した菌体を用いて前記と同様な実験を行った。培養期間は 7 日間であるが、菌の発育が非常におくれるので所要の菌量を得るには、かなり大量の培地を必要とした。対照菌として通常のソートン培地に培養した菌体を用いた実験方法は前と同様であるが、接触時

間は24時間とした。表Ⅱ, 3)に結果を示したが対照菌では著明に INAHの分解を示すのに鉄不含ソートン培地培養の菌は、感性菌および耐性菌ともにほとんど INAH の分解を示さなかった。

Ⅲ INAH 溶液の pH が菌の INAH 分解に及ぼす影響：

以上の実験では、菌懸濁液を作るのに用いた INAH 溶液の pH はすべて6.8としたが、次にこの pH を変えて実験を行った。pH 5.4, 6.8 および 8.2の100r/ml INAH 含有磷酸緩衝液を作りそれぞれにソートン培地7日間培養の菌体を前記の実験と同様にして加え、24時間後の溶液中に含まれる INAHの量を測定した。表Ⅲに結果を示したが、図で明らかのように、溶液の pH が高くなるにつれ溶液中の INAHの減少が著明となって来る。すなわち菌による INAHの分解が大きくなると考えられ、更に INAH耐性菌と感性菌との差も大きくなっている。

Ⅳ 無細胞性菌体摩細上澄液による INAHの分解：

ソートン培地7日間培養の菌体を前記と同様に充分洗浄し、その 10.0gm (湿菌量)を硝子乳鉢に取り、アルミナ 10.0gm を加えて氷冷しつつ約1時間充分に摩細し、M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 50.0ml を加えて充分に混和する。次に 4,000rpm 60分間遠心して上澄液を取り無細胞性菌体摩細上澄液を作った。これをカルボールフクシンで染色して見ると淡く染った無構造の物質と、強く赤色を呈する顆粒様物質を認めるのみで完全な菌体はほとんど認められなかった。この上澄液 20.0ml に INAH含有M/15磷酸緩衝液 (pH6.8) 20.0ml を加え 37°C に放置して INAH の分解が認められるか否かを検索した。表Ⅳに示されるように、この上澄液でも

INAH の著明な分解が認められ、かつ INAH耐性菌の上澄液は感性菌のそれより多くの INAH を分解する事が認められた。

Ⅴ 加熱死菌による INAH の分解：

ソートン培地7日間培養の菌体を充分に洗浄した後、コッホ釜にて 100°C, 30分間加熱して完全に殺菌する。この菌体を INAH溶液に加え、INAH の分解が認められるか否かを調べた。対照菌として加熱しない洗浄菌をそのまま用いた。実験方法はⅡの実験と同様である。表Ⅴに示すごとく加熱死菌でも生菌とほぼ同程度の INAH を分解し、INAH 耐性菌は死菌でも感性菌より多くの INAH を分解する事が認められた。

Ⅵ 菌体リポイドおよび脱脂菌体による INAH の分解：

ソートン培地7日間培養の菌体を洗浄、水分を除去し、約30倍量のアルコールエーテル(1:1)を加えて時々振とうしながら室温に3日放置して抽出を行う。この操作を2回繰り返して得られた上澄を一括してダイツろ過後減圧濃縮を行って帯褐色蠟様の菌体リポイドを得た。リポイド抽出後の菌体は更にアルコールエーテルにて数回洗浄しそのまま乾燥して脱脂菌体となした、菌体リポイドは20mg/ml、脱脂菌体は40mg/mlの割合に INAH 100r/ml 含有 M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8) に加え硝子乳鉢にて充分一様な懸濁液となした後、37°C に放置して INAH の消長を検索した。表Ⅵに見られるように菌体リポイドは著明に INAHを分解し、かつ INAH 耐性菌々体リポイドは感性菌々体リポイドよりも多くの INAH を分解する事が認められた。しかし INAH 耐性菌および感性菌の脱脂菌体ではともにほとんど INAHの分解が認められなかった。

## 考 案

結核菌培養培地に加えられた INAHが菌の発育に伴ない著明に減少する事は既に Barcay, 堀

および庄司らにより認められているところである。また庄司は洗浄菌と INAHとの接触試験を

行った結果、明らかではないが INAH 耐性菌が感性菌よりも多くの INAH を分解するのではないかと述べている。しかしこの INAH 減少の機構は明らかでなく、Barclay は INAH 耐性菌が INAH を代謝分解してしまうのではないかと考え、堀らは INAH 耐性菌ではカタラーゼ活性が減退しているため、菌の物質代謝に伴って発生する  $H_2O_2$  の停滞が INAH 分解増大の原因ではないかと仮定して実験を行ったが、明確な結論は得られなかったと述べている。

