

細菌の薬剤耐性に関する研究

第 2 報

結核菌の INAH 耐性に就いて

第 3 編 INAH 耐性結核菌の毒性試験と免疫原性の検討

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

英 軒

（受付：昭和31年3月11日）

緒 言

INAH耐性結核菌の毒力に就ては Karlson u. Ikemi⁽¹⁾, Goulding et al.⁽²⁾, Barnett et al.⁽³⁾, 等は感性菌と大差がないと報告しているが、原株感性菌に比し毒力の低下が認められると云ふ報告は、Steenken u. Wollinsky⁽⁴⁾ を始め多数の報告^(5,6,7,8,9) があるので、さらに管内実験

に於いて INAH 耐性となつた人型結核菌 H₂ 株に就いて追試すると共に、INAH耐性獲得が免疫原性に及ぼす影響の有無について検討し、些か知見を得たのでここに報告する次第である。

(I) INAH 耐性菌の毒力試験

A) マウスを用ひての実験

1) 実験動物並びに感染方法

体重 20~22gm の健康マウス16匹を2群に分ち一群には INAH 耐性菌 (100r/ml) 他群には原株感性菌を夫々 1gm/ml 含有の菌浮游液とし各0.1ml宛を尾静脈より注入感染した。

2) 観察方法

被感染マウスを毎週2頭宛撲殺し4週まで

a) 各臓器の肉眼的観察

b) 肺肝脾及び腎について小川氏法⁽¹⁰⁾ に準じ臓器内結核菌の定量培養を行った。

3) 実験成績

a) 剖検時肉眼的所見 (第1表参照)

耐性菌感染動物では3週後まで殆んど変化が認められず、4週に至つて初めて肝臓と脾臓に軽度の病変を認めた。

感性菌感染動物では1週目より既に脾臓に交

化が認められ、以後は肺臓、肝臓及び脾臓全部に病変を認め且つ経過とともにその度を増した。

b) 臓器内結核菌定量培養成績 (第2表参照)

両群とも第1週目より集落を認めたが、感性菌感染動物では週を追つて臓器内菌数の増加を認め、耐性菌感染動物では3週まで菌数は増加したが、4週では肺臓に於てのみ増加を認めたがその他の臓器では減少していた。

以上の肉眼的所見と培養成績から INAH耐性菌のマウスに対する毒力は、感性菌の毒力に比較して幾分低下している如く推定された。

B) 海狸を用ひての実験 (脳内接種法)

1) 実験動物並びに感染方法

海狸3頭宛2群に分ち、一群には INAH耐性菌、他群には原株感性菌 (1頭は接種2日目に死亡したので

成績より除外した)を、渡辺等¹¹⁾の方法により夫々1mg/ml含有の菌浮游液各0.1ml宛脳内え接種した。

2) 観察方法

各群の生存日数の観察を行い、且死亡時及び撲殺時における内臓の肉眼的観察並びに臓器内結核菌の定量培養を行った。

3) 実験成績

a) 剖検時肉眼的所見 (第3表参照)

感性菌感染海狸の平均生存日数は22日であった。脳、脾は高度に又肺、肝は軽度に変変が認められた。淋巴腺では浅頸部に於て軽度の病変

を認めたが、その他には変化はなかつた。

INAH耐性菌感染海狸は1ヶ月に至るも死亡せず、2ヶ月目に撲殺した。その時の剖検所見は、脳、肺、肝及び脾に於て極めて軽度の病変を認めたにすぎなかつた。淋巴腺に於ては病変は認めなかつた。

b) 臓器内結核菌定量培養成績 (第4表参照)

感性菌感染海狸に於ては脳、肺及び脾の全臓器に陽性で、耐性菌感染海狸は全臓器共陰性であった。

(II) カタラーゼ反応について

Middlebrook⁶⁾ Knox¹²⁾が最近 INAH耐性菌の毒力とカタラーゼ活性度との間に関係があると報告しているので、私は Middlebrookの原法により同様実験を行った。

