

細菌の薬剤耐性に関する研究

第 4 報

Streptomycin 又は Isonicotinic acid hydrazide

耐性結核菌の海狸に対する毒力に関する研究

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

早 川 晋

（受付：昭和31年3月16日）

緒 言

Streptomycin (SM) 又は Isonicotinic acid hydrazide (INAH) に対し結核菌は容易に耐性を獲得するが、それと同時に、菌力が変化（減弱或いは上昇）するか否かは今日の処未だ明らかでない。即ち菌の耐性度、接種量、実験動物及びその感染方法、実験期間等の種々の因子に左右され、毒力に就いて検討された成績は必ずしも一致をみず区々である。染谷¹⁾の云う

「所謂毒力とは生体内で増殖して病巣を作る能力である」との見地から、前報²⁾³⁾の実験に供した SM 又は INAH 耐性結核菌 H₂ 株を海狸に接種し、一定期間後剖検し、各臓器の肉眼的、病理組織学的所見を観察すると共に臓器内に於ける菌とその耐性分布状態を観察し、原株（感性人型菌 H₂ 株）に依るそれ等と比較検討した。以下その成績を報告する。

実 験 方 法

1. 実験動物

100 倍旧ツベルクリン（以下旧ツ）で皮内反応陰性の体重 400gm 前後の海狸を 1 菌株に 6 頭ずつを使用した。

2. 接種菌株及び感染方法

- a) 感性人型結核菌 H₂ 株（原株）
- b) SM 耐性人型結核菌 H₂ 株 (10,000 r/ml)
原株を SM 含有 Kirchner 培地で 7 代継代
- c) INAH 耐性人型結核菌 H₂ 株 (100 r/ml)
原株を INAH 含有 Kirchner 培地で 4 代継代

以上 3 株を「グリセリン・馬鈴薯」培地に移植し 2～3 週後の発育良好な菌苔を採取、滅菌濾紙を以つて可及的に水分を除去して秤量し、瑪嚙乳鉢を用い、滅菌生理的食塩水を以つて磨碎し、5mg/ml の均等浮游菌液を作製し、夫々 0.1 ml (菌量 0.5 mg) を各群海狸の右大腿内側皮下に接種した。感染後 2 週目に 10 倍

旧ツ液を用い Römer 反応陽転を確めた。

3. 剖 検

感染後 4 週及び 7 週目に各群より 3 頭宛を撲殺し剖検、肉眼的に各臓器並びに淋巴腺の病変度を観察すると共に、肺臓、肝臓、脾臓の一部を 10% フォルマリン水で固定後組織標本作製し、その病理組織学的所見を比較検討した。

4. 定量培養

各海狸の肺臓、肝臓、腎臓、脾臓に就いてその一定部位を 0.2 gm 宛切り、小川の方法⁴⁾に依り 1% NaOH 水 2 ml を以て磨細均等化し、その 0.1 ml を夫々 1% KH₂PO₄ 培地 (SM 耐性 H₂ 株感染群では 10,000 r, 1,000 r, 100 r, 10 r, 3 r, 0 r/ml SM 加, INAH 耐性 H₂ 株感染群では 100 r, 10 r, 1 r, 0.1 r, 0 r/ml INAH 加) に接種し、37°C で 5 週間観察し、その集落発生数から SM 又は INAH の耐性分布を比較した。

実 験 成 績

病変の軽重は感性人型結核菌 H_2 株感染群と比較し、次の成績を得た。

1. 肉眼的所見：

各臓器の平均病変度は第1, 2表に示した通りである。

a) 肺臓 4週及び7週群共に INAH 耐性菌感染群では明かに強い病変を示したが、SM 耐性菌感染群では原株との間に著差を認めなかつた。亦肺門部リンパ腺の病変度は感染菌株に依り差を示さなかつた。

b) 肝臓 4週及び7週群共に 両耐性菌感染群では病変弱く、特に7週群の INAH 耐性菌感染群では病変極めて軽度であつた。

c) 脾臓 4週群では SM 耐性菌感染群は原株とほぼ同等、INAH 耐性菌感染群は稍弱い病変度を示した。7週群では SM 耐性菌感染群は稍病変強く、INAH 耐性菌感染群では大体原株と同等であつた。総体的に脾臓は各臓器中で最も著しい病変を示し、結節形成は著明であつた。

d) 所属リンパ腺 (右鼠蹊部)

