HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	INAH自然耐性結核菌の研究：第2報
Author(s)	久世, 彰彦
Description	
Citation	結核の研究, 3, 39-49
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26578
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P39-49.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

INAH自然耐性結核菌の研究*

第 2 報

久 世 彰 彦
（北海道大学医学部第1内科　山田豊治教授）
（北海道大学結核研究所豫防部　高橋義夫教授）

（受付　昭和30年11月30日）

薬剤耐性菌と感受性菌の生物学的性状殊にそれらの菌力を比較研究することは，生物学上の興味深い課題であるばかりでなく，臨床の実際に直接重要なつながりをもつ課題である。

INAH 耐性結核菌に関しては，その海猴に対する菌力が感受性菌のそれに比して著明に減弱している事実が多くの研究者によつて報告されている。[1)~14)] 更に INAH 耐性菌は感染後早期には海猴に進行性病変を惹き起すが，その後の経過中に病変は退行性になるとされている。[3)8)10)] また，菌の INAH 耐性の程度と菌力との間に密接な関係が認められると報告され，[3)6)] 最近，Middlebrook, Cohn[11)~13)] 等は菌の耐性の程度，カタラーゼ活性，海猴に対する菌力という三者の間に密接な併行関係のあることを主張している。

しかし，これに反して，INAH 耐性菌のうちのあるものは，海猴に対する菌力が感受性菌のそれと著しい差がないという報告がある。[10)15)16)]

一方，マウスに対する INAH 耐性菌の菌力に関しては海猴の場合と同様菌力の減弱を認める成績もあるが，[2)] 多くの研究者は感受性菌と同様の菌力を示すと報告している。[17)25)]

何れにせよ，これ等の報告の大部分は，研究室保存株を何代も継代して漸次耐性を高めた菌か，INAH 治療患者から分離された耐性菌についてなされているのであつて，所謂自然耐性菌についての研究は極めて少ないようである。

著者は前報[20)] に報告した自然耐性菌を用いて，出来るだけ "pure" な状態におけるこれらの菌の海猴に対する菌力を感受性菌のそれと比較検討するとともに，その他2，3の生物学的性状を研究した。

また，耐性復帰の問題に関連して興味ある "Welch の現象"[18)] を検討する目的で，自然耐性菌と感受性菌を混合して継代培養した場合の両者の分布の変動を研究した。

以下はその実験報告である。

実験方法

実験に用いた菌株は人型菌向井株，大磯株及び水木株の3株で，夫々の菌株の INAH 感受性菌及び自然耐性菌は，前報に報告した方法により，未だ化学療法剤を使用したことのない患者から分離したものである。

i） 感受性菌：前報に報じたように，患者から分離されたこれ等3菌株の菌集団は，数千万ケ乃至1億ケに1ケの割合で自然耐性菌を含むから，純粋な感受性菌の集団を得る為には，これ等の極めて少数の耐性菌を除かなければならない。この為に，最初に小川培地に分離した菌から手振法によつて菌液を作り，これを INAH 含有培地と非含有培地を用いて定量培養を実施した。この結果コロニーの発生は INAH 非含有培地にのみ見られたので，このコロニーが大体 INAH 感受性菌のみからなるものと考えられるが，併しこのコロニー中に猶，耐性菌の混在する可能性を全く否定するには出来ない。そこでこのコロニーから更に増菌培養し，菌液を作り，上記の2種類の培地を用いて定量培養を繰返し，再び INAH 非含有培地のみにコロニーの発生することを確めた。このように個々のコロニーの形成，増菌，菌液調製，定量培養を7回反覆し，凡そ完全に純粋な感受性菌の集団を得た。即ちかかる菌の濃厚菌液（20～30 mg/ml）を INAH 含有培地に接種しても全くコロニーの発生しないことを確め得たのである。

ii） 耐性菌：患者の喀痰から分離した耐性菌は当初 10 γ/ml INAH 耐性を示したが，これを同濃度の INAH 含有培地で一旦増菌し，濃厚菌液を作り，100γ/ml INAH 含有培地で培養した結果，同培地上に少数乍らコロニーの発生を認めた。従つてこのコロニーは 10 γ 耐性菌中に極めて少数含まれる 100 γ 耐性菌と考えられる。即ち以上の操作により 100 γ の INAH 自然耐性菌を分離したわけで

* 本研究の一部は北海道科学研究費補助金による（高橋）

ある。

この耐性菌の純粋な集団を得る為に，感受性菌の場合同様に，手振法による菌液の調製，INAH 含有培地と非含有培地を用いての定量培養，耐性培地上の個々のコロニーからの増菌培養の，操作を7回繰返し，凡そ完全に純粋と思われる耐性菌の集団を得ることが出来た。即ち**表1**に示すように，最終の定量培養の成績では，両種の培地にほぼ同数のコロニーの発生することが確認されたのである。

A. 海猿に対する菌力の比較実験

以上の2つの株の4週間培養の菌苔から手振り法で菌液を作り，これを夫々 10 頭の海猿（体重 400 g 前後）の右下腹部皮下に 1/100 mg 宛（接種液量 0.4 ml）接種した。接種菌液の生菌数は**表1**に示した。使用菌は向井・大磯及び水木株である。

表1 感染に用いた菌の生菌単位（1/100 mg）

耐性の別 ＼ 菌株 ／ 培地		向井株	大磯株	水木株
感性受菌	1% 小川培地	2×10^3	33×10^3	11×10^2
	同 100γ/ml INAH含有培地	0	0	0
耐性菌	1% 小川培地	19×10^3	14×10^3	11×10^2
	同 100γ/ml INAH含有培地	26×10^3	8×10^4	10×10^2

接種後，2週毎にツベルクリン，皮膚アレルギーの推移を追及した。ツベルクリン反応には 100 倍旧ツベルクリン液を用い，判定は注射後 24 時間で行い，硬結の有無を検べ，発赤の両径を測定した。**表2**には剖検時の発赤の大きさの平均を示した。

接種後4週目，8週目に夫々の群の約半数を剖検し，内臓臓器及びリンパ腺の病変を肉眼的及び組織学的に観察し，同時に脾臓内生菌数を定量培養により求めた。脾の培養は，約½の脾をとり1% NaOH 溶液を加えて磨砕し，100γ/cc INAH 含有小川培地，INAH を含まぬ小川培地にそれぞれ定量培養を行つた。

