

# 抗結核剤耐性結核菌の呈色反応

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所  
(所長 隈 部 英 雄)

受 付 昭 和 32 年 1 月 10 日

## 1. ま え が き

R. Dubos がミコバクテリアの動物に対する毒力とよく平行するものとしてノイトラロート溶液による呈色反応を発表して以来<sup>1)2)</sup>多くの追試,あるいは新法の報告があつた<sup>3)~9)</sup>。R. Dubos はこの反応を細胞化学反応 (cytochemical reaction) と称しているが,その基礎的実験には多くを触れていない。著者は種々の面より基礎的諸条件を設定し各条件下で諸種呈色反応をこころみこれら反応が条件の差異によりいかに影響されるかを検討した<sup>6)</sup>。その結果呈色反応は諸条件により必ずしも安定した成績を示さず,特に菌側の培養条件,發育状態により呈色度に相当の差があることを知つた。また BCG がよく呈色するところから呈色反応が毒力と完全な平行関係にあるということもできないと思われた。BCG は反応が弱いという報告が多いが<sup>1)3,7)</sup>, われわれのところでは,くり返し実験を行い,むしろ人型,牛型結核菌より反応がつよいという結果を得た<sup>6)</sup>。この相違もあるいは BCG の培養条件等の違いにもとずくものかもしれない。さらに患者喀痰よりの分離株で培養所見上有毒結核菌か否か断定できない10数株につき呈色反応と動物実験を併用して行い毒力の強弱はもちろん,毒力の有無についても反応と動物実験が一致しないことが往々あることを知つた。実験に供した菌株が結核菌として典型的な培養所見を示していないものがほとんどであつたために不一致例が多かつたと思われるが,いずれにしても一つの呈色反応のみによつて毒力あるいは強弱を判定するのは危険であるという結論を得た<sup>8)</sup>。本稿においてはさらに進めて抗結核剤耐性菌の呈色反応につき検討を加えた。耐性株の呈色反応に関する報告は僅少かつ断片的であるので<sup>10)11)</sup>, SM, PAS, INH 三薬剤の耐性菌の呈色反応を耐性度別に系統的に検討した。R. Dubos 以来発表された菌塊の呈色反応には色素としてノイトラロートを使うもの, ニールブルー, 2-6-dichloro phenolindophenol を使うものさらに亜硫酸ソーダによつて還元されたフクシン溶液を用いるものの4法があるが本研究においては, ノイトラロートとフキシンの亜硫酸ソーダ還元溶液を用いた二呈色反応によつて観察した。

## 2. 実験方法

小川培地で患者の喀痰より分離した Streptomycin (S M と略), Paraaminosalicylic acid (PAS と略), Isonicotinyl hydrazid (INH と略) に対する耐性菌につきノイトラロート反応および亜硫酸ソーダ・フクシン反応を行う。SM 耐性菌は 0.5 $\gamma$ , 1 $\gamma$ , 10 $\gamma$ , 100 $\gamma$ , 1000 $\gamma$ , PAS 耐性菌は 1 $\gamma$ , 10 $\gamma$ , INH 耐性菌は 0.01 $\gamma$ , 0.1 $\gamma$ , 1 $\gamma$ , 10 $\gamma$ , 100 $\gamma$ , の耐性度に分類し集落の発生し得た培地に含有される薬剤最高濃度をもつてその菌株の耐性度とする。呈色反応には実験に供した菌の対照培地 (薬剤をふくまぬ培地) に発生した菌塊を用いる。呈色反応の方法については,既に前2回の論文<sup>6)8)</sup>で詳述したからここでは簡単に記すにとどめる。

### i) ノイトラロート反応 (N-R と略)

菌塊を二度 50%メチルアルコールで洗い,これに p. H. 8.9 のアルカリ性緩衝液 2cc と 0.05% ノイトラロート 0.1cc を加え菌塊の呈色度をみる。

ii) 亜硫酸ソーダ・フクシン反応 (S-F と略) 菌塊 1 白金耳を培地をかきとらないように丁寧にとり,これを亜硫酸ソーダ・フクシン試薬中にいれ呈色度をみる。呈色度は両反応とも番号をもつてあらわし大きい番号ほど,呈色度がつよい。