4週群の浅部リンパ腺の病変は INAH 耐性菌感染群では強く、SM 耐性菌感染群では原株と殆んど同等であつた。深部リンパ腺の病変は感染菌株に依り差を認めなかつた。7週群の浅部リンパ腺病変は SM 耐性菌感染群では非常に強く、INAH 耐性菌感染群では原株より稍強かつた。深部リンパ腺病変は SM 耐性菌感染群のみに僅かに認められたに過ぎなかつた。

e) 各臓器の平均重量の比較

肝臓及び脾臓共に感染菌株、感染期間の如何に依り著明な差は認められなかつたが、INAH 耐性菌感染群の肝臓は4週及び7週群共に大きく、脾臓は4週群に於て稍大きかつた。亦 INAH 耐性菌感染7週群は体重増加率も著しかつた (第3表参照)。

2. 病理組織学的所見：

第4表に示す通りであるが、主要所見を比較すると、円形上皮細胞浸潤は全体を通じて認められたが、その程度は肺臓では4週群で

INAH 耐性菌感染群 > 対照群 > SM 耐性菌感染群、7週群で 対照群 > SM 耐性菌感染群 = INAH 耐性菌感染群の順であり、肝臓では4週群で肺臓のそれと同様の関係を示し、7週群では 対照群 = INAH 耐性菌感染群 > SM 耐性菌感染群の順を示した。類上皮細胞変性の程度は4週群の肺臓及び7週群の脾臓を除きその他では対照群 > SM 耐性菌感染群 > INAH 耐性菌感染群の関係が共通して認められた。脾臓に於ける類上皮細胞変性は SM 耐性菌感染7週群に於て特に著明であつた。ラ氏巨細胞の出現は概して肝臓に多く見られ、対照群 > INAH 耐性菌感染群 > SM 耐性菌感染群の順であつた。乾酪性変性は著明でなく、INAH 耐性菌感染群の肝臓 (4週群)、SM 耐性菌感染群の肝臓 (7週群) 及び脾臓 (4, 7週群) に僅かに認められたに過ぎなかつた。線維芽細胞は大体 SM 耐性菌感染群 > INAH 耐性菌感染群 > 対照群 の関係にあつた。

3. 定量培養成績：

第6表に示す如く、

a) 4週群 SM 耐性菌感染群では肺臓 (No. 3のみ) 肝臓、脾臓から相当数の集落発生を認め、各量の SM 含有培地と SM 非含有培地とに於ける集落発生数を比較しても著差を示さなかつた。INAH 耐性菌感染群では肝臓、脾臓から集落発生を認め、0.1 γ /ml 含有培地では INAH 非含有培地とほぼ等しかつたが、1.0 γ /ml 含有培地では稍少く、10~100 γ /ml 含有培地では極めて少数か全然認められないものもあつた。かくて SM 又は INAH 耐性菌感染群と感性 H_2 株感染群との臓器培養成績に於ける菌の発生集落数は H_2 株 > SM 耐性株 > INAH 耐性株の順を示した。

b) 7週群 SM 耐性菌感染群では4週群と比較すると少いが肝臓、脾臓から集落発生を認め、各量の SM 含有培地と SM 非含有培地とに於ける集落発生数を比較すると、10~1,000 γ /ml 含有培地では SM 非含有培地とほぼ同程度であ

つたが、10,000 γ /ml 含有培地では各海猿とも集落発生は極く少いか全然認められず SM 非含有培地と比較して集落発生は少なかった。INAH 耐性菌感染群では肺臓、肝臓、脾臓から集落発生を認め、各量の INAH 含有培地での集落発生の状態は 4 週群に於けるとほぼ同様の成績を示した。かくて SM 又は INAH 耐性菌感