リンパ腺と内臓の病変程度は，その強さに応じて＋1から＋6までに区分し，各動物のリンパ腺と肺，肝，脾の＋の数を合計して，ヒストグラムで図示した。

B. その他2，3の生物学的性状

i） 乳酸脱水素酵素及びカタラーゼの活性度：乳酸脱水素酵素の活性度は大林[21]の方法に従つて測定した。即ち反応測定にはチューンベルグ管を用い，その主室には 40 mg/ml の菌液 0.5 ml と M/7 燐酸緩衝液（pH 6.9）0.5 ml を入れ，副室には M/5 乳酸カリ溶液 0.5 ml と M/500 2・6－ヂクロールフエノール，インドフエノール溶液 0.5 ml を入れた。管内の空気を排除（約 10 mm Hg）して後，37°C の恒温槽に入れ暫時加温後，両室の液を充分に混ぜ，その時を基点として試験液の色調が予め準備して置いた標準色素液の色調迄褪色するに要する時間を測り，それを還元時間とし，その逆数を 100 倍して還元度とした。

標準色素液は次のようにして調製した。即ち 40 mg/ml の加熱死菌液 0.5 ml，上記の燐酸緩衝液 0.5 ml，蒸溜水 0.8 ml 及び色素液 0.2 ml をチューンベルグ管と同じ直径をもつ試験管に入れた。

カタラーゼの活性度の測定は $KMnO_4$ による滴定法[2]によつた。100 ml 入り三角ニルベンに 5 mg/ml の被検菌液 4 ml と M/7 燐酸緩衝菌（pH 6.9）1.0ml を入れて混和し，これに N/50 H_2O_2 液 10 ml を加え，手早く混和後，直ちに 37°C の恒温槽に入れ，5分後に4倍稀釈硫酸水 0.5 ml を加えて酵素作用を中絶し，残余の H_2O_2 の量を N/50 $KMnO_4$ で滴定した。酵素の活性度は 37°C で5分間に分解される H_2O_2 の量を以て表わした。

ii） 染色性：染色は Ziehl-Neelsen 染色法，Fontes 染色法を用いた。抗煮沸試験は Preis 染色法[3]に依つた。

iii） 電子顕微鏡による形態の比較

耐性菌及び感受性菌を Dubos 培地に 14 日間培養した後，菌を遠心沈澱法（3000 rpm 15分間）により，蒸溜水を用いて3回洗い，最後の菌浮遊液より型の如く試料を作成し，電子顕微鏡で撮影して比較した。使用した電子顕微鏡は日本電子光学製 JEM 型で撮影条件は加速電圧5 KV，電子電流 10 μA，直接倍率 4100 倍であつた。

C. "Welch の現象" についての実験

向井株，大磯株について，前述の海猿への接種に用いた感受性菌，耐性菌それぞれの菌液を等量混ぜたものを 0.1 ml 宛小川培地及び 100 γ/ml INAH 含有小川培地に培養した。この時の耐性菌対感受性菌の比率は，生菌数からみて，向井株では 13：1，大磯株では略々 1：4 であつた。

37°C 4 週間培養のこれ等混合菌を用いて手振り法で菌液を作り，それぞれ定量培養を行い，感受性菌，耐性菌の分布を検査した。

定量培養は 10^{-4}，10^{-5}，10^{-6} mg の3段階について行い，夫々3本の試験管に発生したコロニー数の平均をとつて**表7**に示した。

INAH を含まぬ小川培地継代3代目の混合菌では，含有培地にコロニー発生を認め難かつたので，継代4代目のものは，10^{-1}，10^{-2}，10^{-3} mg の稀釈で耐性菌の存在を検査した。

実　験　成　績

A.　海猿に対する菌力の比較実験

i)　ツベルクリン，皮膚アレルギー

表2は感染後4週目，8週目剖検時の各群のツベルクリン反応の強さを，発赤の大きさの平均で現わしたものである。表にみられるように，8週目の向井株耐性菌群での反応がやや弱かつたが，感受性菌群と耐性菌群の間に，著しい差は認められなかつた。

表 2　ツベルクリン反応の強さ
（発赤の大いさの平均）

接種菌＼判定時期		接種後4週目	接種後8週目
向井株	耐性菌	18.2	10.5
	感受性菌	18.0	19.2
大磯株	耐性菌	20.4	22.3
	感受性菌	21.9	24.0
水木株	耐性菌	20.4	22.7
	感受性菌	20.7	21.9

ii)　リンパ腺及び内臓臓器の肉眼的所見

図1，2，3に見られるように感受性菌群では病変が強く，4週目よりも8週目の病変がより強度であつた。耐性菌群中向井株，大磯株を接種された動物では，病変が極めて微弱で，しかも進行性を欠き，所属リンパ節に限局される傾向を示した。一方水木株耐性菌群は感受性菌群と同程度の病変を呈していた。