## 3. 実験成績

### (1) SM耐性菌の呈色反応

#### i) N-R 反応

52株につき検討を加えた。その内訳は SM 感性株 3, 0.5 $\gamma$  耐性株 4, 1 $\gamma$  耐性株 10, 10 $\gamma$  耐性株 19, 100 $\gamma$  耐性株 8, 1000 $\gamma$  耐性株 8 である。各耐性株の耐性度は表 1 に示す通りである。

平均呈色度についてみると感性株は 7.7, 0.5 $\gamma$  耐性株は 7.5, 1 $\gamma$  耐性株は 7.1, 10 $\gamma$  耐性株は 7.3, 100 $\gamma$  耐性株は 6.4, 1000 $\gamma$  耐性株は 6, である。耐性度によつて呈色度に差があるか否か推計学的に検定をすると,その分散分析表は表 2 に示す通りであるが 1% 以下の危険率で耐性度によつて呈色度に有意の差があることを知つた。すなわち高度耐性株は感性株あるいは 10 $\gamma$  以下の低度耐性株に比し呈色度が低いと思われる。

表 1 SM 耐性菌の N-R 反応

| $\begin{matrix} R(r) \\ d \end{matrix}$ | 0   | 0.5 | 1   | 10  | 100 | 1000 | $\Sigma f'$ |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-------------|
| 4                                       |     |     |     |     | 1   | 1    | 2           |
| 5                                       |     |     |     | 1   | 1   | 2    | 4           |
| 6                                       |     |     | 3   | 2   | 1   | 2    | 8           |
| 7                                       | 1   | 2   | 3   | 7   |     | 2    | 15          |
| 8                                       | 2   | 2   | 4   | 9   | 5   | 1    | 23          |
| $\Sigma f$                              | 3   | 4   | 10  | 19  | 8   | 8    | 52          |
| $\Sigma fd$                             | 23  | 30  | 71  | 138 | 51  | 48   | 361         |
| m                                       | 7.7 | 7.5 | 7.1 | 7.3 | 6.4 | 6    | 6.8         |

R: 耐性度( $\gamma$ )      f: 各耐性度の度数  
b: 呈色度          f': 各呈色度の度数  
m: 各耐性度の平均呈色度

表 2 表 1 の分散分析表

| 変 動 因 | 自 由 度 | 平 方 和 | 平均平方    |
|-------|-------|-------|---------|
| 耐 性 度 | 5     | 39.7  | 7.94 ※※ |
| 個 体   | 46    | 81.1  | 1.76    |
| 全 体   | 51    | 120.8 |         |

ii) S-F反応

33株につき検討し,その内訳は表3に示す通りである。

表 3 SM耐性菌の S-F 反応

| $\begin{matrix} R(r) \\ d \end{matrix}$ | 0   | 0.5 | 1   | 10  | 100 | 1000 | $\Sigma f'$ |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-------------|
| 1                                       |     |     |     |     |     | 3    | 3           |
| 2                                       |     |     |     |     |     |      |             |
| 3                                       |     |     | 2   |     |     | 1    | 3           |
| 4                                       | 4   | 1   | 2   | 7   | 2   | 3    | 19          |
| 5                                       | 2   | 2   |     | 3   |     | 1    | 8           |
| $\Sigma f$                              | 6   | 3   | 4   | 10  | 2   | 8    | 33          |
| $\Sigma fd$                             | 26  | 14  | 14  | 45  | 8   | 23   | 128         |
| m                                       | 4.3 | 4.6 | 3.5 | 4.5 | 4   | 2.9  | 3.9         |

記号は表 1 参照

1000 $\gamma$  耐性株の平均呈色度は 2.9 で他の耐性株ないし感性株に比し低い。分散分析表(表 4)により株別間の検定をすると 1%以下の危険率で耐性度により呈色度により有意の差を認めた。