染群と原株 H_2 株感染群との臓器培養成績に於ける菌の発生集落数は H_2 株 > SM 耐性株 = INAH 耐性株 の順を示した。

又第 5 表に示した動物通過前の耐性分布状態と通過後のそれとを比較するとき、4, 7 週群共に海猿皮下接種に依つて菌の耐性度 (株に高度耐性) の減弱化が認められた様に思う。

考 按

SM 耐性結核菌の毒力に関し、Karison⁹⁾等は耐性菌感染海猿が感受性菌感染海猿より長く生存する事を観察し、耐性菌の毒力は感性菌に比し低いと発表し、松田⁶⁾は耐性菌接種海猿の生存期間の比較、肉眼的、病理組織学的所見及び定量培量成績から菌力の低下を報告している。橋本⁷⁾も海猿で内臓、淋巴腺の結核性病変、臓器培養の所見を比較し耐性菌の菌力の低下は明瞭であるとしているのに対し、村田⁸⁾は同一患者から分離した 2 株 (SM 1 γ 及び 1,000 γ 耐性株) 共に互に毒力に差があり、耐性獲得と同時に毒力が種々に変化する事を認め、小酒井⁹⁾は海猿の脳内接種法に依り SM 治療前の感受性菌と治療後の耐性菌を比較して毒力に差を認めなかつたと報告している。本実験では上述の成績に依り明かな如く、本供試株は原株に比し稍劣るも尙毒力を有しており、肝臓、脾臓に於ては SM 10,000 γ /ml 耐性菌を証明出来た事は注目し値すると考える。

INAH 耐性結核菌の毒力に関し、ハツカネズミを用いた実験では Morse¹⁰⁾、Block 等¹¹⁾、佐藤¹²⁾¹³⁾等は静注法に依り毒力の低下を認めず、感受性菌とほぼ同等の菌力を示したと報告した。海猿の皮下接種実験では Morse, W.C.¹⁰⁾、Karison¹⁴⁾、Steenken¹⁵⁾、Mitchison¹⁶⁾、金井¹⁷⁾、平野¹⁸⁾等は INAH 耐性菌の著明な菌力低下乃至消失を認めているが、Peizer 等¹⁹⁾は進行性病変を起した事を指摘し、宮本・上野²⁰⁾は中等度の毒力を示した事を述べ、又佐藤²¹⁾は相当強い菌力を示す株がある事を報告している。以上の如く全然相反する成績は恐らく実験方法、菌株の相違等に原因するものと考えられる。本実験に於ける定量培養成績及び肉眼的・病理組織学的所見を総合すると、SM 及び INAH 耐性菌は海猿に対し原株に比して弱くはあるが可なりの毒力を保持し、その毒力は原株 (人型 H_2 株) > SM 耐性 H_2 株 > INAH 耐性 H_2 株 の順にあるものと推察された。

結 論

SM 又は INAH 加 Kirchner 培地を用い、継代培養に依り得た SM 又は INAH 耐性人型結核菌 H_2 株を海猿の皮下に接種し、一定期間後剖検し、臓器の肉眼的並びに病理組織学的検索、臓器内結核菌の定量培養を行い、その毒力

に就いて検討した結果、

SM 及び INAH 耐性菌共に海猿に対し可なり毒力を保持し、その強さは H_2 株 > SM 耐性 H_2 株 > INAH 耐性 H_2 株 の順であつた。

文 献

1) 染谷四郎, 他: 結核, 26 (1), 24, 1951. 2) 早川晋: 金大結研年報, 13 (中), 123; 131,

1955. 3) 早川, 英: 金大結研年報, 14 (上) 印刷中, 1956. 4) 小川辰次: 結核菌検索

の基礎と応用, 112, 1953. 5) Karlson, A. G.: Brit. Med. Jour., 1009, 1948. 6) 松田知夫: 金大結研年報, 12 (下), 17, 1954. 7) 橋本達一郎: 結核, 29 (10), 383, 1954. 8) 村田太郎: 結核, 28 (9), 453, 1953. 9) 小酒井望他: 医学と生物学, 19 (2), 93, 1951. 10) Morse, W. C. et al.: Am. Rev. Tbc., 69, 464, 1954. 11) Bloch, H. et al.: Am. Rev. Tbc., 68, 734, 1953. 12) 佐藤直行: 結核, 30 (8), 455, 1955. 13) 佐藤直行: 医学と生物学, 29 (1), 14, 1953. 14)