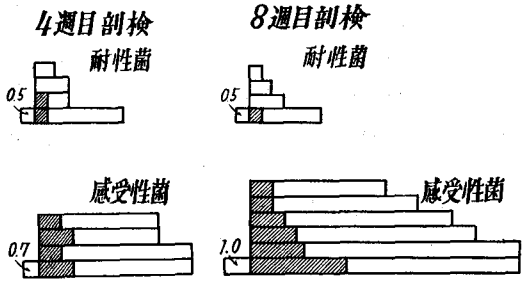

図 1.　向井株：内臓々器及びリンパ腺肉眼的病変ヒストグラム

iii)　リンパ腺及び内臓臓器の組織学的所見

これを要約すると**表3**の如くである。

I)　向井株

a)　耐性菌群

所属リンパ節には4週目で著明な乾酪軟化を主とする変化がみられた。これは8週目になると線維成分の増加とリンパ組織の増生によつておきかえられ，病変は著しく軽

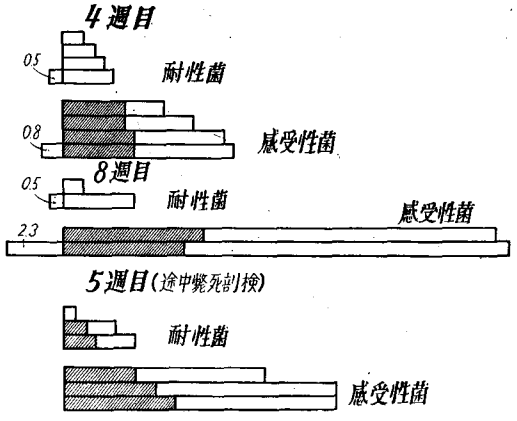

図 2.　大磯株：内臓々器及びリンパ腺肉眼的病変ヒストグラム

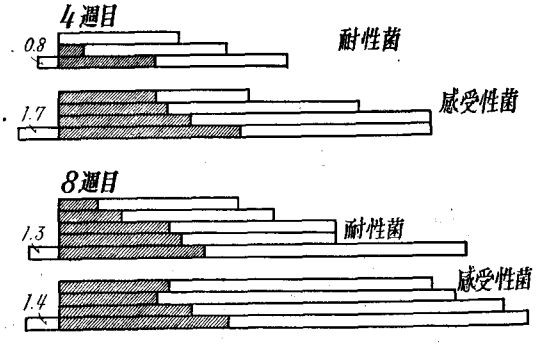

図 3.　水木株：内臓々器及びリンパ腺肉眼的病変ヒストグラム

度となつた。腋窩リンパ節では4週群に若干の大細胞性増殖像を見るが，8週群では極めて少なかつた。脾では，4週群において少数の類上皮細胞集団を認めたが，これ等は何れも過形成性に増大したリンパ濾胞の中に包まれ，定型的吸収像と判断される。8週目には著明な病変を認め難かつた。肺では4週目，血管または気管支周囲にリンパ球，単球の増加が認められるに過ぎないものが多く，8週目では更にそれらの変化も減弱し，また一方気管支肺炎像を呈する例が約半数に見られた。肝には4，8週目ともに極めて少数の類上皮細胞からなる結節を少数例に認めたに過ぎなかつた。

b)　感受性菌群

この群の変化は耐性菌群に比較すると甚だ異つていて，所属リンパ節の病変は耐性菌群同様乾酪軟化を主としたものであるが，その変化は量的には遙かに強く，また8週目の所見も4週目のそれと比較すれば，増悪こそすれ，決して減弱していなかつた。腋窩リンパ節では少数例に乾酪巣をもつた病変を認める程度であつたが，8週目では全

表 3. リンパ腺及び内臓々器の組織学的所見

接種菌株	耐性・感性の別	感染後剖検迄の期間	脾臓 病変程度	脾臓 乾酪化程度	脾臓 濾胞育発度	所属リンパ節 病変程度	所属リンパ節 乾酪化軟度	所属リンパ節 濾胞育発度	腋窩リンパ節 病変程度	腋窩リンパ節 乾酪化軟度	肺臓 病変程度	肺臓 乾酪化程度	肝臓 病変程度	肝臓 乾酪化程度
向井株	耐性	4週	+	−	±±±	±±	±±	±±	+	−	+	−	∓	−
		8	±	−	±±±	±±	±	±±	±	−	±	−	∓	−
	感受性	4	±±	+	±±	±±	±±	±	±±	±	+	−	±	−
		8	±±	±±	±±	±±±	±±	+	±±	±±	±±	±	+	−
大磯株	耐性	4	±	−	±±	±±	±	±±	∓	−	±	−	∓	−
		8	+	−	±±±	+	−	±±	±	−	±	−	∓	−
	感受性	4	±±	+	±±	±±	±±	±	+	−	±±	−	±	−
		8	±±	±±	±	±±±	±±±	+	±±	±±	±±	−	±±	+
水木株	耐性	4	±±	+	±±	±±	±±	±±	±	−	±	−	±±	+
		8	±±	+	±±	±±	±±	±	+	±	±±	+	±±	+
	感受性	4	±±	±	±	±±	±±	±±	±±	+	±	−	±±	±
		8	±±±	±±	+	±±±	±±	±	±	+	±±	−	±±	+

一　病変を認め得ぬもの。
±～±±±　変化の程度を現わす。

例に比較的広範な乾酪性病巣を認めた。脾では4週目で既に大半の例に乾酪化を伴つた類上皮細胞性結節の形成が見られ，8週目では更に病変は高度となり，リンパ濾胞の萎縮分断像が著明であつた。肺では4週目少数の類上皮細胞性結節を認め，8週目では更に病変の拡大が認められる。肝には極く少数の病変部を認めるに過ぎなかつた。

II) 大磯株

a) 耐性菌群

所属リンパ節には4週目全例に乾酪壊死性病変を認めたが，8週目には何れの例にも，かかる変化は見られず，染色性の劣つた少数の類上皮細胞を認めるに過ぎなかつた。腋窩リンパ節には4，8週目ともに殆んど病変を認め得なかつた。脾の病変は8週目より4週目の方がむしろ強かつた。しかしながら病変としては少数の類上皮細胞性結節の形成に過ぎず，しかもその多くのものは活潑なリンパ組織の増殖により置換されている像を示し，リンパ濾胞に膠原線維の侵入像，脾髄の増殖或はリンパ濾胞の芽中心の形成が著明に認められた。肺については4週目に，主として類リンパ球から成る粟粒大の小結節が認められ，その比較的集合性に見られる所には胞隔の肥厚及び肺胞内に大滲出細胞の滲出が見られた。8週目でも同様の程度の変化に過ぎなかつた。肝には殆んど変化を見なかつた。

b) 感受性菌群

所属リンパ節は4週目では耐性菌群と感受性菌群とで大差がなかつたが，前者は病変の退縮が見られたのに反し，この群には何れの例にも増悪性過程が認められ，リンパ節は殆んど完全に病変組織によつて置き換えられていた。腋窩リンパ節においても8週目には強い乾酪壊死性変化を認める。脾は4週目から強い結節性病変を示し，その一部には乾酪巣の出現がみられ，8週目に至ると更に病変は高度となり，腫大した臓器全体に瀰漫性に類上皮細胞性増殖が認められる。肺の変化も4週から比較的強く，8週目にはやや病変の範囲を拡張していた。肝においても同様に病変の増悪像が認められた。