私の実験でも菌培養培地、生菌懸濁液に加えられた INAH が著明に減少し、かつ INAH 耐性菌が感性菌よりも多くの INAH を分解する事が認められた。しかし物質代謝が完全に停止していると思われる加熱死菌あるいはアルコールエーテル可溶性部分にも INAH 分解因子が認められた事から考えて、この INAH 減少の機構が Barclay et al や堀らの言うように菌の物質代謝に関係あるもののみと考え難い。ここで興味あると思われる事は、クエン酸鉄アンモンを加えないソートン培地で培養した菌では、INAH 耐性菌および感性菌ともにほとんど INAH を分解しなかった事である。この事実から菌体内の鉄成分と INAH の分解とがなんらかの関係を有するのではないかと想像される。一方 INAH は水溶液中でかなり不安定で分解しやすい事が知られている<sup>8)9)10)</sup>。この場合溶液の pH がアルカリ性になるほど INAH の分解は大きくなり、更に溶液中に Hemin や Mn, Cu, Fe らの金属イオンが共存する時は INAH の分解が更に促進されると言われている。私の実験でも菌懸濁液の pH がアルカリ性になるほど INAH の分解が促進されかつ INAH 耐性菌と感性菌による分解の差の

大きくなる事が認められた。また教室の西田<sup>11)</sup>らはヒト型結核菌  $H_2$  株では、INAH 耐性菌に感性菌よりはるかに多くの鉄が含まれている事を報告している。これらの事より推論して、トリ型菌の INAH 分解因子は菌体内の鉄成分に関係があると考えられる。しかしこの鉄がいかなる形で含まれているかについては今のところ明らかではないが、まず鉄ポルフィリン体が考えられる。しかしながら INAH 耐性菌のポルフィリン体が増加しているという報告はほとんどなくわずかに戸井田<sup>12)</sup>らが *Mycobacterium 607* において INAH 耐性菌に感性菌より多くのコプロポルフィリンを認めているにすぎない。勝沼<sup>13)</sup>、正田<sup>14)</sup>らは逆にトリ型菌 INAH 耐性株についてコプロポルフィリンの消失を報告し、Fischer<sup>15)</sup>もまた INAH 耐性菌 Hemin 生合成能力消失を論じている。したがって INAH 分解因子の本態についてはなお今後の追究が必要と思われる。次にこの INAH 分解因子と菌の INAH 耐性化との関係であるが、この点についても今のところ全く不明である。ただ INAH 分解因子が感性菌にも存在する事から考えて INAH 分解因子が INAH 耐性の本態であるとはもちろん認め難い。しかし INAH 耐性菌が感性菌よりも多くの INAH を分解する事は事実であり、この INAH 耐性化による INAH 分解能の増加が加熱死菌あるいは菌体リポイドにも認められる事を考慮すると菌が INAH 耐性化する事によって菌体内代謝機構に変化を生じ、この為 INAH を分解するような物質が菌体内に増加するのではないかと考えられるが、この点の解明についても更に今後の研究に待たなければならないと思われる。

## 結 論

私は抗酸性菌の INAH 耐性化の機構を究明する目的でトリ型結核菌（竹尾株）の感性株および INAH 耐性株を用い INAH 添加培地に菌を培養した場合および菌体あるいはその分画成分

を INAH 溶液に加えた場合の INAH の消長を Fe AZM によって検索し次の結果を得た。

1) トリ型菌竹尾株は菌体自身に INAH を分解する因子を含むと思われる。

2) INAH 耐性菌は感性菌より多くの INAH を分解する。

3) INAH 分解因子は菌体の鉄分および菌体

リポイドと密接な関係を有すると思われるが、その本態および菌の INAH 耐性化との関係は明らかでない。

### 文 献

- 1) 庄司宏：日本臨床結核, **16**, 568, 1957.  
 2) 堀三津夫：日本臨床, **15**, 52, 1957.      3) Barclay, W. R. : Am. Rev. Tub., **67**, 490, 1953.  
 4) 松田漸：生化学, **26**, 420, 1954.      5) 松田漸：生化学, **27**, 366, 1955.      6) 岩崎憲：金大十全会雑誌, **42**, 2132, 1937.      7) 那須義則：結核, **32**, 12, 1957.      8) Lewin, E. : Am. Rev. Tub., **71**, 732, 1955.

- 9) 西啓三：大阪大学医学雑誌, **10**, 1421, 1958.  
 10) 江見勇：京大結研紀要, **7**, 81, 1958.      11) 西田昭治：未発表      12) 戸井田一郎：結核, **34**, 11, 1959.      13) 勝沼信彦：結核, **32**, 105, 1957.      14) 正田亨：ビタミン, 331, 1957.      15) Fischer, M. W. : Am. Rev. Tub., **69**, 469, 1954.