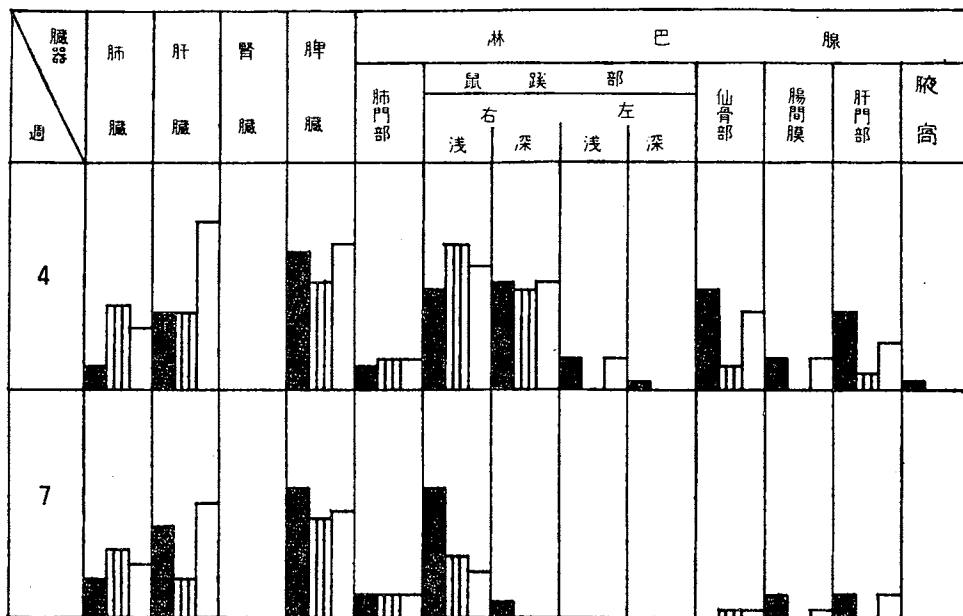
Karlson A.G.: Am. Rev. Tbc., 68, 548, 1954. 15) Steenken, W. et al.: Am. Rev. Tbc., 68, 548, 1953. 16) Mitchison, D. A.: Brit. Med. Jour., 4854, 128, 1954. 17) 金井与美: 医学と生物学, 35 (3), 105, 1955. 18) 平野憲正他: 東京医事新誌, 70 (7), 371, 1953. 19) Peizer, L. R. et al.: Am. Rev. Tbc., 68, 290, 1953. 20) 宮本, 上野: 結核, 30 (11), 659, 1955. 21) 佐藤直行: 結核, 30 (5), 247, 1955.

第1表 各海猿の肉眼的所見

菌種	感染 (W)	ツ 反 応 No.	臓器 10x	肺	肺門 淋巴 腺	肝	腎	脾	鼠		蹊		仙 骨	腸 間	肝 門	腋窩		頸 部	
									右		左					右	左		
									浅	深	浅	深							
									浅	深	浅	深				右	左		
SM 耐性 H ₂ 株 0.5mg	4	1	16x14	+	+	-	-	+	+	÷c	+	+	+	+	+	-	-	-	
		2	8x7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
		3	12x10	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
	7	4	13x11	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
		5	15x13	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
		6	16x14	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
INAH 耐性 H ₂ 株 0.5mg	4	7	12x10	+	+	+	-	+	c+ _{米1}	c++ _{米1}	-	-	+	-	+	-	-	-	
		8	14x13	+	+	+	-	+	cH _{大豆1}	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
		9	16x14	+	+	+	-	+	cH _{小豆1}	c+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	10	11x10	+	+	-	-	+	c+ _{米1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		11	12x11	+	+	+	-	+	c+ _{米1}	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
		12	12x10	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H ₂ 株 0.5mg	4	13	11x11	+	+	+	-	+	+	c+	-	-	-	+	+	-	-	-	
		14	13x12	+	+	+	-	+	+	c+	+	-	+	+	-	-	-	-	
		15	18x15	+	+	-	-	+	+	c+	+	-	+	+	-	-	-	-	
	7	16	10x10	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		17	13x12	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		18	8x7	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	