実験成績は原株(H₂株)では25秒で著明な泡沫を生じたが、INAH耐性菌は2分後も泡沫を生ぜず陰性であった。

(III) 結核菌の INAH耐性獲得による免疫原性の変化の有無について

実験方法

1) 実験動物

体重500~60gmの健康海狸で、旧ツベルクリン(1/10; 0.1ml)で皮膚反応陰性なものを使用し、INAH耐性菌免疫群と感性菌免疫群の2群に分けた。

2) 免疫法

武内¹³⁾の方法により INAH耐性菌(100r/ml)及び感性菌の流パラ死菌ワクチン(1mg/ml)を作りその1ml宛を夫々各群海狸の右大腿筋肉内に注射した。

3) 喰菌現象

大山¹⁴⁾の方法により人型結核菌H₂株に対する両群免疫海狸白血球の喰菌現象を比較観察した。

4) 「ツ」感作血球凝集反応

山下¹⁵⁾の方法に準じ、旧ツベルクリン(人型菌H₂株)を感作原とし両群の抗体価を比較した。

5) 感染防禦実験

ワクチン注射後4週目にツベルクリン反応陽性なる事を確めた後、INAH感性人型結核菌H₂株(Kirchner培地に4週間浮游培養せるもの)の滅菌生理的食塩水浮游液(1mg/ml)を全海狸の左大腿内側皮下に0.1ml宛注射し、更に8週後撲殺し両群の臓器病変並に臓器内結核菌の定量培養の成績を比較した。

実験成績

1) 喰菌現象 (第5表参照)

耐性菌免疫群と感性菌免疫群のワクチン接種後4週目に於ける平均喰菌率は夫々1.50, と1.68でその間に有意の差は認められなかつた。

2) 「ツ」感作血球凝集反応 (第6表参照)

耐性菌免疫群と感性菌免疫群の凝集価は何れも32~64倍で両群の間に差は認められなかつた。

3) 感染防禦実験

耐性菌並びに感性菌免疫群に夫々4週後人型菌H₂株をもつて攻撃を行ひ、8週後に全動物撲殺剖検して比較した。その成績は次の如くである。

a) 剖検時肉眼的所見

各臓器の病変度は第7表及び図に示す如く、肝臓に於て耐性菌免疫群の方が感性菌免疫群よりも僅かに強い病変を示した以外には両群の間に著明な差は認められなかつた。

b) 臓器内結核菌培養成績 (第 8 表参照)

