

小川培地上における結核菌と思われるコロニー消失の経験

富 田 利 夫

稲田登戸病院 (院長 清原審卿博士)

受付昭和32年7月10日

I 緒 言

結核菌の融解について、Deycke および Much がすでに1909年に発表しているが¹⁾、私は「肺結核症の誘発試験」という渡辺ら²⁾の考えにしたがつて気管枝造影施行後の検痰を行つている際、一旦小川培地上に発生した結核菌と思われるコロニーが、ある期間の後に消失してしまう例に遭遇し疑問を抱いていたところ²⁾、最近数編の「結核菌融解」に関する論文を読み、かかる現象の存在することを知り、私の例もここに報告したいと思う。

II 症例ならびに検査方法

1) 観察対象：稲田登戸病院の入院および外来肺結核患者で、昭和30年6月1日以降昭和31年7月5日までに気管枝造影を行い次に述べる方法により検痰を行つた例、造影を行わず同じ形式で検痰を行つた例および昭和30年11月2日より昭和31年7月3日までに通常の検痰を行つた例を対象とした。

2) 検痰方法：i) 気管枝造影施行例：造影施行の前日から9日間一切の抗結核剤投与を中止し、次の要領で喀痰を集めた。

(i) 造影前集痰：造影前日より造影当日朝までの全喀痰 (昭和31年4月12日以降検査)。

(ii) 造影直後痰：造影終了後直ちに体位変換等により可及的造影剤を喀出せしめたもの (昭和30年8月31日まで検査実施)。

(ii) 造影後第1日痰：造影終了帰宅時刻より翌日の同時刻までの全喀痰。

(ii) 造影後第3日および第7日痰：造影後第3日の帰宅時刻より翌日の同時刻までおよび第7日～第8日の同時刻までの全喀痰。

ii) 気管枝造影非施行例 (対照集痰)：気管枝造影を行わずに、造影例の造影後第1, 3, 7日痰に相当する集痰を行つたもので、造影後の検痰を主目的としていたので対照集痰と名付けた。

iii) 一般検痰例：前夜の抗結核剤投与を中止し、早朝痰を採取した。

これらをそれぞれ4%苛性ソーダで前処理し、2本の3%小川培地に接種して、集痰例では3カ月、一般検痰例は2カ月まで1カ月毎に観察した。なお一部にはいわゆる塗抹陽性培養陰性例として6カ月間観察したのものもある。綿栓は接種の翌日ゴムキャップに換えた。造影後は、一般に喀痰量が増すが、特に多い場合はこれを大型の遠沈管に移し4%苛性ソーダで均等化し、3000rpm 15分間遠沈し、沈渣を培養した。なお同時に行つた塗抹検査はいずれも蛍光法によつた。

表 1 コロニー消失の発現頻度

種 類 成 績	一般検痰	対照集痰	造影前集痰	造影直後痰	造影後 第1日痰	造影後 第3日痰	造影後 第7日痰
検 査 件 数	4466	143	144	94	445	410	584
計	4753			1333			
培 養 陽 性	453	17	20	11	55	65	47
計	490 (10.3%)			178 (13.4%)			
培 養 陰 性	4013	125	124	76	378	336	527
計	4262 (89.7%)			1117 (83.8%)			
培 地 崩 壊	0	1	0	7	12	9	10
計	1 (0.02%)			38 (2.8%)			
コロニー消失例	2	0	0	2	3	2	2
数 計	2 (0.04%)×			9 (5.1%)×			

注 ×：培養陽性に対するコロニー消失例数の百分率。

III 成 績

1) 発現頻度：表1に示す如く、造影に関係のない検痰で2例、造影後の検痰で9例計11例に見られその培養陽性に対する出現率は、前者 0.04%、後者 5.1%で、有意の差をもつて造影後検痰例に多い。なお一般検痰例で前記期間以前に1例を経験している。