c: 乾酪化

第2表 肉眼的所見(平均病変度)



註:
 ■ SM耐性H₂株 感染群
 ▨ INAH " "
 □ 感性 H₂株 "

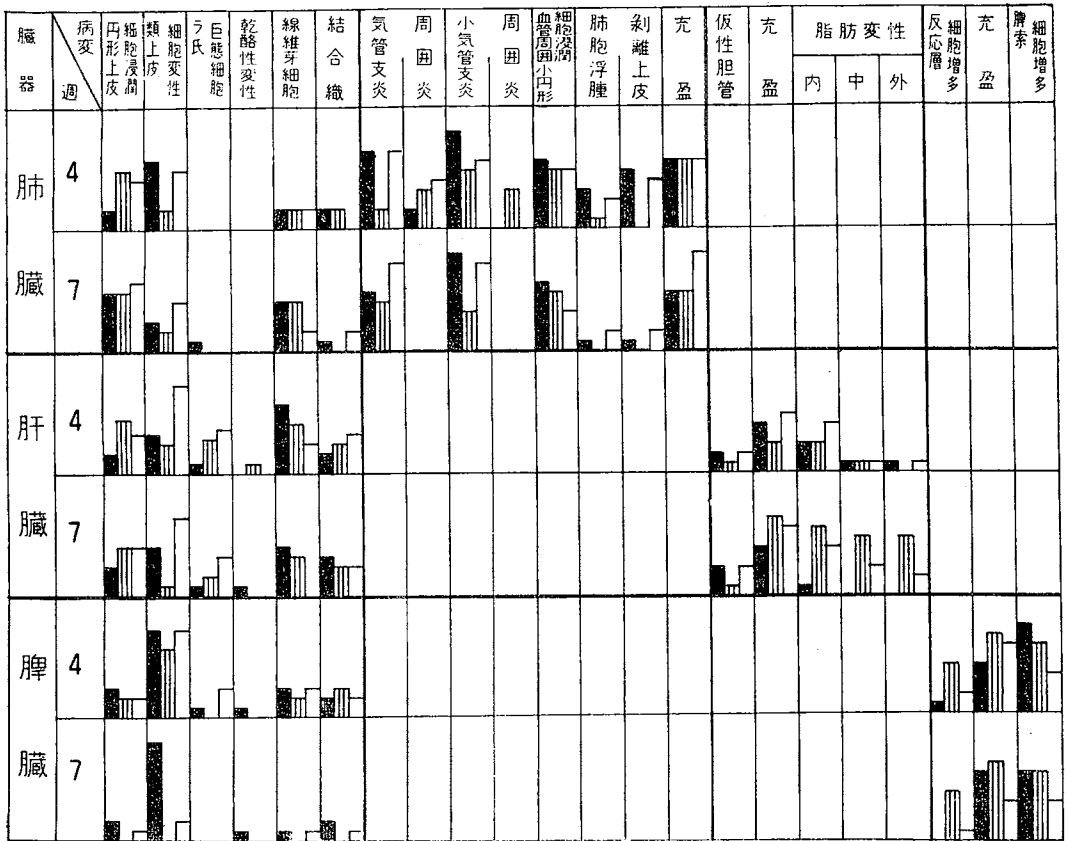
第3表 海猿各臓器平均重量の比較

菌 株	感染期間 (W)		
	4	7	
SM 耐性 H ₂ 株	体重	465.0 (12.0%) [*]	496.0 (6.6%)
	肺	8.26 (1.70) [※]	5.5 (1.10)
	肝	18.3 (3.93)	17.2 (3.47)
	腎	2.4 (0.51)	2.8 (0.56)
	脾	1.07 (0.23)	1.1 (0.22)
INAH 耐性 H ₂ 株	体重	493.3 (2.7%)	615.3 (44.3%)
	肺	5.93 (1.20)	6.26 (1.01)
	肝	21.4 (4.34)	31.4 (5.10)
	腎	2.56 (0.52)	2.80 (0.45)
	脾	1.56 (0.31)	1.33 (0.22)
H ₂ 株	体重	490.0 (0.4%)	495.0 (28.5%)
	肺	8.33 (1.70)	5.6 (1.13)
	肝	18.8 (3.84)	22.3 (4.51)
	腎	2.51 (0.51)	2.78 (0.56)
	脾	0.91 (0.18)	1.09 (0.22)

* 感染時体重に対する増加率を表はす

※ 撲殺時体重に対する%を表はす

第4表 病理組織学的所見



第5表 動物通過前の耐性分布

菌 種	薬剤含有量	集 落 数
S M 耐 性	SM 10.000 γ /ml	154 (76.1)※
	1000 "	192 (90.9)
	100 "	201 (95.2)
	10 "	204 (96.6)
H ₂ 株	Control	211
INAH 耐 性	INAH 100 γ /ml	19 (21.3)
	10 "	65 (72.0)
	1.0 "	80 (89.8)
	0.1 "	84 (94.3)
H ₂ 株	Control	89

註：菌液 1 mg/ml 0.05 ml
 1% KH₂PO₄ 培地
 ※ Control に対する %

表 6 臓器定量培養所見

(a) 4 W. 撲殺群

菌株		海猿 No.	1		2		3							
			臓器	肺	肝	腎	脾	肺	肝	腎	脾			
S M 耐性 H ₂ 株	薬剤	SM 10,000 γ /ml	0	41	0	86	0	4	0	130	2	35	0	154