肺臓, 肝臓に於いては感性菌免疫群の集落発

生数は少なかつたが, 脾臓に於ては逆に耐性菌免疫群の方が少なかつた。

総 括

INAH 耐性菌の毒力について, 平野⁽⁵⁾は 50 γ 耐性菌を海狸に接種し原株感性菌と比較検討して, 後者は著明な結核性変化を来したが, 耐性株の方は殆んど変化が認められなかつたと云ひ, Steenken u. Wollinsky⁽⁴⁾ Middlebrook⁽⁶⁾も INAH 耐性菌は無毒或は弱毒であつたと云ひ, 又 G. Meissner⁽⁷⁾は INAH 治療中の患者から得た INAH 耐性菌株を海狸に 0.01mg 接種した処淋巴腺に軽度の小結核病巣を生じ, 培養上小数の集落を得たにすぎないと報告している。又 W. C. Morsl⁽⁸⁾はマウスに於ては 25 並びに 50 γ 耐性菌は剖検時肉眼的所見が幾分弱かつたと云ひ, 小酒井⁽⁹⁾も INAH 耐性菌の毒力は低下する傾向があると記載している。一方佐藤⁽¹⁶⁾は INAH 投与後の種々の時期に菌を分離し, これを 2~3 代継代して, 耐性と毒力につき検査し 10 γ /ml の耐性株でも毒力の強いものもあれば無毒のものあり, 又 0.5 γ /ml, 0.05 γ /ml に発育する感性株でも毒力の強くないもののある事を認め, 又 Conalty⁽¹⁷⁾は患者から分離した 8 株のカタラーゼ反応陰性の INAH100 γ 耐性菌でマウスと海狸に於ける毒力を調べた実験に於ては 8 株のうち 4 株はマウスに対して十分に毒力を有し, 海狸に於ても毒力が認められた。然し他の 4 株はマウス及び海狸に対し毒力は減弱していると云つている。又 A. G. Karlson 等⁽¹⁾が H₃₇Rv 株より INAH 耐性菌 (10 γ /ml) を分離しマウスの静脈内に接種し毒力を認め, H. Bloch 等⁽¹⁸⁾も INAH を 26 週間投与した 20 人の結核患者の喀痰より分離した 0.5 より 50 γ /ml に至る種々の耐性度の菌をマウスの静脈に接種したが, 20 株全部に毒力を認めたと云つている。これと同様に M. L. Cohn⁽¹⁹⁾のマウスに於ける吸入実験に於ても毒力があつたと云ひ, A. G. Karlson⁽²⁰⁾はマウスの静脈内接種と海狸の皮下接種を比較した実験に於て海

狸に対しては無毒であつたが, マウスに対しては強毒であつたと云つている。

このように INAH 耐性菌の毒力に関してはなお, 研究者に依り意見の一致をみていない。

私は INAH 100 γ 耐性菌をマウス及び海狸に接種し次の結果を得た。

マウスを使用し逐日的に観察した実験では耐性株感染群の剖検時肉眼的所見は, 1 週, 2 週及び 3 週とも結核性病変は認められず, 4 週に至つて始めて軽度乍ら病変を認めた, 然し定量培養に於ては, 1 週から 3 週まで集落数は漸次増加したが, 4 週に於ては減少を示した。原株感性菌接種群では肉眼的に 1 週にして既に軽度の病変を認め 4 週に至つて甚だ高度となり, 定量培養では経過日数に伴ひ集落数は増加した。

海狸に対する脳内接種実験では, 耐性菌感染海狸の生存日数は感性菌感染海狸よりも著明に長く, 又剖検時肉眼的所見は感性菌感染海狸に於ては, 脳, 脾に高度の病変が認められ肺, 肝及び頸部淋巴腺に於ても軽度の病変が認められたが, 耐性菌感染海狸に於ては, 脳, 肺, 肝及び脾に軽度の病変を認めたにすぎなかつた。

臓器内結核菌の定量培養に於ては感性菌感染海狸は脳, 脾より多数の集落発生を見又肺, 肝よりも少数の集落発生を見たが, 耐性菌感染海狸に於ては全臓器に於て集落の発生は見られなかつた。

以上のように INAH 耐性菌のマウス及び海狸に対する毒力は原株感性菌に比して低下している事が認められた。

Middlebrook⁽⁶⁾ Knox⁽¹²⁾等は最近 INAH 耐性菌の毒力とカタラーゼ反応との関係に着目し, INAH 感性菌ではカタラーゼ反応陽性, 耐性菌では陰性を示し, それが海狸に対し無毒化していることから無毒化結核菌とカタラーゼ反応との間に相関関係があると云つている。

又小坂等⁽²¹⁾も INAH 感性菌はすべて陽性を示し、INAH 耐性低下を示した株は陽性を示すものが多かつたが、耐性度を持続した株には陰性を示すものが多かつたと云っている。Knox は INAH 耐性度とカタラーゼ活性度との関係について研究し、 10γ 以上の耐性株ではカタラーゼ活性は消失していると述べている。私の実験に於ても INAH 耐性菌のカタラーゼ反応は陰性であつた。