表 4 表 3 の分散分析表

| 変 動 因 | 自 由 度 | 平 方 和 | 平均平方    |
|-------|-------|-------|---------|
| 耐 性 度 | 5     | 20.6  | 4.12 ※※ |
| 個 体   | 27    | 23.0  | 0.85    |
| 全 体   | 32    | 43.6  |         |

(2) I NH耐性菌の呈色反応

i) N-R反応

48株につき検討したが,その細別は表5に示す如くである。平均呈色度は感性株 7.5, 0.01 $\gamma$  耐性株 7.7, 0.1 $\gamma$

表 5 I NH耐性菌の N-R 反応

| $\begin{matrix} R(r) \\ d \end{matrix}$ | 0   | 0.01 | 0.1 | 1   | 10  | 100 | $\Sigma f'$ |
|-----------------------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-------------|
| 4                                       |     |      |     |     | 1   |     | 1           |
| 5                                       |     |      | 1   | 2   | 1   |     | 4           |
| 6                                       |     |      |     | 5   |     |     | 5           |
| 7                                       | 2   | 1    | 2   | 5   | 4   | 2   | 16          |
| 8                                       | 2   | 2    | 5   | 4   | 7   | 2   | 22          |
| $\Sigma f$                              | 4   | 3    | 8   | 16  | 13  | 4   | 48          |
| $\Sigma fd$                             | 30  | 23   | 59  | 107 | 93  | 30  | 342         |
| m                                       | 7.5 | 7.7  | 7.4 | 6.7 | 7.2 | 7.5 | 7.1         |

記号は表 1 参照

耐性株 7.4, 1 $\gamma$  耐性株 6.7, 10 $\gamma$  耐性株 7.2, 100 $\gamma$  耐性株 7.5, で分散分析表を作ると表6のようになる。耐

表 6 表 5 の分散分析表

| 変 動 因 | 自 由 度 | 平 方 和  | 平均平方  |
|-------|-------|--------|-------|
| 耐 性 度 | 5     | 5.321  | 1.064 |
| 個 体   | 42    | 45.929 | 1.093 |
| 全 体   | 47    | 51.250 |       |

性度別による呈色度には推計学的に有意の差はない。(危険率 5%)

ii) S-F反応

33株のうち, 感性株 6, 0.01 $\gamma$  耐性株 3, 0.1 $\gamma$  耐性株 3, 1 $\gamma$  耐性株 8, 10 $\gamma$  耐性株 10, 100 $\gamma$  耐性株 3 であ

表 7 I NH 耐性菌の S-F 反応

| $\begin{matrix} R(r) \\ d \end{matrix}$ | 0   | 0.01 | 0.1 | 1   | 10  | 100 | $\Sigma f'$ |
|-----------------------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-------------|
| 1                                       |     |      |     | 3   |     |     | 3           |
| 2                                       |     |      |     |     |     |     |             |
| 3                                       |     |      | 2   |     | 1   |     | 3           |
| 4                                       | 4   | 2    | 1   | 3   | 7   | 2   | 19          |
| 5                                       | 2   | 1    |     | 2   | 2   | 1   | 8           |
| $\Sigma f$                              | 6   | 3    | 3   | 8   | 10  | 3   | 33          |
| $\Sigma fd$                             | 26  | 13   | 10  | 25  | 41  | 13  | 128         |
| m                                       | 4.3 | 4.3  | 3.3 | 3.2 | 4.1 | 4.3 | 3.7         |

記号は表 1 参照

つた。各耐性株の示す呈色度は表 7 に示す如くである。平均呈色度は感性株 4.3, 0.01 $\gamma$  耐性株 4.3, 0.1 $\gamma$  耐性株 3.3, 1 $\gamma$  耐性株 3.2, 10 $\gamma$  耐性株 4.1, 100 $\gamma$  耐性株 4.3, であつた。分散分析表(表 8)を作つて推計学的検定を行うと耐性度別による呈色度には有意の差がない。(危険率 5%)

