

抗結核剤使用患者における菌塗抹 陽性培養陰性例の検討

(第 1 報)

国立東京第一病院 内科 (医長 小山善之)

亀 山 禧

(受付 昭和 30 年 7 月 11 日)

緒 言

結核病巣から得た材料について、塗抹検査では抗酸性菌を認めるにもかかわらず、培養および動物接種検査陰性の場合があることは以前から知られていたが、最近抗結核剤使用患者の結核病巣および喀痰の菌検査でこのような成績が多いと報告されている。

そこで臨床的に肺内結核病巣と最も密接な関係をもつ喀痰の塗抹および培養検査を行い、菌塗抹陽性培養陰性例についてそれが如何なる原因にもとづくかを考察した。

検査対象：

(1) 国立東京第一病院内科において、肺結核患者 500 例の同一喀痰について蛍光法と培養の両者を併せ検査した。

(2) 同院結核病棟入院中の肺結核患者について、治療の経過をおつて喀痰の検索を行い、抗結核剤の効果が臨床的にみられ、結核菌喀出総数が減少した時期の 18 名について、塗抹、培養検査の両者を頻回行つた。18 名の使用薬剤は、PAS+SM 9 名、PAS+SM+INAH 3 名、PAS+INAH 2 名、INAH-MS (イソニコチン酸ヒドロラジッド・メタスルフォン酸ソーダ) 3 名、SM-INAH (ストレプトヒドロラジッド) 1 名であつた。

検査方法：

(1) 塗抹は蛍光顕微鏡研究協議会¹⁾決定による蛍光法を用いて、倍率 200 倍 10 視野中の菌数を算定した。

(2) 喀痰の培養は 6～8% 苛性ソーダ溶液を等量加えてよく混和し、その 0.1cc 宛を 2 本の 3% KH_2PO_4 培地 (小川培地) に接種、37°C に培養して 40 日、50 日、60 日後に判定した。

(3) 1 日喀出生菌数の計算は、およそ 7～10 日毎に、1 日量の喀痰を採取し、定量培養法によつてその中の生菌数を求めた²⁾。

(4) 喀痰中に混在する各種抗結核剤の濃度については、PAS は津田試薬を用いる比色法により、INAH は Kelly, Poet 氏法により測定した。

(5) 喀痰中の抗結核剤の不活性化。INAH は次亜ブロム酸ソーダを用いて不活性化した³⁾。この方法は同時に PAS を不活性化するので、別に 100Y/cc の割合にパラアミノ安息香酸を入れた 3% KH_2PO_4 培地を用いて PAS の不活性化を行つた。SM は 5Y/cc の割合に Cysteine を入れた 3% KH_2PO_4 培地を用いた。

(6) 肺切除病巣の培養は、材料を乳鉢で摩砕し、6～8% 苛性ソーダを等量加え、必要な時にはさらに 4% 苛性ソーダで希釈し、3% KH_2PO_4 培地に接種して対照とし、それと共に各種薬剤耐性検査を行い 60 日後まで観察した。

結 果：

(1) 肺結核患者 500 例の検査成績は第 1 表の如く、500 例中、塗抹陽性培養陰性 36 例 (7.2%) であつた。これら 36 例は検査施行当時、4 例が人工気胸を、31 例が抗結核剤を使用し、他の 1 例は不明であつた。この成績から、抗結核剤の投与と、喀痰中結核菌塗抹陽性培養陰性の現象との間に何らかの関係があるのではないかと考えて、次の検索を行つた。

(2) 抗結核剤使用中の肺結核患者 18 名の検査総数は 485 回、内、塗抹陽性培養陰性 123 回 (25.4%)、塗抹陰性培養陽性 42 回 (8.6%)、他は両者共陽性または陰性であつた。