結 論

INAH 耐性菌のマウス及び海猿に対する毒力と免疫原性について原株感性菌と比較検討し次のような結果を得た。

- 1) INAH 100γ 耐性人型結核菌 H_2 株のマウス及び海猿に対する毒力は原 H_2 株より弱わかつた。
- 2) カタラーゼ反応は原株感性菌では陽性であ

INAH 耐性獲得と免疫原性との関係を比較検討するため、耐性菌並びに感性菌流パラ死菌ワクチンを注射した両群海猿に於ける INAH 感性結核菌に対する喰菌現象「ツ」感作血球凝集反応及び感染防禦能により両ワクチンの免疫原性を比較した結果耐性菌の免疫原性が原株感性菌のそれと明かに異なると云ふ成績は得られなかつた。

つたが、INAH 耐性菌では陰性であつた。

- 3) INAH 耐性菌流パラ死菌ワクチンをもつて免疫された海猿と原株流パラ死菌ワクチンをもつて免疫された海猿の間には、「ツ」感作血球凝集反応、INAH 感性人型菌 H_2 株に対する喰菌現象並びに感染防禦能に於て有意の差を認める事が出来なかつた。

文 献

- 1) Karlson, A. G. : Proc. Stabb. Meet. Mayo Clinic, 27 (19), 273, 1952.
- 2) Goulding, et al. : Lancet, 69, 1952.
- 3) Barnett, et al. : Lancet, 314, 1952.
- 4) Steenken u. Wollinsky : Am. Rev. Tuberc., 68 (6), 548, 1953.
- 5) 平野憲正, 他 : 東京医事新誌, 70 (7), 19, 1953.
- 6) Middlebrook : Am. Rev. Tuberc., 69 (3), 471, 1954.
- 7) Meissner, G. : Beitr. klin. Tub., 110 (6), 538, 1954.
- 8) Morse, W. C., et al. : Am. Rev. Tuberc., 69 (3), 464, 1954.
- 9) 小酒井望 : 結核診療, 7 (3), 133, 1954.
- 10) 小川辰次 : 結核菌検索の基礎と応用, 194.
- 11) 渡辺喜海 : 結核, 18 (12), 1090, 1954.

- 12) Knox, R., et al. : Am. Rev. Tuberc., 73 (5), 726, 1956.
- 13) 武内 修 : 金大結研年報, 12 (上), 129, 1954.
- 14) 大山 鑿 : 金大結研年報, 8 (上), 121, 1949.
- 15) 山下文雄 : 金大結研年報, 12 (上), 153, 1954.
- 16) 佐藤直行 : 結核, 30 (5), 31, 1955.
- 17) Conalty : Am. Rev. Tuberc., 71 (6), 799, 1955.
- 18) Bloch, H., et al. : Am. Rev. Tuberc., 69 (3), 464, 1953.
- 19) Cohn, M. L. : Am. Rev. Tuberc., 70 (4), 641, 1954.
- 20) Karlson, A. G. : Proc. stobb. Meet. Mayo Clinic, 29, 124, 1954.
- 21) 小坂久夫 : 医療, 10 (4), 12, 1956.

第1表 結核菌感染マウスの剖検時肉眼的所見

感染株	動物 臓器	週							
		1 週		2 週		3 週		4 週	
		1	2	3	4	5	6	7	8
※ 耐 性 菌	肺	-	-	-	-	-	-	-	-
	肝	-	-	-	±	-	-	+	+
	脾	-	-	-	-	-	-	±	+
	腎	-	-	-	-	-	-	-	-
※※ 感 染 菌	肺	-	-	+	±	+	+	+	-
	肝	±	±	+	-	-	+	±	+
	脾	++	+	++	-	-	++	+++	++
	腎	-	-	-	-	-	-	-	-