2) コロニー消失状況：各症例について、コロニー消失の経過を表2に示す。消失は昭和30年6月7月および昭和31年5月に培養した例に多く、消失例中8例は塗抹陰性で、塗抹陽性例も多くはガフキー号数が少なく、消失したコロニー数は10個以内が大部分である。また培養1カ月目にはコロニーとして認められたが、2カ月目には認められなくなつたものが9例あり、症例10は、一般検痰でガフキー2号であつたが、培養2カ月の判定で陰性であつたため、いわゆる塗抹陽性培養陰性例として長期間観察中、22週からコロニーが認められるようになつたが、26週に至りその大部分が消失した例である。この期間中にも、他の1本の試験管中のコロニー数は増加していた。また2本の培地に生じたコロニーが共に消失したのが2例、1本だけ消失したものが4例、1本の培地だけに生じたものの消失例が6例であつた。生じたコロニーの一部だけが消失したものは4例であつた。

表2 コロニー消失の状況

症例番号	消失時期	検痰種類	ガフキー号数	コロニー数*		
				1カ月	2カ月	3カ月
1	昭和30. VI	造影後7日	0	0/3	0	0
2	VI	1日	1	0/2	0	0
3	VI	3日	0	0/1	0	0
4	VII	直後	0	0/2	0	0
5	VII	直後	3	0/100	4/150	0/150
6	VII	7日	0	0/2	0	0
7	XII	3日	5	0	13/20	0/21
8	31. I	1日	0	5/10	0	0
9	IV	1日	0	0/8	0	0
10 ^x	30. VII	一般検痰	2	12w) 0	22w) 15/30	(26w) 1/33
11	31. V	"	0	28/50	18/55	
12	V	"	0	18/30	0	

注 x: 塗抹陽性培養陰性例として長期間培養進行中のもので2週間毎に観察。

※ 培養には小川培地2本を使用、分子および分母は各培地上のコロニー数を示す。

表3 コロニー消失例の臨床像

症例	所見 検査法	コロニー消失前(月)						コロニー 1	コロニー消失後(月)						病 空 度 洞	化 学 療 法			耐 性			
		VI	V	IV	III	II	I		I	II	III	IV	V	VI		S	M	P	S	M	P	
		AS	AS	AS	AS	AS	AS		AS	AS	AS	AS	AS	AS		INH	INH	INH	INH	INH	INH	
1	塗培	-	-	-	-	-	-	消 失	-	-	-	-	-	-	中	-	66	1637	2			
2	塗培			-	-	-	-	"	-	G1	-	-	-	-	中	?	57	2132	2			
3	塗培	-	-	-	-	-	-	"	-	-	-	-	-	-	軽	-	40	1880	0			
4	塗培				-	-	-	"	-	-	-	-	G1	中	+	55	1960	7				
5	塗培	G5 27/32	G4 -34/60	G5 24/38	-	-	G10 ++	"	-	G4	G5	G4	G5	-	中	+	94	2841	0	10y 3y	10y	0y
6	塗培					-	-	"	-	-	-	-	-	軽	-	80	5800	10				
7	塗培	-	-	-	-	G1	-	"	-	-	-	-	-	中	+	85	2890	0	3y	1000y 3y	0y	
8	塗培			-	-	-	-	"	-	-	-	-	-	軽	-	64	1960	9.6				
9	塗培	-	-	-	-	-	-	"	-	-	-	-	-	軽	-	61	5290	21				
10	塗培	G3 30/+	G8 4/5	G3 2/41	-	G3 1/60	-	"	G1	G4	G2	G3	G2	-	重	+	175	4780	0	100y	100y	0y

11	塗培	G2 G1 G2 - - 0/18 20/11 1/5 : 8/55	"	- - - - - + + - - -	中	+	26	1200	13	10y 3y	10y 1y	1y
12	塗培	-	"	- - - - - - - - - -	中	-	2	0	0			

