

細菌の薬剤耐性に関する研究

第 7 報

薬剤耐性結核菌のマウスに対する毒力について

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

吉 田 啓 一
英 軒
三 枝 慶 一 郎

（受付：昭和32年3月1日）

緒 言

Streptomycin (SM) と Isonicotinic acid hydrazide (INAH) は何れも結核治療剤として優秀な成績を収めているが、使用量の増加に伴い、結核菌が容易に耐性を獲得することは細菌学並に遺伝学上の興味よりも、治療上重大な問

題となつている。

私達は感性菌との関係の一端を窺うべく、両者の毒力をマウス体内に於ける菌の増殖力をもつて比較したのでその成績を報告する。

実 験 方 法

1) 使用菌株について

当教室保存の人型結核菌 H₂ 株を薬剤含有 Kirchner 培地に継代して得られた SM 耐性株 (SMR) INAH 耐性株 (INahr) 及びその原株の 3 種を用いた。これ等の各種抗結核剤に対する感受性を測定するに第 1 表に示す如く、Kirchner 液体培地に於て SMR は SM の含有 10,000 γ /ml でも、又 INahr は INAH 含有 100 γ /ml でも尙旺盛な発育を認めたが、その他の抗結核剤に対しては、原株と同様の感受性を示した。又カタラーゼ反応をスライド板法で検したところ、INahr 最も弱く、SMR は最も強く、原株はその中間であつた。

2) 実験動物

第 1 実験には雑種の体重 15gm 前後のマウスを、又第 2 実験は体重約 13gm の純系 DD 系マウスで、当教室に於いて飼育繁殖せしめたものを用いた。

3) 感染方法

各菌株の Kirchner 培地 3 週間表面培養の菌苔を採り、型の如く滅菌生食水で 1 mg/ml の浮游液を作製し、皮下、腹腔内及び尾静脈内接種の場合はその 0.1ml を注射し、鼻腔内感染の場合は三枝の法¹⁾により 0.05 ml を吸入せしめた。各接種液の生菌数は第 2 表の通りで、ほぼ同程度であつた。而して耐性菌の分布状態は第 3 表に示す通りであつた。

3) 観察事項

毎週体重測定並に全身状態を観察し、次いで第 1 実験群は感染後 3 週間目にエーテル麻酔の下に屠殺し、第 2 実験群は感染後第 2 週及び第 4 週に各々半数を屠殺剖検し、肉眼的に肺臓、肝臓及び脾臓の病変度を観察した。

4) 臓器内結核菌の定量培養

第 1 実験群は各動物の臓器毎に、又第 2 実験群は肺、肝、脾を湿じてホモゲナイザーにて磨滅粉碎し、全臓器重量の 0.1mg 当りを小川氏法²⁾により定量培養した。

実験成績

〔I〕 第1実験

鼻腔内感染に依り、原株、SMR 並に INAHR 株のマウスに対する毒力を比較した。

此の方法に依れば病変は肺に限られ、肝脾に殆んど結節を認めないのみならず、臓器内に結核菌を証明するものは極めて少なかった。感染時と剖検時に於ける体重を比較するに、その増加率は SMR 群 > 原株群 > INAHR 群の順であった。三菌株の毒力を肺の病変度並に臓器内の生菌数について比較するに殆ど差を認める事は出来なかつた。(第3表参照)

次に INAHR 株について鼻腔内、皮下、腹腔内及び静脈内感染の4方法について比較するに皮下接種のものは殆ど病変無く又臓器内にも菌を証明する事は出来なかつた。腹腔内及び静脈内感染のものは鼻腔内感染に比較すれば軽度ではあるが肺に病変を認むるのみならず肝、脾より菌を証明する事が出来た。

即ち本実験の範囲では肺臓の変化を主体として比較実験を行ふには鼻腔内感染が最も好適であつたが、耐性菌と感性菌の間に毒力の差は認める事は出来なかつた。尙又 INAHR 株は腹腔内或は静脈内感染に依つても肺、肝及び脾より

菌を証明する事が出来た。

〔II〕 第2実験

純系マウスを用い静脈内感染に依つて比較した。

1) 体重の経過を感染前の各群の平均体重を100として、その増減経過をグラフで示したのが第1図で、これによれば各群はいずれも第3週迄は同様の増加を認めたが、第4週では INAHR 接種群のみはやゝ減少した。

2) 肉眼的剖検所見

肺臓に於ける病変を比較すれば第2週では各群の間にその差を認めなかつたが、第4週では INAHR 群が他の2群に比しやゝ病変が強かつた。尙肝並に脾では肉眼的に結節形成は認められなかつた。

3) 臓器定量培養の成績

各群よりの発生集落数は第5及び第6表に示す如く、第2週剖検群では原株群 < SMR 群 < INAHR 群の順で、その差はあまり著明でないが、第4週剖検群ではその順位は同様であるが、INAHR 群よりの発生集落数は著明に増加していた。