註：※ 耐性菌 INAH 100r 耐性 H₂ 株

※※ 感性菌 H₂ 株

+ は結節を認めた程度を示す。

第2表 結核菌感染マウスの定量培養成績

感染株	試験管 臓器	週																								
		1 週						2 週						3 週						4 週						
		1	2	3	4	5	平均	1	2	3	4	5	平均	1	2	3	4	5	平均	1	2	3	4	5	平均	
耐 性 菌	肺	0	2	0	3	0	1	240	288	234	160	146	214	23	32	54	45	48	40.4	C	300	<300	<300	<300	<300	<300
	肝	135	115	113	250	107	144	118	129	154	112	157	134	250	280	300	<300	<250	276	14	15	12	26	25	18.4	
	脾	194	205	166	220	134	184	240	210	250	270	260	246	300	<300	<300	<300	<300	<300	77	120	C	110	116	106	
	腎	0	1	0	C	1	0.5	2	9	5	3	3	4.4	19	6	16	14	18	14.6	0	0	0	0	0	0	
感 性 菌	肺	0	C	2	0	5	1.8	250	300	<280	300	<300	<286	300	<300	<300	<300	<300	<300	300	<300	<300	<300	<300	<300	
	肝	13	31	C	14	25	20.8	136	150	170	135	180	154	300	<300	<300	<300	<300	<300	300	<300	<300	<300	<300	<300	
	脾	51	58	53	43	79	56.8	300	<300	<300	<300	<300	<300	300	<300	<300	<300	<300	<300	300	<300	<300	<300	<300	<300	
	腎	0	0	0	0	0	0	0	57	72	0	0	25.8	27	31	10	37	36	28.2	23	57	25	70	18	38.6	

第3表 結核菌感染海猿の剖検時肉眼的所見（脳内接種法）

感染群別	動物番号	体 重			ツ 反 応		生 存 日 数	淋 巴 腺					臓 器			
		感 染 前	解 剖 迄	の 増 減	感 染 前	解 剖 前		膵 膵 腺	腸 間 膜	腋 下	気 管 枝	頸 部	肺 臓	肝 臓	脾 臓	脳
感性菌群	1	480	-	20	0		22	-	-	-	-	-	+	+	+	++
	2	610	-	85	0		22	-	-	-	-	+	+	++	++	
耐性菌群	3	650	+	120	0	18×17	56	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	4	670	+	80	0	20×18	56	-	-	-	-	-	+	-	+	++
	5	270	+	130	0	15×18	56	-	-	-	-	-	+	+	+	+

第4表 結核菌感染海猿の定量培養

群別	臓器名 試験管番号 動物番号	脳				肺				脾				肝				
		1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	
耐性菌	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
感性菌	4	300	<300	<300	<300	2	C	1	1.5	300	<300	<300	<300	33	26	29	29.3	
	5	300	<300	<300	<300	0	14	1	5	300	<300	<300	<300	12	5	14	10.1	

第5表 結核菌免疫海猿の喰菌現象成績

群別	動物番号	ワクチン 接 種 前				ワクチン 接 種 後 4 週			
		喰 菌 数	被喰菌数	平 均 喰 菌 数	喰 菌 率	喰 菌 数	被喰菌数	平 均 喰 菌 数	喰 菌 率
耐性菌免疫群	1	17	38	0.38	1.0	27	42	0.42	1.11
	2	20	41	0.41	1.0	31	51	0.51	1.24
	3	11	31	0.31	1.0	25	39	0.39	1.26
	4	13	21	0.21	1.0	31	50	0.50	2.38
平 均		15.3	32.8	0.328	1.0	28.5	45.5	0.455	1.50
感性菌免疫群	1	18	32	0.32	1.0	28	40	0.40	1.25
	2	7	14	0.14	1.0	25	38	0.38	2.71
	3	10	24	0.24	1.0	23	35	0.35	1.45
	4	8	20	0.20	1.0	22	42	0.42	2.10
	5	15	38	0.38	1.0	21	33	0.33	0.87
平 均		11.6	25.6	0.256	1.0	23.8	37.6	0.376	1.68

