

洗滌結核菌のクエン酸溶液中 Tuberculin 産生現象に関する研究

第 5 報

Isonicotinic acid Hydrazide 耐性結核菌の Citrate-Tuberculin 産生に就いて

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤亮教授）

今	城	昭	雄
藤	原	紫	朗
野	田	敏	夫
清	水	嗣	郎

（受付：昭和 30 年 9 月 23 日）

緒 言

Tuberculin (「T」) に関する従来の研究は凡て結核菌を諸種の培地に長期間培養して得た培養濾液即ち Old Tuberculin か、或は物理的又は化学的方法を以て破壊した結核菌体の抽出液を原料としているのであるが、何れの場合に於ても原「T」液は、「T」活性物質以外に幾多の夾雑物を含んだ甚だ複雑な組成をもつものである事が、「T」研究の至難性の最大原因となつて

いるのである。
然るに、最近当研究所伊藤教授¹⁾によつて、“十分に洗滌した結核菌体をクエン酸の中性溶液中に沈漬せしめるだけで Tuberculin 活性物質（之を Citrate-Tuberculin [CIT] と仮称する）の大量産生が迅速に起る”という事が発見され、爾来本現象に基いて考査が進められた結果、

1) 洗滌結核菌のクエン酸溶液中に於ける「T」産生が種々の条件に因つて左右されること¹⁾、

2) 抗結核剤は凡て Citrate-Tuberculin (CI

T) 産生に対し些の影響をも及ぼさないが、ある種の薬物（例えば HgCl_2 , AgNO_3 , Formalin 等）は CIT 産生に対し強力な抑制的效果を示すこと²⁾、

3) Citrate-Tuberculin の理化学的性状³⁾、等の重要事項が確定せられ、茲に Citrate-Tuberculin は、「T」活性因子の本態究明並びにその Biosynthesis 機序の究明等の研究の原料としては、培地成分、菌代謝産物、菌体成分等の夾雑物の混在する慮れない点で好個無類のものである事がわかり、「T」研究面に一新生面の展開が期待されるに至つたのである。

結核菌の CIT 産生能が菌株によつて顕著に異なるものである事はさきに伊藤教授¹⁾によつて指摘せられた処であるが、今城⁴⁾は Streptomycin (STM) 耐性菌株の CIT 産生能に就いての検索に於て、元来 CIT の良産生菌株である人型結核菌青山 B 株が一旦 STM に対し抵抗性を獲得 (in vitro) するに至ると CIT 産生能の低下を来すという興味ある結果を報告した。

今回は、私等が引き続き青山 B 株に就いて、その Isonicotinic acid hydrazide (INH) 耐性獲

得が CIT 産生能に及ぼす影響関係を吟味検討して得た成績を報告する。

実験方法

前回報告の方法⁴⁾に準じたのであるが、INH 耐性結核菌の Sauton 培地上での培養は甚だ至難であるので、本研究では家兎血清を 5% に添加した Sauton 培地を使用した。即ち実験術式は次の如くである。

1) 菌株

- a) INH 感受性菌株：母菌株は教室保存の人型結核菌青山 B 株を使用した。本菌に対する INH の最少発育阻止濃度は 10% 家兎血清加 Kirchner 培地を使用した場合約 1 γ /ml であった。
- b) INH 耐性菌株：試験管内菌発育阻止試験の術式により、10% 家兎血清加 Kirchner 培地を以て INH の倍数稀釈液列をつくり、之に母菌株の菌液を滴加して 37°C の孵卵器内に置く。約 4 週間後に著明な菌発育を認めた試験管の中で、INH 最低稀釈液の試験管から菌液をつくり前と同様菌発育阻止実験を行う。この様にして INH 含有 Kirchner メヂウム内での培養試験を累ねること 7 代で遂に INH 50 γ /ml 含有のメヂウムでも尙旺盛に発育する INH 抵抗性菌株が分離された。次いでこの INH 耐性菌株を INH 10 γ /ml 含有の 5% 家兎血清加 Sauton 培地上に移植して継代培養を行い菌株を保有した。