各症例の菌検出傾向は第 2 表、第 3 表の如く、培養陽性率が高いものと、塗抹陽性培養陰性の場合が屡々みられるものがある。

第 1 図～第 3 図は、これら一部症例の蛍光法 10 視野中の菌数、3% KH_2PO_4 培地上の集落数および 1 日喀出生菌数の関係を図示したものである。今これらの内の代表的な症例、第 4 例 (第 1 図) と第 17 例 (第 3 図) を比較すると、蛍光法 10 視野中の菌数は第 4 例では 1～10 個を第 17 例では 10～100 個を算定し、前者と比較してかえつて多数認めたにもかかわらず、菌培養は陰性であつた。

かゝる現象について以下の臨床的考察を行つた。まず菌塗抹陽性培養陰性の原因として

① 培養の前処置に用いる苛性ソーダが結核菌の増殖

を不能化するこ と。 第1表 肺結核患者500例における蛍光法と培養法の成績

② 塗抹陽性ではあるが喀痰中の結核菌数が少ないこと。	菌検出成績		例数	%
	塗抹	培養		
③ 喀痰中に含有される抗結核剤が喀痰と共に	+	-	36	7.2
	-	+	30	6.0
	+	+	50	10.0
	-	-	384	76.8
	計		500	100.0

に培地に接種せられて菌の発育を阻止すること。

④ 菌の生活力低下ないしは死滅。等が考えられる。

以上の内、①は各例共に苛性ソーダで同じ前処置を行ったものであり、②の菌数については、少数であった第4例にかえて培養陽性率が高いのでこの点を一応除外

第2表 培養陽性率の比較的高い症例

症例番号	使用薬剤	菌検出成績				検総回数
		塗抹	+	-	-	
1	PAS+SM	0	0	3	0	3
2	〃	0	4	2	1	7
3	〃	2	0	4	2	8
4	〃	7	38	20	15	80
5	〃	9	9	15	3	36
6	PAS+SM+INAH	11	3	20	2	36
7	〃	3	10	6	2	21
8	INAH-MS	5	4	3	2	14
9	〃	11	7	16	3	37
10	SM-INAH	5	19	8	5	37

第3表 塗抹陽性で培養陰性率の高い症例

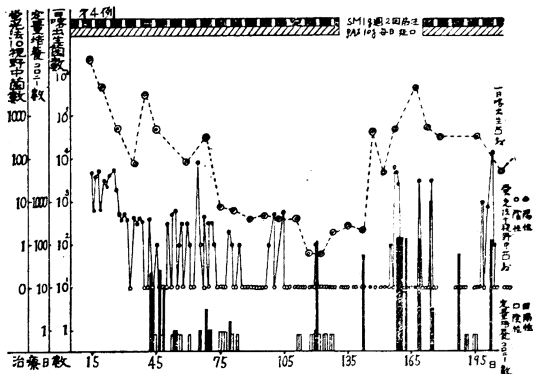
症例番号	使用薬剤	菌検出成績				検総回数
		塗抹	+	-	-	
11	PAS+SM	5	4	0	0	9
12	〃	10	28	6	0	44
13	〃	15	41	6	4	66
14	〃	7	11	1	3	22
15	PAS+INAH	4	3	1	0	8
16	〃	8	1	2	0	11
17	PAS+SM+INAH	9	18	0	0	27
18	INAH-MS	12	2	5	0	19