III) 水木株

a) 耐性菌群

所属リンパ節の変化は4週目に非常に高度で乾酪巣全体が軟化を起しているものが多かつた。8週目になると一部を除き病変は更に高度となり，リンパ組織を殆んど認め得ない例も見出された。腋窩リンパ節では4週目殆んど変化を認めないが，8週目では大半のものが類上皮細胞性結節を示し，一部のものは乾酪化を示した。脾は4週目から乾酪巣を有つた広大な類上皮細胞結節を示し，8週目では一部のものを除き，病変はむしろ軽減していた。肺では4週目から既に類上皮細胞，類リンパ球から成る結節形成が見られ，8週目では更に増大していた。肝の変化は4，8週ともに大類上皮細胞結節と中心乾酪巣を示すものが半数例に見られた。

b) 感受性菌群

所属リンパ節は4，8週目ともに強い乾酪壊死性病巣を呈していたが，残存リンパ装置は8週目に，より少なかつた。腋窩リンパ節の変化は，乾酪軟化の程度，残存リンパ装置の量からみて，4週目が8週目に比べてより強かつた。脾は，4，8週目ともに広大な類上皮細胞結節を示し，中心乾酪巣は4週目には殆んど見られなかつたが，8週目には全例に広く認められた。肺では4週目に類上皮細胞，類リンパ球結節を少数認め，8週目ではやや増加していた。肝においても8週目には高度の乾酪化を伴つた大結節を認めた。

以上の変化をまとめると，向井，大磯株による変化は若干の例外はあるが，概ね類似した病変程度及び病変過程を示すことが分つた。即ち病変は，耐性菌群では一般に4週目の方が強く，8週目にはむしろ減弱する傾向がみられた。殊に脾の変化をみると，4週目で著明な病変吸収像が認められ，病勢の進展は一応終熄したとみなされた。一方感受性菌では一般に病変は8週目になると著しく高度となつており，通常の毒力菌接種例と略々同様の経過をとつていると判断された。

注意しなければならないのは水木株で，これは上記の両株と著しく態度を異にし，一般に耐性菌群と感受性菌群との間に顕著な差異を認めることが出来なかつた。ただ脾，リンパ節においては耐性菌群4週目の変化が感受性菌群同週のものより幾分弱く，肺においては耐性菌群8週目の変化は感受性菌群同週のものより幾分強かつた。しかし脾の耐性菌群の変化は8週目にはむしろ軽減し，この点では前記向井，大磯株の耐性菌群の経過と似た成績を示した。

表 4 向井株：脾内生菌数（g当り）とその カタラーゼ及び脱水素酵素

分離培地＼剖検時期	4週目	8週目		
	生菌数	生菌数	カタラーゼ	脱水素酵素
感受性菌 I 小川培地	231,375	208,375	4.2 cc	20
感受性菌 同 100γ/ml INAH 含有培地	0	0		
耐性菌 I% 小川培地	265	383		
耐性菌 同 100γ/ml INAH 含有培地	217	575	0 cc	27

N.B. • カタラーゼ活性は $N/_{50}H_2O_2$ の消費量を以て表はした。
• 脱水素酵素活性は標準色素液と同程度に褪色する迄に要する時間（分）の逆数を%で示した。

表 6 水木株：脾内生菌数（g当り）とその カタラーゼ及び脱水素酵表

分離培地＼剖検時期	4週目	8週目		
	生菌数	生菌数	カタラーゼ	脱水素酵素
感受性菌 I% 小川培地	1123,333	48,333	8.2 cc	50
感受性菌 同 100γ/ml INAH 含有培地	0	0		
耐性菌 1% 小川培地	80,200	73,325	0 cc	
耐性菌 同 100γ/ml INAH 含有培地	79,300	54,050	0	40

N.B. 表4に同じ。

表 5 大磯株：脾内生菌数（g当り）とその カタラーゼ及び脱水素酵素

分離培地＼剖検時期	4週目			8週目
	生菌数	カタラーゼ	脱水素酵素	生菌数
感受性菌 1% 小川培地	150,667	5.2 cc	40	275,000
感受性菌 同 100γ/ml INAH 含有培地	0			0
耐性菌 1% 小川培地	1,200			945
耐性菌 同 100γ/ml INAH 含有培地	1,007	0 cc	33	655

N.B. 表4に同じ。

IV) 脾臓内生菌数

表4及び**5**に示されるように，向井株，大磯株では4週目8週目ともに耐性菌群の脾臓内生菌数は，感受性菌群のそれに較べて著明に減少していた。一方**表6**の如く水木株の耐性菌群における生菌数は4週目では感受性菌群のそれと略々相似たものであり，8週目ではそれよりむしろ多数であつた。

V) 接種菌の耐性度の変化

表1，4，5，及び**6**を比較して明らかなじように，脾より分離された結核菌の耐性度は，動物接種に用いた菌のそれと著しい差は認められなかつた。

B. その他の2，3生物学的性状

i) 乳酸脱水素酵素及びカタラーゼの活性度

表4，5及び**6**に見られる如く，各株の感受性菌と耐性菌の間に，乳酸脱水素酵素の活性度の差は認められなつた。

カタラーゼ活性についてみれば，各株の感受性菌はすべてカタラーゼ活性を有していたが，耐性菌はこれを全く欠如していた。

ii) 染色性

Ziehl-Neelsen 染色，Fontes 染色では，耐性菌は感受性菌と同様の抗酸性を示し，光学顕微鏡で観察される形態の上でも，両者間の差異を認め得なかつた。Preis 染色法による抗煮沸試験では，何れも Kf 20～25 で差がなかつた。

iii) 電子顕微鏡による所見

耐性菌も感受性菌も殆んど同程度の菌力を有する水木株の場合は，両者の電子顕微鏡像の間に何らの差異が認められなかつたが，耐性菌の菌力が感受性菌のそれよりかなり低下している大磯株及び向井株においては，確然たる形態的の差が認められた。