表 I 100r/ml INAH 含有グリセリンブイヨンに INAH 耐性菌を培養した場合の INAH の変化

a)

試料2.0mlより発生するN <sub>2</sub> 量(mm <sup>3</sup> )		
試料種類 培養日数	INAH 耐性菌	対 照 培 地
0	32.9	32.9
2	31.2	30.0
4	23.9	31.2
6	18.8	28.9

100r/ml INAH 溶液 2.0ml より 32.7mm<sup>3</sup> の N<sub>2</sub> ガスを発生する。(以下同じ)

b)

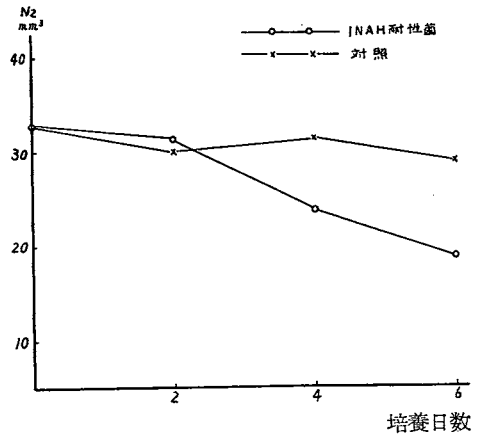


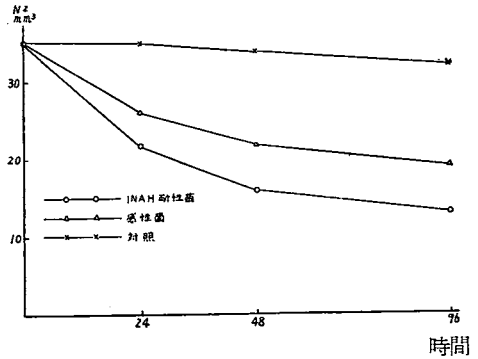
表 II トリ型菌による INAH の分解

1) グリセリンブイヨン培養菌使用

a)

試料2.0mlより発生するN <sub>2</sub> 量(mm <sup>3</sup> )			
試料種類 時 間	INAH 耐性菌	感染菌	対 照
0	34.5	34.5	34.5
24	21.6	26.0	34.4
48	16.0	21.6	33.1
96	13.2	19.2	32.3

b)

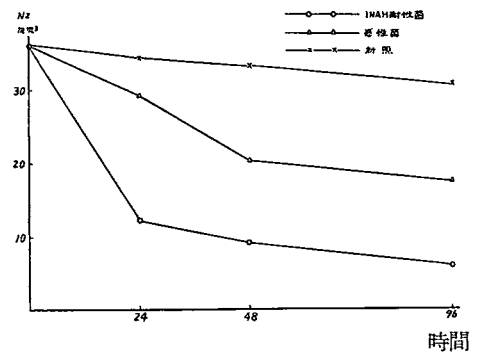


2) ソートン培地培養菌使用

a)

試料2.0mlより発生するN <sub>2</sub> 量(mm <sup>3</sup> )			
試料種類 時 間	INAH 耐性菌	感 性 菌	対 照
0	36.1	36.1	36.1
24	12.4	29.2	34.3
48	9.3	20.3	33.0
96	6.1	17.5	30.8

b)



3) 鉄不含ソートン培地培養菌使用

a)

試料 2.0ml より発生する N <sub>2</sub> 量 (mm <sup>3</sup> )				
試料種類		時間	0	24
鉄不含ソートン培地培養菌	INAH 耐性菌		42.7	40.0
	感性菌		42.7	39.8
ソートン培地培養菌	INAH 耐性菌		42.7	18.5
	感性菌		42.7	31.4
対 照			42.7	41.0

b)

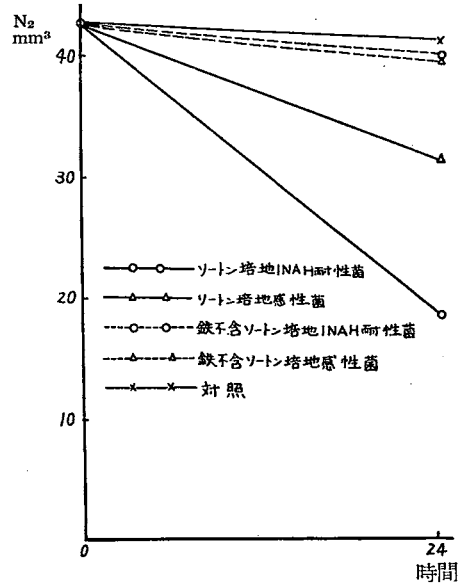


表 III INAH 溶液の pH を変えた場合のトリ型菌による INAH の分解 (接触時間24時間)

a)