		1,000	0	45	0	96	0	3	0	137	2	35	0	192
		100	0	40	0	93	0	6	0	141	3	45	0	157
		10	0	46	0	101	0	8	0	147	5	42	0	201
		Control	0	49	0	113	0	19	0	153	8	58	0	204
INAH 耐性 H ₂ 株	薬剤	No.	7		8		9							
		INAH 100 γ /ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
		10	0	14	0	1	0	0	0	0	0	14	0	9
		1.0	0	17	0	4	0	25	0	11	0	23	0	9
		0.1	0	53	0	14	0	55	0	9	0	26	0	17
	Control	0	73	0	14	0	59	0	14	0	32	0	19	
H ₂ 株		No.	13		14		15							
			16	84	0	21	0	∞	0	47	13	∞	0	∞

(b) 7 W. 撲殺群

菌株		海猿 No.	4		5		6							
			臓器	肺	肝	腎	脾	肺	肝	腎	脾			
S M 耐性 H ₂ 株	薬剤	SM 10,000 γ /ml	0	1	0	5	0	0	0	0	0	14	0	5
		1,000	0	4	0	8	0	6	0	42	0	28	0	26
		100	0	5	0	14	0	12	0	40	0	31	0	27
		10	0	8	0	11	0	15	0	43	0	38	0	35
		Control	0	11	0	18	0	25	0	64	0	49	0	43
INAH 耐性 H ₂ 株	薬剤	No.	10		11		12							
		INAH 100 γ /ml	0	11	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		10	3	26	0	4	0	7	0	23	0	14	0	33
		1.0	7	41	0	9	0	12	0	29	1	12	0	29
		0.1	14	48	0	11	0	13	0	47	4	16	0	37
	Control	17	56	0	15	0	17	0	51	7	23	0	46	
H ₂ 株		No.	16		17		18							
			58	∞	0	48	0	∞	0	∞	0	∞	0	∞