し、③および④について検討した。

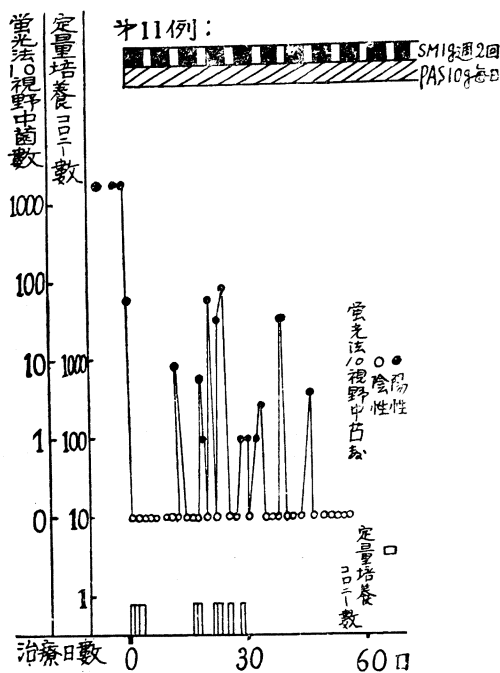
喀痰中に含有される薬剤の濃度を測定した結果、PASは12名31回の測定中、7回のみ12~150%を証明し、INAHは8名35回の内、33回に0.5~2.2%を証明した。すなわち喀痰中にかなり多量の抗結核剤が混在していることが判つた。

小川法による培養では、材料中の薬剤が培地に接種せられて菌の発育を阻止する可能性が考えられるので、喀

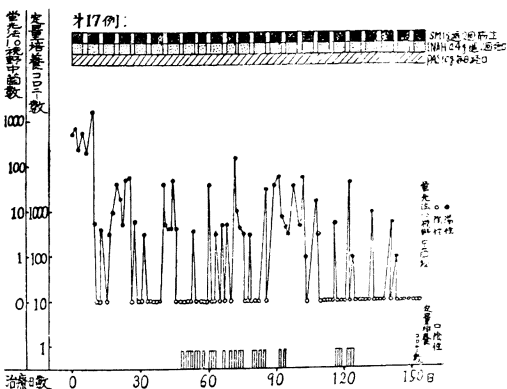
第1図 培養陽性率の比較的高い症例



第2図 塗抹陽性培養陰性例 (その1)



第3図 塗抹陽性培養陰性例 (その2)



痰中のこれら薬剤を前述の如く不活性化した。

PAS不活性化した2例についてみると、

第4表の如く、不活性化しなかつた場合は喀痰20倍稀釈で菌が発育し、不活性化した場合は2倍稀釈で発育をみた。すなわちPAS不活性化の影響を認めた例である。

第5表 薬剤不活性化の培養成績におよぼす影響 (PAS+SM+INAH使用例)

症例	不活性化した薬剤	喀痰稀釈数	培養成績							
			不活性化		無処置					
第1例	INAH+PAS	2	31	24	45	39	0	0	0	0
		20	8	0	0	10	0	11	2	2
第2例	SM	2	0	0	0	0	"			
		20	0	0	0	0	"			
第3例	INAH+PAS+SM	2	20	19	13	52	"			
		20	0	0	0	0	"			
第4例	INAH+PAS	2	130	34	203	182	0	0	0	0
		20	4	8	0	3	48	3	0	26
第5例	SM	2	0	0	0	0	"			
		20	0	2	0	11	"			
第6例	INAH+PAS+SM	2	42	38	38	70	"			
		20	15	13	0	0	"			

第6表 PAS+SM投与中止前後における菌検出成績 (第3例)

化学療法	菌検出成績	塗				計
		+	-	+	-	
投与中	培	-	-	+	+	8
		2	0	4	2	
中止後	10日以後	0	3	2	1	6
	10日以後	0	0	7	6	13

INAH, PAS と同時に SM を不活性化した場合は、第5表の如く、不活性化をしない時は喀痰2倍稀釈ではいずれも陰性であったが、20倍稀釈では菌の発育をみとめ、INAH, PASを不活性化した時は2倍稀釈で陽性であった。SM 不活性化の影響はみとめず、3者を同時に不活性化した時は2倍稀釈で陽性であった。