注 G: ガフキー号数 耐注: 100y~3y=不完全耐性100y,完全耐性 3y の意
10y: 不完全耐性 10y の意

3) 症例の臨床経過: 表3に一括表示した如くまずコロニー消失の起つた前後6ヵ月間の排菌の状態を見ると, 症例5, 7, 10, 11以外は微量排菌例であり, N. T. Aによる肺結核症の病度は, 軽症4, 中等症7, 重症1である。全例に化学療法が行われており, コロニー消失の時期までに大多数例では SM 50g 以上を使用しているが, 1例でわずか2g 使用したにすぎないものもある。コロニー消失の起つた前後に耐性検査を行つた4例では, いずれも多少の耐性を認めた。

これら消失したコロニーが, 結核菌であるとすれば, 表2に見るような塗抹陽性例については, いわゆる塗抹陽性培養陰性ということになるので, 本観察と同じ期間の塗抹陽性培養陰性について調査した成績を表4に示す。コロニー消失例で, それ以前に塗抹陽性培養陰性を示したものが11例中1例, 以後に示したものが括弧の中に示した2例, 合計3例である。なお症例10, 即塗抹陽性培養陰性で長期培養中コロニーの消失した例は, 培養時期の関係で, この表には含まれていない。

表4 塗抹陽性培養陰性とコロニー消失との関係

成績	種類	一般検痰	対照集痰	造影前集痰	造 影 後			
					直後痰	第1日痰	第3日痰	第7日痰
検査数		4466	143	144	94	445	410	384
塗抹陽性		236 (5.2%)	10 (6.9%)	3 (2.1%)	2 (2.1%)	27 (6.1%)	45 (10.5%)	29 (7.6%)
培養陽性		453 (10.1%)	17 (11.9%)	20 (13.9%)	11 (11.7%)	55 (12.3%)	65 (15.9%)	47 (12.2%)
塗抹陽性培養陰性		34	4	1	1	6	12	9
コロニー消失		2	0	0	2	3	2	2
塗+培とコロニー消失の共存		0	0	0	1 (1)×	0 (1)×	0	0

注 ×: コロニー消失時期以後に塗抹陽性、培養陰性を示した例数。他は消失時以前に示した例数。

4) 2, 3の小実験: コロニーの消失した培地は, 外見上特に変化は認められず, 以後観察を続けても, 新しいコロニーの発生は認められなかつた。培養後4ヵ月目に入つてから, かかる培地6本に H₃₇Rv 株を接種したところ, 全く正常と思われるコロニーが発生し, 融解は認められなかつた。また, 慶大牛場教授の御教示により, 少数のコロニーが発生した培地の試験管に, コロニーの位置をマークしておくようにして1例(症例9)を捕捉しえたが, コロニーの存在したと思われる部にシミのようなものを認めただけで培地には変化なく, この部の塗抹標本(Ziehl-Neelsen法)では抗酸性顆粒の桿状排列を認めたが, この部および凝固水をそれぞれ小川培地に接種しても菌の発育は認められなかつた。

また, 造影後の例に多いので, 造影剤および造影時に使用する各種薬剤を種々組合せて, H₃₇Rv 株と共に接種したところ, 表5に示す如く菌発育の阻害される例は

あつてもコロニーの消失した例はなかつた。

表5 造影剤ならびに局麻薬の結核菌発育に及ぼす影響

試験薬剤	培養後週								発育										
	1	2	3	4	5	6	7	8											
デオキシノジリリン	0 ^{cc}	0 ^{cc}	0 ^{cc}	0 ^{cc}	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			0.1		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1			0.1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.2				-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1			0.05	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1			0.05	0.05	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
				0.1		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
				0.2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				0.1	0.05	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
				0.1	0.05	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: 使用菌株 H₃₇Rv. 使用培地 小川培地。