即ち，これ等の菌株においては感受性菌は通常の毒力人型結核菌のように，菌体表面は電子線を散乱する粘液層（slime layer）につつまれていたが，耐性菌においてはこれが認められず，ために菌体の外廓は極めて明瞭に劃然と認められた。

C. "Welch" の現象についての実験成績

耐性菌及び感受性菌を人工的に混合して得られた混合菌群を薬剤含有培地及び薬剤を含まぬ培地に継代した場合この菌群の耐性度の変動が如何なるものであるかを検討した。成績は**表7**の如くである。

表7 混合菌群の継代培養による耐性度の変動

継代数	菌株 / 定量培養 / 継代培地	向井株（耐性菌 26×10^3 感受性菌 2×10^3 等量混合）						大磯株（耐性菌 8×10^3 感受性菌 33×10^3 等量混合）					
		100γ/ml INAH 含有培地			小川培地			100γ/ml INAH 含有培地			100γ/ml INAH 含有培地		
		10^{-4}mg	10^{-5}mg	10^{-6}mg	10^{-4}mg	10^{-5}mg	10^{-6}mg	10^{-4}mg	10^{-5}mg	10^{-6}mg	10^{-4}mg	10^{-5}mg	10^{-6}mg
1	100γ/ml INAH 含有小川培地	＋＋	＋＋	42	＋＋	＋＋	40	＋＋	70	7	＋＋	55	7
	小川培地	＋＋	56	3	＋＋	＋	8	81	11	0.6	＋＋	94	3
2	100γ/ml INAH 含有小川培地	100	12	0.6	133	20	3	＋＋	33	3	＋＋	56	10
	小川培地	36	2	0.3	＋＋	28	3	3	0.3	0	110	14	0.3
3	100γ/ml ImAH 含有小川培地	＋＋	54	7	＋＋	38	5	＋＋	＋	27	＋＋	＋	24
	小川培地	0	0	0	＋＋	29	3	0.6	0	0	＋	19	2
4	100γ/ml INAH 含有小川培地	＋	12	1	28	3	0.6	＋	17	0.3	＋	16	3
	小川培地	10^{-1} 3	10^{-2} 0.6	10^{-3} 0	＋＋	＋	15	10^{-1}	10^{-2} 13	10^{-3} 1	＋	22	4

数字はコロニー数平均　＋ コロニー数概ね 100～200　＋＋ コロニー数概ね 200～500　＋＋ コロニーが完全には融合していないもの。

本実験の出発菌群では前述の如く，耐性菌対感受性菌の比率は向井株で 13：1，大磯株で 1：4 であつた。表で明らかなように，100γ/ml INAH 含有培地に混合菌群を継代培養した場合には，多少の変動はあつても継代回数を重ねる毎に混合菌群は耐性菌のみから構成される傾向を示した。一方，混合菌群を INAH を含まない培地に継代培養した場合には，かなり急速に耐性菌対感受菌の比率が甚だ著明に減少した。

考　按

薬剤耐性という顕著な特性を有する変異菌が，如何なる生物学的性状を示すか，殊にそれの菌力が如何なる修飾をうけているかを検討することは，耐性菌研究の領域において当然問題とされるべき課題である。

INAH 耐性菌のツベルクリン・皮膚アレルギー賦与力については，Peizer[6][7] は海猿を用いた実験で，感受性菌では接種後5週以内にツベルクリン反応陽性になるのに反し，耐性菌接種動物では陽性化が遅く，中には陰性のままのものがあると報告し，Karlson[5] は耐性菌を接種された海猿が2週間後にはツベルクリン反応陽性であつたと報告している。著者の実験では，感受性菌と耐性菌の間にツベルクリン・皮膚アレルギー賦与力の差は認め難かつた。[35]

INAH 耐性菌の菌力に関しては，Middlebrook,[1] は 10γ/ml 以上の耐性菌が海猿に殆んど病変を惹き起さないことを報告し，Barnett,[4] Peizer[6][7] も同様のことを認めている。Barnett[2][3] は低度の耐性菌は感受性菌と同程度の菌力を有するが，中には海猿に対して菌力弱く，マウスに