以上の諸成績から喀痰中に混在する薬剤、なかんずくPASないしは INAH が菌の発育を阻止する場合があると思われる。

第4例と第17例についてみると、第4例は PAS 不活性化に関係なく常に培養陽性、第17例も投与薬剤3者の不活性化の影響をみとめず、いずれの薬剤を不活性化し

た時も培養陰性であった。

最後に菌の増殖力の変化については、抗結核剤の効果が臨床的に認められ治療を中止した第3例について、SM+PAS 投与中止前後の菌検出成績をみると、第6表の如く、投与中は塗抹陽性培養陰性を認めたのに反し、中止後は塗抹成績に関係なく培養陽性回数が増し、塗抹陽性培養陰性を認めなかつた。殊に投与中止10日以後のものではいずれも培養陽性を示した。この例は PAS 不活性化の関係を認めず、無処置の場合と同程度の菌発育をみた。すなわち抗結核剤の混在が多少関係しているとしても、菌自体の生活力、増殖力が化学療法中に減弱し、中止後に復帰したと考えられないであろうか。

さらに肺葉切除または肺区域切除を行った59名、117病巣についてそれぞれ塗抹と培養を行った。これらの内には、塗抹陽性培養陰性であったものが25名35病巣あり、それらの塗抹による菌の形態は正常形は少く、多くは短小桿状あるいは顆粒状を呈していた。喀痰中結核菌の形態も抗結核剤使用の経過につれて、短小桿状、顆粒状あるいは染色力の低下がみられるものがある事等から、菌の生活力、増殖力が減退していると考えられないであろうか。少くとも菌の生活力の変化が大きな因子となつてかゝる現象をみるものと考えられる。

総括ならびに考案

結核病巣内の結核菌が塗抹陽性であるにもかかわらず培養および動物接種では生菌を証明出来なかつた例は、すでに1928年に Hohn⁴⁾が報告し、近くは Katz⁵⁾も化学療法を行っていない症例に同様の結果を認めている。

しかし、抗結核剤が広く使用されるようになって以来、D'Esopo等にはじまつた切除病巣の結核菌検索につづく諸家^{6), 7), 8), 9), 10), 11), 12), 13)}の報告は、いずれも塗抹陽性培養陰性例の増加をみている。また肺内結核病巣と密接な関係にある喀痰の菌検出についても、Collard¹⁴⁾、小林¹⁵⁾、片山¹⁶⁾、小川¹⁷⁾、足達¹⁸⁾等が化学療法中あるいはその後における塗抹陽性培養陰性例を報告している。

此処に報告した500例では36例7.2%が塗抹陽性培養陰性、内31例は抗結核剤使用中であった。

塗抹陽性培養陰性の結核菌がD'Esopo, Smith, Steenken¹⁹⁾等の言うようにすべて死菌であるか、あるいはMc Dermott, Hobby²⁰⁾等が主張する現在の培養方法の限界の外にある生活力が低下した蘇生可能な菌であるかは不明であるが、塗抹陽性培養陰性例の中には、培養に小川法を用いた場合、喀痰中の投与薬剤が材料と共に培地に接種せられて菌の発育を阻止する可能性があるもので、これら薬剤の濃度を測定してPAS, INAH がかなり多量に含まれていることを知つた。そこで薬剤不活性化

を行つた結果、喀痰中に含まれる薬剤のために発育を阻止されているものと、薬剤の影響のないものがあった。治療の経過をおつて菌の消長を詳細に追求した18例の内、使用薬剤不活性化した6例においては、第2, 3表に示した如く、いずれもその影響を認めなかつた。

また、喀痰中の喀出生菌数が減少した時期では、最も殺菌作用が弱いといわれる苛性ソーダで前処置を行つても、Yegian 21), Gray 22) 等の報告の如く、菌の大多数(約80%)が死滅するならば培養は陰性となることが多いと思われる。