2) Citrate-Tuberculin 産生実験

上記青山 B 株の INH 感受性株及びその INH 耐

性変異株を夫々多数の 5% 家兎血清加 Sauton 培地 (100 ml コルペンにメヂウム 50 ml 宛を分注したもの) に一齊に移植し、37°C の孵卵器に納める。一定日時培養後、夫々のコルペン列から 1 又は 2 ケ宛取り出し CIT 産生実験に供した。：先ず培養液を傾注した後、菌体を滅菌蒸留水で 3 回洗滌する。次いで洗滌菌体を 20 ml の 0.1 M クエン酸溶液 (NaOH で中性としたもの) 中に沈漬せしめ 37°C の孵卵器内に一昼夜静置する。最後にクエン酸溶液を傾注によつて菌体と分ち、Seitz 濾過板を通過せしめれば Citrate-Tuberculin が得られる。一方菌体を分離した培養液も夫々 Seitz 濾過板を通過せしめた後、皮膚反応力検査に供用した。菌体は最後に加熱殺菌し、洗滌後濾紙で可及的水分を吸除し秤量した。尙両菌株の 5% 家兎血清加 Sauton 培地上での発育状態には肉眼的に差異が認められなかつた。(第 1 表菌量参照)

3) 「T」反応検査

被検「T」液の「T」活性検査には結核海狸 (人型結核菌 H₂ 株 0.1 mg 接種) に対する「T」皮膚反応試験法を用いた。即ち 2 つの「T」標本に於て「T」活性の比較試験を行う場合、各被検液の種々の稀釈液 0.1 ml を同一動物の側腹部に夫々皮内注射し、24 及び 48 時間目に皮膚反応 (発赤浸潤) の大きさを測定した。

実験成績

第 1 表は人型結核菌青山 B 株の INH 感受性母菌株とその INH 耐性変異株とを以て行つた Citrate-Tuberculin 産生についての比較実験の中から 4 例を抜取し、それ等の実験成績を一括表示したものである。

即ち INH 感受性菌株では、洗滌菌体をクエン酸溶液中に一昼夜沈漬せしめて得た CIT は何れも強力な皮膚反応惹起力を示し、その 1:50 ~ 1:200 倍稀釈液は結核海狸に対しすべて定

型的「T」皮膚反応を惹起せしめ得た。

一方 INH 耐性菌株から得た CIT 標本では、実験例 No. 1 及び 3 の如く対照の INH 感受性菌株 CIT 標本の「T」反応力に比し幾分劣るところを示すものもあつたが、他方 No. 2 及び 4 例の如く対照 CIT 標本と同等或はむしろ優る活性を示すものもあつて、両菌株の CIT 産生能の間には前回 STM 耐性菌株に於て実証された如き顕著な差異は認められなかつた。尙原培養

濾液に就いて行つた皮膚反応力検査でも INH 耐性菌株培養濾液は感受性菌株培養濾液と同等

の活性を有することが実証された。

考

周知の如く、結核菌の薬剤抵抗性獲得現象に就いては是が唯に化学療法の研究分野のみならず、細菌学、生化学、遺伝学、衛生学等生物学のあらゆる分野に深大な関連性をもつ問題として多数の研究者の注目の的となつていゝところであつて^{5,6,7,8)}、就中結核菌の Isonicotinic acid hydrazide 抵抗性獲得に関しては、最近耐性菌株の新陳代謝 (Catalase 欠乏^{9,10,11)}、發育栄養素に対する異常反応性¹²⁾や菌体の性状^{13,14)}等に関して甚だ興味ある研究が相次いで発表されている。然るに、結核菌の薬剤耐性と Tuberculin 産生との関係に就いては従来殆んど見るべき知見がなかつたのであるが、今城⁴⁾はさきに青山 B 株から in vitro で誘導分離した STM 耐性変異株が CIT 産生能に於て母菌株と甚だ趣を異にするところがあるという一新知見をもたらしたのである。結核菌が、STM 抵抗性獲得に伴つてその CIT 産生能に障碍を蒙るに至るということの実証は、結核菌の新陳代謝機構と「T」産生機構との間の相関性に就いて重要な示唆を与えるものであつて、この事實は亦、上に述べた様な INH 耐性菌株の生物学的性状に鑑みて、INH 耐性菌に就いても抵抗性獲得と CIT 産生能との間に同様な関係の存在を類推せ