Fig. 1. 向井株感受性菌

Fig. 2. 向井株耐性菌

Fig. 3. 大磯株感受性菌

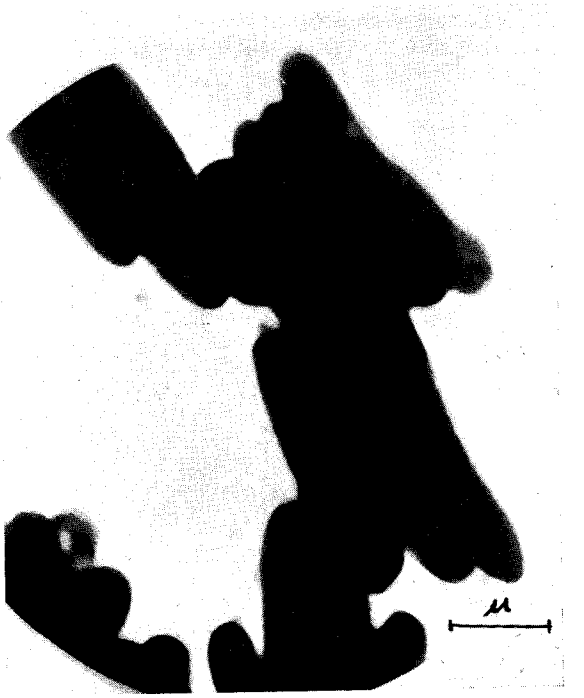

Fig. 4. 大磯株耐性菌

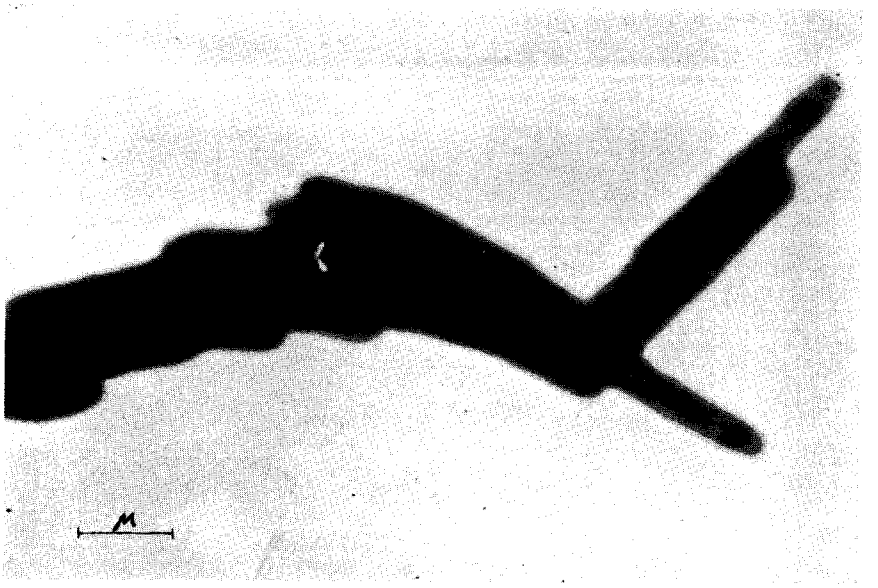

Fig. 5 水 木 株 感 受 性 菌

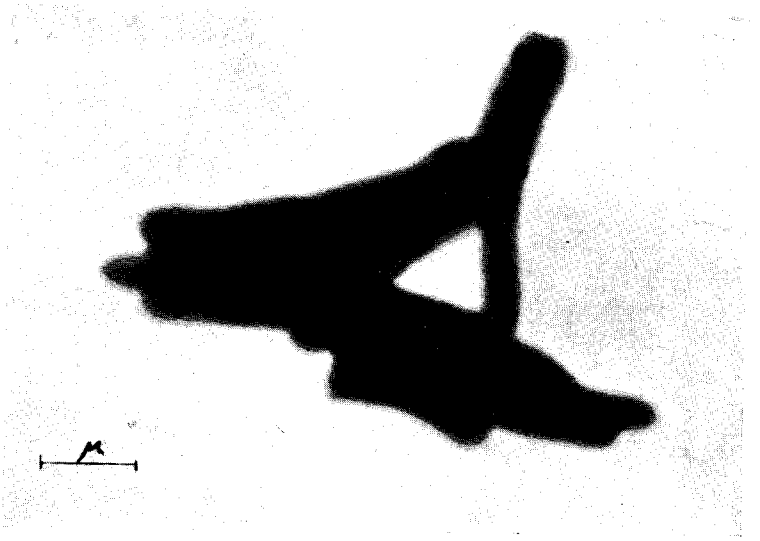

Fig. 6 水 木 株 耐 性 菌

は菌力の強い株のあることを報告したが，次いで菌の INAH 耐性の程度と菌との間に明らかな関係のあることを認め 50γ/ml 以上の高度の耐性菌は，海猪に僅少の病変しかおこさず，かかる菌をマウスに静注しても，動物の生存期間を延長することを認めた。Mitchison[5] も同様の成績を示している。更に Middlebrook, Cohn[11)~13)] は保存株から分離した耐性菌，患者材料からの 10γ/ml 以上の分離菌は，カタラーゼ活性を失い，海猪に対する菌力が著しく減弱し，10γ/ml 耐性 25γ/ml 感受性の菌はカタラーゼ活性を有し，皮下接種では菌力減じ，大量静注では動物を死に到らしめる。感受性菌はカタラーゼ活性を有し，海猪に高度の病変を惹起することを報告した。また，Karlson[3] 等は 10γ/ml 耐性菌は，海猪腹腔内大量接種では病変をおこすが，皮下接種の場合は，感染後2～4週での観察では病変を認め得るが，7～14 週目にはこの病変が軽減すると述べている。Morse[9] は 25～50 γ/ml 耐性菌の海猪に対する菌力低下を認め，0.25 γ/ml 耐性菌でも減弱しているが，マウスに対する菌力は感受性菌のそれと同程度であると報告している。

これに反して Katz[15] は 20 γ/ml INAH, 30 γ/ml SM, 5 γ/ml INAH-salicylate compound 耐性の結核菌を患者材料から分離し，これが海猪に対して著明な菌力を示すことを報告した。また，Hinshaw[24] は保存株からの耐性菌は海猪に菌力を失い，治療患者からの分離耐性菌は菌力を保持し，耐性と菌力と関係なしとはしている。

Conalty[10] はカタラーゼ活性を失つた8株の 100 γ/ml INAH 耐性菌を用いた実験で，耐性菌による感染では，初期の病変が経過とともに軽減する事実を認めたが，同時に耐性菌のあるものは海猪，マウスにかなりつよい病変を惹起することを報告した。同様に佐藤[14] は患者から分離した INAH 耐性菌を海猪に皮下接種し，菌力の減少乃至消失を認める一方相当強い菌力を示す耐性菌の存在することを報告し，INAH 耐性獲得と菌力の変動とは，相互に無関係の因子によつて支配されると主張している。

上述の如く，INAH 耐性菌の菌力の評価には研究者によつてかなりの開きがある。この相違は菌力なる言葉が，菌の何か独自の属性よりはむしろ病気及び，複雑な宿主・寄生体関係（host parasite relationship）に即して言われるものであるため，無理からぬことであろう。[26)~30)] 即ち，実験の観察期間，動物の種類，接種方法，接種菌の諸条件，つまり培地の性状，継代回数，菌の老若，耐性の程度，殊に用いられた菌が "crude" なものか "pure" なものかによつて一見同様な実験が全く相反する成績を結果する場合も生じ得るであろう。[31),32)]