ここに述べた第4例、第17例では薬剤不活性化の影響、培養方法に差がなく、また菌の形態は一見いずれも顆粒状であつたが、塗抹で算定菌数の多い第17例が却つて培養陰性であつたのは、菌の増殖力が主な相異であろうと推論した。菌増殖力の変化は『治療結核病巢中の結核菌の生残と蘇生に関する Panel Discussion の報告』(Am. Rev. Tuberc. 68. 3. 477. 1953)に種々論議されている如く、抗結核剤の作用にのみよるのではないのであろうが、しかし抗結核剤が菌の増殖力の喪失に対して大きな役割を演じているものと考えられる。

もちろん、現在蛍光顕微鏡下に認める抗酸性物質のすべてが結核菌ないしはこれに由来するものであると断言出来ないが、少くとも染色力が低下した桿状あるいは顆粒状のものが、治療の経過と共に出現するので、これらの多くは結核菌ないしはその退化変性に陥つたもの、あるいは崩壊産物であろうと推察した。

結 語

(1) 肺結核患者500例の同一喀痰について蛍光法と培養法をあわせて行い、塗抹陽性培養陰性36例(7.2%)であつた。内31例が抗結核剤使用中であつた。

(2) 抗結核剤使用中の肺結核患者18名について喀痰中結核菌喀出総数が減じた時期に蛍光法と培養検査両者を頻回行い、塗抹陽性で培養陰性率の比較的高い症例と、培養陽性率の高い症例がみられたので、それぞれの代表例について検討した。諸成績から推論して、かゝる現象の主な因子は、抗結核剤が関与して現われた菌増殖力の変化であろうと考えた。

綴筆するに当り御指導御校閲を戴いた医長小山善之博士、検査科小酒井望博士、御協力下さつた結核病棟三上次郎博士、同僚石川哲也医学士に深謝す。なお本

研究に用した費用の一部は厚生省治療研究費によつた。記して感謝する。本文要旨は第3回化学療法学会において発表した。

文 献

- 1) 螢光顕微鏡研究協議会：日本医事新報，1588：28，昭29.
- 2) 小酒井他：臨床病理，1：32，1953.
- 3) 高橋：最新医学，10：3，648，昭30.
- 4) Hohn, J. : Zbl. f. Bact. etc. Abt. 1. Orig., 98. 460. 1928.
- 5) Katz, H.L. : 第12回米国化学療法協議会報告 1953. (岩崎：結核抄速，5：4. 295. 1954. 及び橋本：結核の臨床，2：4. 63. 昭29. より引用)
- 6) Medular, E. M. et al. : Am. Rev. Tuberc. 66. (1)36. 1952.
- 7) Beck, F. & Yegian, D. : Am. Rev. Tuberc. 66.(1) 44. 1952.
- 8) Graville, G. E. et al. : Am. Rev. Tuberc. 68.(5) 727. 1953.
- 9) Hobby, G. L. et al. : Am. Rev. Tuberc. 70. (2). 191. 1954.
- 10) 伊藤他：結核，29：(4). 138, 1954.
- 11) D'Esopo, N. : 第12回化学療法協議会報告(橋本：結核の臨床，2：(4) 61. 昭29より引用)
- 12) 岡他：結核，特集号 昭29. 及び 昭30.
- 13) 石川：発表予定
- 14) Collard, P. : Lancet, No.6778, 155, 1953.
- 15) 小林：衛生検査，3：(3). 24. 昭29.
- 16) 片山：衛生検査，3：(3). 24. 昭29.
- 17) 小川他：日本医事新報，No.1590. 27. 昭 29.
- 18) 足達：日結，12：(11), 816. 昭28.
- 19) D'Esopo, N. } Am. Rev. Tuberc. 68 :(3), 477.
Smith, D. } 1953.
Steenken W. }
- 20) Mc Dermott, W. } : Am. Rev. Tuberc. 68. (3)
Hobby, G.L. : } 477. 1953.
- 21) Yegian, D. : Am. Rev. Tuberc, 66. (5) 629., 1952.
- 22) Gray, D. F. et al. : Am. Rev. Tuberc. 69. 6. 191. 1954.