按

しめるのであるが、今回の私等の研究は意外にも“INH 耐性菌株は CIT 産生能に就いては INH 感受性菌株と同様の態度を示す”という予想に反した成績をもたらしたものである。この様に同じ青山 B 株から誘導された薬剤耐性変異株であつても、薬剤の相違によつて「T」産生機能に著しい差異が現れてくることについては今のところ全く解明し得ないのであるが、唯こゝで見逃すことの出来ない事實は、INH 耐性菌は STM 耐性菌と異り培地として単純 Sauton 培地を使用したのでは發育は極めて困難であつて動物血清の添加を行わねばならないということである。即ちこの場合添加血清が耐性菌の發育を促進すると共に、CIT 産生機能に対しても好影響的に作用するものとの推考も可能となつてくる。兎も角、さきの STM 耐性菌株に就いての研究といい今回の INH 耐性菌株に就いての研究といい、何れも結核菌の生活環境の些細な変動に基因する菌体の微細な生物学的性状の変化が、結核菌の in vitro 並びに in vivo に於ける「T」産生に大きな影響を与えるものである事を教示している点に於て、包蔵する意義の大きいものと云えよう。

結

INH 含有 Kirchner 培地内継代培養法によつて分離した人型結核菌青山 B 株の INH 耐性変異株に就いて、洗滌菌体のクエン酸溶液中浸漬

論

法による Tuberculin 産生試験を行つて、耐性菌株の Citrate-Tuberculin 産生能が母菌株に比して殆んど劣るところがないことを実証した。

文

- 1) Ito, R. : Am. Rev. Tuberc., 67, 526, 1953.
- 2) Ito, R., Yoshimura, M., Miyaji, T., and Imaki, A. : Japan. J. Tuberc., 1, 1, 1953
- 3) Ito, R., and Imaki, A. : Japan. J. Tuberc.,

献

- 2, 99, 1954.
- 4) Imaki, A. : Japan. J. Tuberc., 1955 (in press).
- 5) Peck, R. L., and Lyons, J. E. : Ann. Rev. Biochem., 20, 400, 1951.
- 6) Works, T. S. : Ann. Rev.

Biochem., 21, 444, 1952. 7) Miller, C. P., and Bohnhoff, M. : Ann. Rev. Microbiol., 4, 201, 1950. 8) Heilmeyer, L. : Beitr. Klin. Tbk., 111, 55, 1954. 9) Fisher, M. W. : Am. Rev. Tuberc., 69, 797, 1954. 10) Cohn, M. L., Kovitz, C., Oda, U., and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70, 641, 1954. 11) Middlebrook, G., Cohn, M. L., and Schaefer, W. B. : Am. Rev. Tuberc., 70, 852, 1954. 12) Barry, V. C., Conalty, M. L., Denny, J. M., Gaffney, E. E., and Winder, F. : Am. Rev. Tuberc., 71, 785, 1955. 13) Barclay, W. R., Ebert, R. H., and Koch-Weser, D. : Am. Rev. Tuberc., 67, 490, 1953. 14) Barclay, W. R., Koch-Weser, D., and Ebert, R. H. : Am. Rev. Tuberc., 70, 784, 1954.

Table 1. Comparative experiments on the Citrate-Tuberculin forming property of INH-sensitive and INH-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*

Exp. No.	Age of original culture (days)	Wet weight of bacilli (gm)		Skin reaction (mm)		
		INH-resist. strain	INH-sensit. strain	Dilution of citrate-tuberculin	INH-resistant strain	INH-sensitive strain
1	47	2.0	1.8	1 : 20	$\frac{11 \times 13}{9 \times 10}$	•
				1 : 50	$\frac{9 \times 10}{8 \times 8}$	$\frac{15 \times 16}{12 \times 13}$
				1 : 100	•	$\frac{12 \times 13}{10 \times 11}$
				1 : 200	•	$\frac{11 \times 12}{9 \times 9}$
2	35	1.0	1.0	1 : 10	$\frac{16 \times 17}{15 \times 15}$	$\frac{17 \times 18}{14 \times 15}$
				1 : 50	$\frac{11 \times 12}{10 \times 10}$	$\frac{10 \times 12}{10 \times 12}$
3	40	•	•	1 : 10	$\frac{18 \times 20}{14 \times 14}$	$\frac{22 \times 23}{17 \times 18}$
				1 : 50	$\frac{14 \times 14}{6 \times 7}$	$\frac{18 \times 20}{13 \times 14}$
				1 : 100	•	$\frac{14 \times 15}{5 \times 6}$
4	42	1.0	1.2	1 : 50	$\frac{14 \times 15}{14 \times 14}$	$\frac{12 \times 12}{11 \times 12}$

The figures on the top lines in the skin reaction column indicate the 24 hour readings and the figures on the lower lines the 48 hour readings.