兎に角，少くとも INAH 耐性菌のうちには海猪に対する菌力が著明に減弱乃至は消失しているものの存することは否めない事実であろう。

著者の実験成績を病理組織学的見地からみると，3耐性菌による病変は大きく2種類に分けて考えられる。即ち第1の組は向井，大磯株で夫々若干病変程度が異つている。先づ第1の向井，大磯株の場合の耐性菌は感受性菌と比較すると，遙かに弱い病変しか起していない。かつ感受性菌は8週目まで進行性の病変を作つているのに反し，耐性菌による病変の最高は感染後4週以前にあつたと考えられる。殊に耐性菌による4週目の脾をみると，活潑なリンパ濾胞の再生が認められ，確かに病変を起していたと推察することが出来る。但し残された変化の程度から見て，そう高度のものでないことが容易に考えられる。また同例の肺をみると，類リンパ球集団が粟粒大に散在性に認められ，若干の胞隔肥厚像と共に，結節性病巣の存在したことを推察するに充分である。このようなことから，耐性菌による病変は経過を促進せられ，早期に終熄した一過性のものであると判断出来る。第2の組に属する水木株の耐性菌による病変は，感受性菌による病変と較べて，幾分弱くはあるが殆んど同程度といえる。更に肺においては，むしろ耐性菌による病変がより高度である。但し，脾の病変は第1の組のものと同様8週目より4週目の方が強く，最高の病変は4週目と8週目の中間の時期にあつたと推察される。以上の成績から，先づ耐性菌による脾の病変から判断して，INAH 自然耐性菌によつて生ずた病変は，感受性菌によるそれと比較して経過が早いといえる。[3),9),10)]

また，前述の如く，脾臓内の結核菌生菌数の点からみると，向井株，大磯株では4，8週目ともに耐性菌群の脾臓内生菌数は，感受性菌群のそれに比べて著明に少く，一方水木株の耐性菌群における生菌数は4週目では感受性群のそれと大差なく，8週目ではそれよりむしろ多数であつた。

これを要するに，本実験に用いられた向井株，大磯株では，耐性菌の菌力が感受性菌のそれに比べて著明に減弱していた。しかし，一方水木株の耐性菌の如く感受性菌と同じように動物に進行性でかつ強い病変を惹き起す耐性菌の存在することも見逃し得ない事実である。

このことは，向井株，大磯株の耐性菌と水木株耐性菌の間にみられる電子顕微鏡像の顕著な差異と関連して興味深いことである。

従つて著者は一先づ，菌の耐性の変動を菌力の変異とは互に独立した異る因子によつて支配されると考えたい。[16),25)]

INAH 耐性菌のカタラーゼ活性消失は，Middlebrook,[11),26)] Cohn[12),13)] Oestreicher[7] 等によつて報告されて

いる。著者の実験で用いられた耐性菌についてもこの事実が確められた。しかし前述せるが如き Middlebrook の主張，即ち高度の INAH 耐性菌はカタラーゼ活性を失い，同時に海猪に対する菌力が著しく減弱しているということは疑わしい。何故ならば，著者のの実験に用いられた水木株耐性菌は 100γ/ml 以上の INAH に耐性で，成程カタラーゼ活性を失つてはいるが，海猪に対する菌力は甚だ強いからである。

従つて著者の実験からは，少くとも INAH 自然耐性菌に関しては，カタラーゼ活性消失と菌力との間に Middlebrook 等のいうが如き密接な併行関係は認められないといえる。

しかし，耐性菌のカタラーゼ活性喪失の現象は，結核菌の物質代謝研究の一つのいとぐちとして精細に研究さるべきで，事実 INAH 耐性菌の発育と培地の条件に関して多くの報告がなされている。即ち Fisher,[38][39] Middlebrook,[11][13] Cohn,[12][17] Schaffer,[40] Barry[41] その他の研究者の報告が挙げられよう。

著者の実験では，耐性菌の分離，継代培養に小川培地を用いたが，Barnett[1] のいうごとく薬剤含有培地での最初の2～3回の継代では発育が悪かつたが，その後は正常の発育を示した。また，INAH 自然耐性菌は Kirchner 培地では良好な発育を示したが，グリセリン馬鈴薯培地，ソートン培地での発育は極めて不良であつた。しかし，ソートン培地にヘモグロビンあるいはヘミンを加えた場合には，培地の INAH 含有の有無に関係なく，極めて良好な発育を示した。

INAH 耐性菌の抗酸性に関しては，Middlebrook[2] は 0.1γ/ml INAH 含有培地に植えられた菌については，2％に非抗酸菌が見られるに反し，0.1～0.2γ/ml INAH 含有培地では 90％に非抗酸性菌がみられたが，これは菌の partial lysis に依るものだろうと報告した。

weser[43] も抗酸性を失つた菌は INAH で死んだ菌であると結論している。

著者の実験では，自然耐性菌は感受性菌と同様の抗酸性を有し，光学顕微鏡に依る所見からは，両者間の形態の差異を見出し得なかつた。

しかしながら，ここに興味あることは，カタラーゼ活性を消失し，しかも感性菌と同様の菌力を有する水木株の耐性菌は通常の有毒人型結核菌と同様の電子顕微鏡像を呈していたが，同じくカカタラーゼ活性を消失し，同時に菌力が減弱した他の2株の耐性菌においては菌体表面の電子線をつよく散乱する所謂粘液層（slime layer）が認めなれず，ために劃然とした輪郭を呈していたことである。

近年，Bloch[31][34] 一派は結核菌の菌体表面毒素と思われる所謂 cord factor が結核菌の毒性物質であることを指摘しているが，本研究によつて得られたこの形態的知見は，カタラーゼ活性の消失は結核菌の菌力と直接つながりはなく，表面粘液層の有無が結核菌の菌力は直接つながりをもつことを示唆する有力な知見であると思われる。

次に臨床的に，結核菌の薬剤耐性検査をする場合，治療中止後に菌の耐性がかなり動揺することは日常経験されているところところである。この理由の一つは，体内に存在する結核菌の耐性が一様でないことにもよるであろうが，[45] 耐性復帰の現象が慎重に考慮されねばならない。事実 SM 耐性菌の感性復帰も報告されてはいるが，INAH 耐性菌は殊に容易に感性化することが知られている。[2][44]～[47]

この薬剤耐性復帰の問題に関聯して，興味深いのは所謂 "Welch の現象"[18][19] である。即ち薬剤耐性菌と感受性菌とを混合して薬剤の入つていない培地に継代培養すると，遂に耐性菌は消失して感受性菌のみになるというのである。この現象は Linz[46][50] によつて詳細に研究されたが，最近佐藤は INAH 耐性菌について実験を行い，完全な感性化はみられないが，継代培養をかさねるとともに，混合菌群中の耐性菌対感受性菌の比率は小さくなると報告した。