試料2.0mlより発生するN <sub>2</sub> 量(mm <sup>3</sup> )				
pH	試料種類	INAH 耐性菌	感性菌	対 照
5.4		29.0	32.3	32.3
6.8		21.3	29.0	34.0
8.2		8.1	22.2	32.3
接触試験前の溶液2.0mlより発生したN <sub>2</sub> は34.6mm <sup>3</sup>				

b)

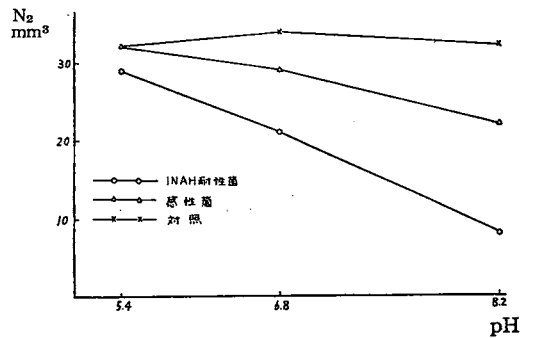
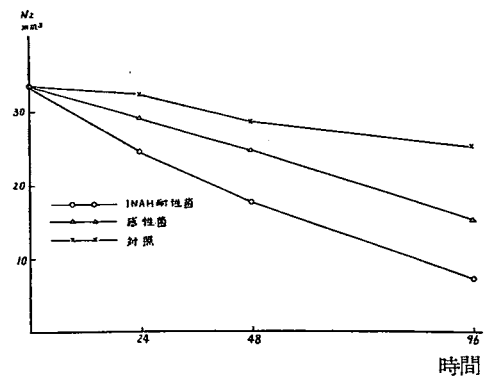


表 IV 無細胞性菌体摩細上澄液による INAH の分解

a)

試料2.0mlより発生するN <sub>2</sub> 量(mm <sup>3</sup> )				
時間	試料種類	INAH 耐性菌	感性菌	対 照
0		33.6	33.6	33.6
24		24.7	29.2	32.6
48		17.7	24.8	28.8
96		6.9	14.3	25.0

b)

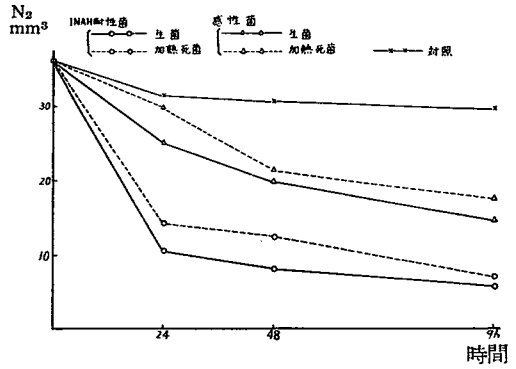


表V 加熱死菌による INAH の分解

a)

試料2.0mlより発生する N <sub>2</sub> 量 (mm <sup>3</sup> )					
試料の種類 時間	加熱死菌		生菌		対照
	INAH耐性菌	感性菌	INAH耐性菌	感性菌	
0	36.2	36.2	36.2	36.2	36.2
24	14.7	30.4	10.5	25.3	31.8
48	12.6	21.7	8.1	20.2	31.0
96	7.3	17.5	5.7	14.9	29.9

b)

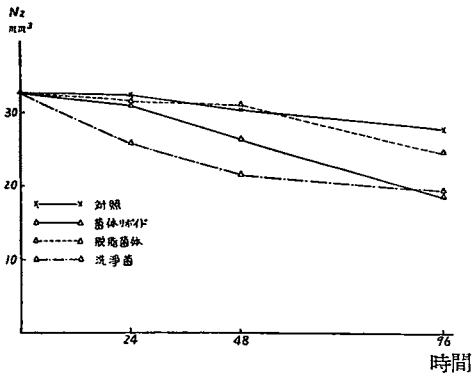


表VI 菌体分画による INAH の分解

a)

試料2.0mlより発生するN <sub>2</sub> 量 (mm <sup>3</sup> )							
試料の種類 時間	菌体リポイド		脱脂菌体		洗浄菌		対照
	INAH耐性菌	感性菌	INAH耐性菌	感性菌	INAH耐性菌	感性菌	
0	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6
24	24.1	31.0	31.6	31.6	21.6	26.0	32.1
48	13.5	26.3	29.5	31.2	16.0	21.6	30.1
96	9.4	18.4	24.9	24.9	13.2	19.2	27.8

b) 感性菌菌体分画による INAH の分解



c) INAH 耐性菌菌体分画による INAH の分解