表 8 表 7 の 分 散 分 析 表

| 変 動 因 | 自 由 度 | 平 方 和 | 平均平方  |
|-------|-------|-------|-------|
| 耐 性 度 | 5     | 8.51  | 1.702 |
| 個 体   | 27    | 28.99 | 1.074 |
| 全 体   | 32    | 37.5  |       |

(3) PAS耐性菌の呈色反応

PAS耐性菌についてはノイトラルロート反応のみを行つた。実験には 44 株を供し、その内訳は感性株 10, 1 $\gamma$ 耐性株 4, 10 $\gamma$ 耐性株 30, である。表 9 にみる如く平

表 9 PAS 耐性菌の N-R 反応

| R( $\gamma$ )<br>d | 0   | 1   | 10  | $\Sigma f$ |
|--------------------|-----|-----|-----|------------|
| 4                  |     |     |     |            |
| 5                  |     |     | 1   | 1          |
| 6                  |     | 1   | 8   | 9          |
| 7                  | 5   |     | 4   | 9          |
| 8                  | 5   | 3   | 17  | 25         |
| $\Sigma f$         | 10  | 4   | 30  | 44         |
| $\Sigma fd$        | 75  | 30  | 217 | 322        |
| m                  | 7.5 | 7.5 | 7.2 | 7.3        |

記号は表 1 参照

均呈色度は感性株 7.5, 1 $\gamma$  耐性株 7.5, 10 $\gamma$ 耐性株 7.2 であり耐性度別ではその分散分析表は表 10 に示すがほとんど差がない。推計学的に検定しても有意の差はない。

(危険率 5%)

表 10 表 9 の 分 散 分 析 表

| 変 動 因 | 自 由 度 | 平 方 和 | 平均平方  |
|-------|-------|-------|-------|
| 耐 性 度 | 2     | 0.68  | 0.34  |
| 個 体   | 41    | 32.87 | 0.802 |
| 全 体   | 43    | 33.55 |       |

(4) SM, INH, PAS耐性の交互作用

本実験の供試菌株は必ずしも単独耐性株のみではなかつたので, SM耐性と INHおよび PAS耐性との交互作用をみるために同一菌株で SM, INH 両者の耐性を同時に検査した 28株, SM, PAS 両者の耐性を同時に知り得た 19株につき各薬剤に対する高度耐性菌と低度

表 11 INH耐性菌と SM耐性菌の交互作用

| INH 耐性菌<br>SM 耐性菌 | L | H |
|-------------------|---|---|
| L                 | 7 | 9 |
| H                 | 7 | 5 |

L : 低度耐性菌 数字は菌株数  
H : 高度耐性菌

耐性菌に大別し交互作用の影響が大であるか否かをみた。これは INH耐性菌, PAS耐性菌ともに耐性度別には呈色度に有意差がなかつたが INH, PAS 高度耐性菌が同時に SM 高度耐性になつているためそれ自体の呈色度が低まり全体として耐性度別の差が出ないの

表 12 PAS耐性菌と SM耐性菌の交互作用

| PAS 耐性菌<br>SM 耐性菌 | L | H |
|-------------------|---|---|
| L                 | 1 | 8 |
| H                 | 3 | 7 |

L : 低度耐性菌 数字は菌株数  
H : 高度耐性菌

ではないかという疑問をもつたからである。表 11に SM耐性と INH耐性, 表 12 に SM耐性と PAS耐性との相互の関係表を示した。SM耐性菌は 10 $\gamma$  以下を低度耐性菌, 100 $\gamma$  以上を高度耐性菌に大別し INH耐性菌は 1 $\gamma$  以下, 10 $\gamma$  以上 PAS耐性菌は 1 $\gamma$  以下, 10 $\gamma$  以上をそれぞれ低度耐性菌および高度耐性菌に大別して検討した。両表にみる如く SMと INH, SMと PAS の交互作用は特につよいようには思えない。ことに SM高度耐性菌が SM低度耐性菌に比し INHあるいは PAS 高度耐性菌に偏在している事実とは全くみられず前述の如き SM高度耐性菌の偏在による INHおよび PAS耐性菌への影響は重視する必要はないと思われる。