総括及び結論

耐性菌の毒力に関しては、多くの報告があり毒力の低下を認めるもの或は差を認めずとする者等必ずしも意見の一致を見ていない。

SM 耐性菌の毒力に関し Karlson⁽²⁾, Emmart 等⁽³⁾は海狸を用い、同一菌株より分離した耐性菌は感性菌に比し毒力が弱いと報告している。我が国に於ても柳沢⁽⁴⁾橋本⁽⁵⁾も同様の成績を得ている。又教室の松田⁽²²⁾は肺結核患者から分離した SM, PAS 2 重耐性の荒永株を海狸の皮下並に脳内に接種し毒力の低下を認めている。一方これに反して Steenken 等⁽⁶⁾は耐性菌と感性菌の毒力はほぼ同様か却つて耐性菌が強毒化していると述べ Cyanik もこれに同調してい

る。我が国に於ても小酒井等⁽¹⁸⁾は両者の間に毒力の差を認めていない。私達の第1実験では耐性菌と感性菌の間に毒力の差を認めなかつたが、純系マウスによる第2実験では耐性菌は感性菌に比しわずかに毒力は強いといふ結果となつた。

INAH 耐性菌の毒力に関し, Peizer 等⁽⁹⁾はチンジク鼠の脳内接種により耐性菌の弱毒化を認め、我が国では金井⁽¹⁰⁾及著者の一人英⁽²⁰⁾も同様な成績を得ている。又 Steenken⁽¹¹⁾, Cyanik⁽⁷⁾, Michael 等は海狸の皮下接種実験で同様毒力の低下を認め我が国では平野等⁽¹³⁾は海狸、マウスを用い INAH 耐性菌の毒力低下を報告して

いる。又 Goulding⁽²¹⁾ も同様の実験を行い INAH 耐性菌は局所の病巣形成について、感性菌と同様な毒力を示すが、全身性の感染成立は感性菌よりも弱毒であると推論している。

一方 Bleck⁽¹⁴⁾、佐藤⁽¹⁵⁾ 等はマウスの静脈内接種法によつて、耐性菌の弱毒化は認めていない。又 Morse⁽¹⁶⁾ は INAH 耐性菌は海狸に対しては、無毒であつたが、マウスに対しては病変を起したと報告し、Middlebrook 等⁽¹⁷⁾ も同様な成績を報告している。

私達のマウスを用いての実験では INAH 耐性菌は感性菌に比し毒力の低下を証明することは出来なかつた。然し英の実験成績をも徴するときは Morse、Middlebrook の成績と一致していると云ふ事が出来よう。

尙近時 Lenore⁽¹⁸⁾ は INAH 耐性度の高い菌株ほど、カタラーゼ反応が弱く、又カタラーゼ反応の弱いものほど海狸に対する毒力は弱くなつていのではないかと唱えているが、Michael はこれを否定している。私達の実験でもカタラーゼ反応の強さと毒力との間に一定の関係は認められなかつた。

以上の成績を要約するに、マウスに対し各種の感染方法に依つて SMR 並に INAHR 株と原感受性株との毒力を比較した実験の結果では何れの耐性株も原株に劣らず毒力を保有している事が証明出来た。

本研究にあたり指導を頂いた柿下教授並びに西東助教に感謝するとともに種々協力を頂いた教室同人に謝意を表する。

文 献

- 1) 小川辰次：結核，24，19，1949.
- 2) Karlson, A. G. : Am. Rev. Tbc., 68, 549, 1954. 3) Emmart, E. W., et al. : Am. Rev. Tbc., 59, 438, 1949. 4) 柳沢謙：日本医学誌，1487，8，1952. 5) 橋本達一郎：結核，29，383，1954. 6) Steenken, W., et al. : Am. Rev. Tbc., 58, 353, 1955. 7) Czanik, et al. : Beitr. klin. Tbc., 114, 304, 1955.
- 8) 小酒井望，他：医学と生物学，19，93，1951.
- 9) Peiger, L. R., et al. : Am. Rev. Tbc., 68, 290, 1953. 10) 金井興美：医学と生物学，35，105，1955. 11) Seenken, W., et al. : Am. Rev. Tbc., 68, 548, 1953. 12) Michael,
- L. C., et al. : Am. Rev. Tbc., 71, 799, 1955.
- 13) 平野憲正，他：東京医事新誌，70，371，1953. 14) Bleek, H., et al. : Am. Rev. Tbc., 68, 734, 1953. 15) 佐藤直行：医学と生物学，29，14，1953. 16) Morse, W. C., et al. : Am. Rev. Tbc., 69, 464, 1954.
- 17) Middlebrook, G., et al. : Am. Rev. Tbc., 70, 852, 1954. 18) Lenore, R., et al. : Am. Rev. Tbc., 72, 246, 1955. 19) 三枝慶一郎：金大結研年報，15(上)，1957. 20) 英軒：金大結研年報，14(中)，191，1956. 21) Goulding: Brit. I. exp. p. art., 36, 628, 1955. 22) 松田知夫：金大結研年報，12(下)，17，1954.