なお、観察したコロニーは特に着色してはならず、形態にも特徴的なものはなかつたと記憶している。

IV 考 案

結核菌の融解について Deycke および Much は 1909 年に、Lezithin, Cholin らのリポイド物質が、極めて短時間で結核菌を融解させ、特に 50~56°C に保つと著明であると報告している。¹⁾ これに対し多くの追試があり、賛成もあるが反対³⁾もある。Isabolinsky⁴⁾ は、脂肪含有物質が結核菌の脂肪蠟様被膜を破壊してその抗酸性を喪失せしめ、Much 顆粒に、さらには単なる小顆粒にまでしてしまうと言う。また、Porter⁵⁾ は、種々の組織のグリセリン抽出液が結核菌の抗酸性を喪失せしめ融解を起すと報じているが、McJunkin⁶⁾ はこれに反対し、オレイン酸が結核菌融解酵素を含有しているということも考えられるが、稀釈されないオレイン酸の存在の下においてだけ活性な結核菌中の非耐熱性酵素によつて融解作用が営まれるようであると述べている。Nègre⁷⁾ は、ある種の脂肪族系脂肪酸により、結核菌の抗酸性と毒力が失われると言つている。かかる報告を見ると、私の例の多くで使用されている気管枝造影剤中の油脂成分が、菌を消失せしめた因子ではあるまいかと考えられるが、H₃₇Rv を用いた実験ではこれを証明しえなかつた。

Steenken^{8) 9)} は、Gentianviolet 鶏卵培地上で陳旧な H₃₇Rv のコロニーが液化、融解し、その中に新しいコロニーが発生したが、この時の培地の pH は 4.2~4.6 であつて、液化した部分の Ziehl-Neelsen 染色標本では一部分抗酸性を示したが、2 ヶ月以内には菌の発育を認めなかつたと報告している。私の観察もほぼ同様であるが、コロニー消失の起つた培地に H₃₇Rv の発育を認めた点から、pH については一致しないであろうと思われる。また、融解後に新しいコロニーは発生しなかつた。Steenken は、この変化は融解コロニーの Berkefeld 濾液中にも含まれている lytic principle が一定の pH の下で作用した結果、菌の Autolysis または lysis が起り、最初のコロニーが破壊されるのであると考え、酵素をも考慮に入れている。Baisden¹⁰⁾ は結核菌をアルコールおよびエーテルで処理し水中に懸濁すると、抗酸性喪失と共に自解が起ることを報告し、その至適温度は 37°C 附近、pH は 5.2~7.0 であり、結核菌は Autolytic Agent あるいは酵素を有し、これはかなりの活性を有すると考えられると述べている。Redmond^{11, 12)} は多量の葡萄糖と少量の NH₄Cl を含む培地上に、37°C で培養すると、その増殖が速やかに頂点に達した後自家融解が起り、低温および高温では融解が減少または停止することから、自解は酵素によるものであろうと考えている。私は H₃₇Rv 接種実験より、必ずしも酵素だけでは融解の説明は困難であらうと考え

ている。

Marshak¹³⁾ は多量の糖と少量の窒素源を含む培地に結核菌を培養すると菌が融解することを認め、結核菌が発育するために自らの窒素を利用するので融解が起ると考えた。これは、葡萄糖含有窒素欠除培地に結核菌を培養した後 NH₄Cl を加え、菌の発育が見られるまでに一定の期間を必要とすることから、菌が培地中の窒素を利用する酵素を失い、その代りに菌体内窒素を利用する酵素を有するようになったためと考え、これと菌の自解は関係があると述べている。浅見^{14) 15)} は結核菌の増加と共に培地中の窒素量およびグリセリン量が減少し、pH も酸性に傾くことを認め、菌体の乾燥量は Sauton 培地使用の場合 6 週より漸次減少すると述べている。Bowman¹²⁾ は菌の発育と自解は培地に 1% の割合に葡萄糖が含まれる場合に最も著明で、これ以下では発育にすべての葡萄糖が消費され、自解の始る前に発育が止つて自解は起らず、Schaefer と同様自解が起るためには葡萄糖またはグリセリンの存在が必要であるが、その継続のためには必要でないと報告し、嫌気性条件下においても菌の融解が認められたとしている。かれは Spiegelman の報告を引用して Marshak の酵素交代説に反対し、結核菌が Lysogenic な菌であることに自解の説明を求めんとし、葡萄糖欠除培地に融解の見られぬことを説明しフェージ説または prophage 説を提唱している。以上は結核菌の融解がその栄養分または代謝に関係を有することを示す報告であつて、私の経験例で、コロニー消失が比較的同時期に起つていることから培地の不完全ということが考えられ、同時に作製した他の培地に、他の人の結核菌が発育できたからと言つて、培地が完全であつたという証明にはならないであろう。しかし鶏卵培地では窒素の不足は考えられず、H₃₇Rv をコロニー消失培地に接種した成績から見れば、少なくとも正常な結核菌に対しては、かかる異常な現象を起すほどの栄養分の不足はなかつたと言ひうるであろう。