4. 考 案

結核菌の抗結核剤に対する耐性獲得の機序は今なお不明の点が多い。耐性菌が感性菌と化学的構成成分において差異があるか否かについても多くの研究がある。特に SM耐性菌に関する生化学的研究は相当数にのぼり SM耐性菌には Desoxyribo- 核酸が著明に増加している<sup>12)</sup> という報告があり, さらに菌体リポイドに両者の生化学的差異を求めんとする研究もなされているが耐性菌と感性菌との化学的構成成分に著明な差異があるということは明言できないのが現状である。菌塊呈色反応の本態も詳細にわたつては不明でありノイトラルロート反応では, その基礎実験によつて菌体周囲のリポイドが該反応に非常に関与していることは知られたが細部については不明であつた。以上の観点から耐性菌と感性菌の呈色反応にさしたる差は認められないのではないかと考えたが SM耐性菌において高度耐性菌はノイトラルロート反応, 亜硫酸ソーダ・フクシン反応, 両者とも呈色度が明らかに低下していることを知つた。特に SM1000 $\gamma$  耐性菌においてこの傾向は著明である。しかしながら鳥型菌あるいは抗酸性雑菌の呈色度ほどは低下しておらず哺乳動物結核菌の呈色度範囲内である点, SM高度耐性菌の

菌体周囲成分に質的な差異より量的差異を考えた方がよいのではないかと思う。一方 INH耐性菌あるいはPAS耐性菌では耐性度による差はいずれも有意でない。両耐性菌ともSM耐性との交互作用は、さして強くないと思われるからINH耐性菌、PAS耐性菌の場合は恐らく高度耐性菌でも、低度耐性菌でも、その菌体周囲成分に質的、量的な差がないからではないかと思われる。耐性菌と感性菌の化学的構造の差異が明らかでない今日、SM高度耐性菌の菌塊呈色反応が何故感性菌と比べて低下しているかを解明することは困難であるが、この事実は極めて興味のあることであると思われる。

## 5. 結 論

患者喀痰より分離せるSM, PAS, INH に対する耐性結核菌の呈色反応に関し考察を加え、次の如き知見を得た。

- (1) SM100 $\gamma$  および 1000 $\gamma$  耐性菌のノイトラルロート反応は感性菌および 10 $\gamma$  以下の低度耐性菌に比し明らかに低下している。
- (2) SM1000 $\gamma$  耐性菌の亜硫酸ソーダ・フクシン反応もまた明らかに低下している。
- (3) INH 耐性菌および PAS 耐性菌は耐性度によって、呈色反応に著しい差は認められない。

稿を終るにあたり終始御懇篤なる御指導を賜った臨床検査科長工藤博士に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 1) Dubos, R.: Am Rev. Tbc., 58-6, 698~699, 1948.
- 2) Dubos, R.: Am. Rev. Tbc., 60-3, 384, 1949.
- 3) Desbordes, J.: Rev. de la tbc., 17-8, 849~857, 1953.
- 4) Wilson, F. I.: Am Rev. Tbc., 65-2, 187~193, 1952.
- 5) Hein, H.: Z. Tbk., 103-6, 339~343, 1953.
- 6) Toyohara, M.: Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., 1, 41~55, 1956.
- 7) 松尾仁: 結核, 31-11, 651~657, 1956.
- 8) 豊原希一: 結核, 32-1, 1957. 掲載予定
- 9) 松尾仁: 結核, 31-12, 728~732, 1956.
- 10) Ingrano, F.: Ann. Ist. c. Forlanini, 13-4, 333~345, 1952.
- 11) Nitti, V.: Arch. di Tisiol., 7-12, 974, 1952.
- 12) 日比野進: 結核, 29 巻増刊号, 28~40, 1954.