第6表 結核菌免疫海狸の結核血球凝集反応

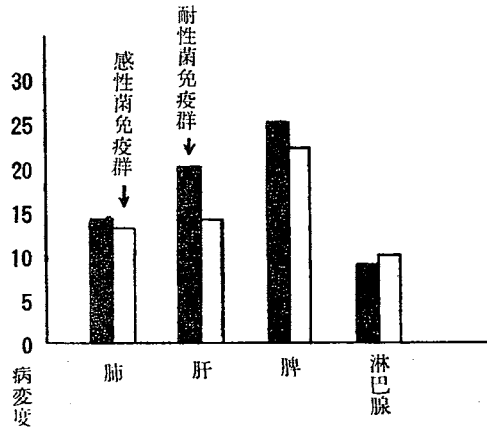
群別	稀釈倍数	ワクチン接種前		ワクチン接種4週後										
		2×	4×	8×	対照	2×	4×	8×	16×	32×	64×	128×	256×	対照
耐性菌免疫群	1	+	±	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
	2	+	-	-	-	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
	3	+	±	-	-	+++	+++	++	++	+	±	-	-	-
	4	+	-	-	-	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
感性菌免疫群	5	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-
	6	++	±	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-

第7表 結核菌免疫海狸に対し有毒菌感染後の剖検時肉眼的所見

免疫群別	動物番号	体重		ツ反応		生存日数	淋 巴 腺												臓 器						
		感染前	増殖の減	感染前	解剖前		深頸腺		浅頸腺		仙骨部	腸間膜	肝門部	腋 下		気管支	浅頸部		深頸部		肺 臓	肝 臓	腎 臓		
							右	左	右	左				右	左		右	左	右	左					
耐性菌免疫群	1	720	+	40	0	18×20	56	-	+	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	+	+	-	+	
	2	650	+	20	0	15×17	56	-	±	-	±	±	+	++	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-	++
	3	640	+	90	0	15×20	56	-	±	-	±	±	±	±	+	-	-	-	-	-	+	±	-	±	
	4	660	-	20	0	18×18	56	-	±	-	++	+	-	++	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-	±
感性菌免疫群	5	520	+	135	0	20×19	56	±	+	-	±	+	-	±	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-	±
	6	640	+	100	0	15×15	56	-	+	-	±	±	±	±	-	-	±	-	-	-	-	±	+	-	±
	7	550	+	10	0	16×20	56	±	+	±	±	±	-	±	-	-	±	-	-	-	+	±	-	±	
	8	600	-	90	0	14×15	56	-	+	+	++	++	-	++	-	++	±	-	-	-	±	±	-	±	
	9	660	-	20	0	18×17	56	-	++	±	++	++	-	±	-	-	±	±	-	-	-	++	+	-	±

註 C : 乾酪化を示す * : 空洞あり

剖検時に於ける病変度の比較



第 8 表 結核菌免疫海狸に対し生菌感染後の定量培養成績

群別	臓器名 試験管番号 動物番号	肺				肝				脾				腎				
		1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	
耐性菌免疫群	1	83	95	0	59.3	C	21	30	25.5	70	90	0	53.3	0	0	0	0	
	2	23	0	44	22.3	C	50	0	25	0	0	3	1	0	0	0	0	
	3	C	0	0	0	0	2	0	0.7	0	7	10	5.7	0	3	0	1	
	4	0	300	<0	100<	20	0	C	10	300	<300	<300	<300	300	0	0	0	0
平均				45.4<				15.3				90<					0.3	
感性菌免疫群	5	0	0	0	0	0	0	2	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	2	5	0	2.3	3	4	4	3.7	90	99	111	100	0	0	0	0	
	7	18	13	36	22.3	30	23	0	17.7	300	<300	<300	<300	300	0	0	0	0
	8	120	13	0	44.3	18	17	20	18.3	300	<300	<300	<300	300	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	49	38	39	42	0	0	0	0	
平均				13.8				8.1				148.4<					0	