第1表 各種抗結核剤に対する供試菌株の感受性

菌株	薬剤	SM	INAH	PAS	OM	Tb 1
H ₂ 原 株		1.0	0.05	0.5	1.0	5.0
H ₂ SMR		10,000<	0.05	0.5	1.0	10.0
H ₂ INAHR		1.0	100<	0.5	1.0	10.0

(数字は各薬剤の菌発育限界濃度 γ /ml)

SM : Dihydrostreptomycin
 INAH : Isonicotinic acid hydrazide
 PAS : p-Aminosalicylic acid
 OM : o-Aminophenol
 Tb 1 : 4-acetylaminobenzaldehyde
 thiosemicarbazone

第2表 接種菌液の生菌数

菌 株	1mg/ml中の生菌数
H ₂ 原 株	3.5×10 ⁶
H ₂ SMR 株*	2.6×10 ⁶
H ₂ INAHR 株*	3.0×10 ⁶

*SMR……SM 耐性株

INAHR……INAH 耐性株

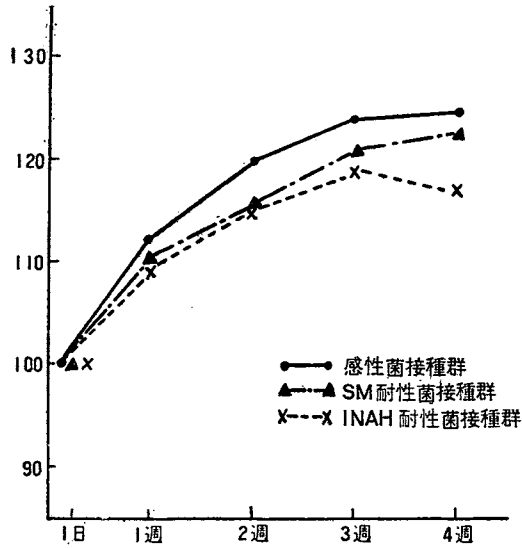
菌 株	培地 接種 菌量	SM又はINAHの小川培 地中の濃度 (r/ml)					
		0	1	10	100	1,000	10,000
H ₂ SMR	0.01*	##	##	##	##	##	##
	0.001	##	##	++	++	++	++
	0.000,1	128	117	100	108	94	80
H ₂ INAHR	0.01	##	##	##	##	—	—
	0.001	##	##	##	##	—	—
	0.000,1	96	92	79	75	—	—

* 1 mg/mlの菌液を基準としそれを稀釈し培地に接種した。

第4表 第1実験成績

供 試 菌 株 (感 染 方 法)	動 物 分 類	体 重		肺 病 変	脾重量 (mg)	各臓器内結核菌の定量培養成績		
		感染時	剖検時			肺	肝	脾
H ₂ 原 株 (鼻 腔 内)	赤	16	19	+	100	5	0	0
	緑	16	20	##	150	290	0.7	0.4
	青	13	12	##	100	55(160)	0	0.1
	紫	15	18	##	200	230	0.05	0
	白	13	14	##	100	220	0	0
H ₂ SMR (鼻 腔 内)	赤	19	21	##	200	95	0	0
	緑	16	20	##	150	340	0.1	0.15
	青	14	18	+	100	0(178)	0	0
	紫	12	12	##	50	125	0	0
	白	17	20	##	100	330	0	0
H ₂ INAHR (鼻 腔 内)	赤	15	17	##	100	220	0.05	0.35
	緑	18	21	##	200	300	0.1	0
	青	15	15	##	50	29(168)	0	0.05
	紫	14.5	15	##	100	290	0	0
	白	13	15	+	100	0	0	0
H ₂ INAHR (皮 下)	赤	14	17	—	100	0	0	0
	緑	14	20	—	100	0	0	0
	白	15	18	—	50	0	0	0
H ₂ INAHR (腹 腔 内)	赤	12	15	+	100	0.4	0	2.0
	緑	14	17	+	100	0.2(0.43)	1.0	3.0
	白	18	20	+	200	0.7	1.0	2.5
H ₂ INAHR (静 脈 内)	赤	14	18	##	100	35	15.0	22.0
	緑	14	17	+	100	20(41.7)	12.0	45.0
	白	12	16	##	50	70	31.0	38.0

第1図 体重増加曲線



第5表 接種後2週剖検群の臓器内生菌数

群別	動物	臓器内生菌数
原株群	1	176
	2	156 (131)
	3	60
SMR群	7	160
	8	200 (178)
	9	175
INahr群	13	256
	14	200 (205)
	15	160

第6表 接種後4週剖検群の臓器内生菌数

群別	動物	臓器内生菌数
原株群	4	200
	5	160 (174)
	6	162
SMR群	10	640
	11	160 (329)
	12	187
INahr群	16	520
	17	160 (493)
	18	800