著者の実験においても，混合菌群中の耐性菌の占める割合が，かなり急速に減少することが明らかである。

この現象は一応感受性菌と耐性菌の試験管内の発育速度の差によるものと考えられるが，同様な現象が生体内でも起り得るものであるかどうか，また発育速度以外の因子に支配されるものかどうかは，耐性菌の物質代謝，養素要求等の研究と相俟つて今後精細に研究されるべき課題である。

結　　論

100γ/ml INAH 自然耐性結核菌とその母株である感受性菌を比較研究した結果，次のような成績を得た。

1) 自然耐性菌のツベルクリン皮膚・アレルギー賦与力は，感受性菌のそれと著しい差はなかつた。

2) 実験に用いられた3株の自然耐性菌のうち，2株は海猪に対する菌力が感受性菌のそれに比較して著しく減弱していたが，1株は母株と同様の菌力を示した。

3) 乳酸脱水素酸素の活性に関しては両者の間に著明な差が認められなかつた。

4) 自然耐性菌は全くカタラーゼを欠如していた。しかしこのことと菌力の減弱乃至喪失との間には関係が認められなかつた。

5) 染色性及び光学顕微鏡で観察された形態の点では，自然耐性菌と感受性菌との差を認め得なかつた。

6) 電子顕微鏡像では，カタラーゼ活性を全く欠き，母株たる感受性菌に比べて著しく菌力の減弱している自然耐性菌は，その輪廓が劃然と明瞭で粘液層を欠いていた。一方同様カタラーゼ活性を欠いてはいるが母株たる感受性菌と同程度の菌力を有している自然耐性菌では母株と同じ像を示した。

7) 自然耐性菌と感受性菌の混合菌群を，INAH を含まぬ培地に継代培養すると，菌群中の耐性菌対感受性菌の比率が急速に減少した。

終りに研究の機会を与えられた山田教授に深謝し，高橋教授の御指導，御校閲に厚く感謝する。予防部有馬助教授，山本講師の御援助，組織学的検索についての病理部森川助教授の御教示を感謝する。

文　献

1) Middlebrook, G. & Cohn, M. L.: Science, 118, 297, 1953.
2) Barnett, M et at., : Lancet i, 314, 1953.
3) Barrett, M et al: Brit. J. Exp. Paeh., 34, 568, 1953.
4) Barry, V. C. et al: Lancet I, 978, 1953.
5) Mitchison, D. A.: Brit. Med. J. No. 4854, 128, 1954.
6) Peizer, L. R. et al: Amer. Rev. Tuberc. 68, 290, 1953.
7) Peizer, L. R. et al: Amer. Rev. Tuberc, 70, 728, 1954.
8) Karlson, A. G.: Amer. Rev. Tuberc. 70,531, 1954.
9) Morse, W. C. et al: Amer. Rev. Tuberc. 69, 464, 1954.
10) Conalty, M. L. et al: Amer. Rev. Tuberc. 71,799, 1954.
11) Middlebrook, G. et al: Amer. Rev. Tuberc 70. 852, 1954.
12) Cohn, M. L. et al: Amer. Rev. Tuberc 70. 465, 1954.
13) Cohn, M. L. et al: Amer. Rev. Tuberc 70, 641, 1954.
14) 平野憲正：東京医事新誌．70, 371, 1953.
15) Katz, S. et al: Amer. Rev. Tuberc. 70, 881, 1954.
16) 佐藤直行：結核．30, 247, 1955.
17) 佐藤直行：医学と生物学．29, 14, 1953.
18) Welch, M: C. R. S. B. 143, 1282, 1949.
19) 高橋義夫：結核の臨床．2, 810, 1954.
20) 久世彰彦：結核の研究．2, 55, 1954.
21) 大林容二他；医学と生物学．10, 311, 1947.
22) 有馬　純；結核．25, 105, 1950.
23) 戸田忠雄：結核菌と BCG．南山堂，1947.
24) 小川辰次：日本臨床結核．14, 564, 1955.
25) Goulding, R.: Lancet ii, 69, 1952.
26) Dubos, R. J.: 細菌細胞．川喜田愛郎訳 178頁，岩波，1952.
27) Stewart, G. T.: Lancet ii, 562, 1952.
28) Stewart, G. T.: J.hqgiene 50, 37, 1952.
29) Watson, D. W. et al: Ann. Rev. Microbiol. 3, 195, 1949.
30) 安東洪次：感染と免疫．45 頁，丸善，1953.
31) Mitchison, D. A.: Amer. Rev. Tuberc. 69, 641, 1954.
32) Stewart, S. M.: Amer. Rev. Tuberc. 69, 641, 1954.
33) Bloch, H.: J. Exp Med., 91, 197, 1950.
34) Bloch, H. et al.: Amer. Rev Tuberc., 67, 629, 1935.
35) 橋本達一郎：結核．29, 384, 1954.
36) Middlebrook, G. et al: Amer. Rev. Tuberc. 69, 471, 1954.
37) Oestreicher, et al: Amer. Rev. Tuberc. 71, 390, 1955.
38) Fisher, M. W.: Amer. Rev. Tuberc. 66, 626, 1952.
39) Fisher, M. W.: Amer. Rev. Tuberc. 69, 797, 1954.
40) Schaffer, W. B. et al; Amer. Rev. Tubere. 68, 273, 1953.
41) Barry, V. C. et al; Amer. Rev. Tuberc. 71, 785, 1955.
42) Middlebrook. G.; Amer. Rev. Tuberc. 65, 765, 1952,
43) Weser, K. et al: Amer. Rev. Tubere, 71, 556, 1955.
44) Pansy, F. et al: Amer. Rev. Tuberc. 65. 761, 1952.
45) Szybalski, W. et al: Amer. Rev. Tuberc, 65, 768, 1952.
46) 佐藤直行：結核．29, 393, 1954.
47) 石川哲也：結核．30, 183, 1955.
48) 山本健一他：結核の研究．2, 43, 1954.
49) Linz, R. et al: C. R. S. B. 144, 1282, 1950.
50) Linz, R. et al: C. R. S. B. 145, 143, 1951.
51) 佐藤直行：結核．30, 119, 1955.