Choremis¹⁶⁾ は患者から分離した結核菌の継代培養で、3~6 週で一度発生したコロニーの一部あるいは全部が融解することのあるのに気付き、この部分を染色すると抗酸性の残渣を認めるが菌の形態をなしていないことを報告し、これを培養しても菌の発生はなく、モルモットに病変を生ずることもできず、融解部分と生菌との混合物を培養すると菌の発育はないか抑制されることから、この原因はフェージであろうと述べている。一方 Froman¹⁷⁾ は結核菌フェージ 4 種を発見しており、結核菌融解の一因として重視すべきであろう。

抗結核剤の影響については、その投与中断下にも見られること、および培養の始めの 1 週間以内に SM を加えると融解は起らないという Redmond¹⁸⁾ の成績に徴して、一応考慮しなくてもよいと思われる。

また、微量排菌例に多いこと、塗抹陽性培養陰性例があること¹⁹⁾、H₃₇Rvの発育できた培地上で融解消失したと等から、菌自体の弱体化も一応考慮すべきであろう。

以上は、自験例において一旦発生したコロニーが結核菌であったことを仮定しての議論であつて、これが非病原性抗酸性菌でないとする根拠はない。消失部分の塗抹染色標本で抗酸性顆粒を認めたと培養陰性だつた点は、Steenken および Choremis と同様であるが、最近問題になりつつある非病原性抗酸性菌が、染色上形態上、病原性菌と鑑別し難いと言われるので²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾、今後さらにこの点をも検討する心算である。

V 総括ならびに結び

一般および気管枝造影後の検痰で、一旦小川培地上に発育した結核菌と思われるコロニーが消失する例に遭遇した。

(i) 消失は一般検痰で2例、培養陽性例数の0.04%に認められ、その他に1例、気管枝造影後に9例、5.1%に発現した。

(ii) かかる現象はガフキー号数、コロニー数の少ないものに見られ、全例に化学療法が行われており、多くは抗結核剤多量使用後であつたが、1例でSM2gを使用したにすぎぬものにも認められ、耐性検査を行った例では、多少とも耐性を認めた。

(iii) コロニーの消失したと思われる部位の塗抹・染色標本(Ziehl-Neelsen法)では抗酸性顆粒の桿状排列を認めたと培養陰性であり、コロニー消失培地にH₃₇Rvを接種したところ、正常の発育が見られ、消失は認められなかつた。

(iv) かかる現象の原因には、融解物質の存在、融解酵素、栄養分不足、ファージ等が考えられるが、菌自体の弱体化も考慮すべきであろうと思われる。

(v) 表題を「結核菌と思われるコロニー」としたのは、非病原性抗酸性菌を除外しえないからである。

本報告の要旨は、昭和31年11月、第39回日本結核病学会関東地方会で発表した。

本稿を終るに臨み、御教示を頂いた慶大牛場教授、御校閲を賜った慈大林教授に深謝致します。御指導下さつた国立東京第二病院土屋先生、始終鞭達して下さつた清原院長、御指導、御校閲下さつた渡辺副院長、文献を御知らせ下さつた久保田・北住両先生始め医局諸先生に感謝致します。

文 献

- 1) Deycke, u. Much, Isabolinsky, M. u. Gitowitsch, W. : Z. Immunit., 40 : 303, 1924 より引用.
- 2) 渡辺他: 結核研究の進歩, 17 : 216, 昭32.
- 3) Löwenstein, E., McJunkin, F. A. : Am. Rev. Tbc., 8 : 393, 1923 より引用.
- 4) Isabolinsky, M. u. Gitowitsch, W. : Z. Immunit., 40 : 303, 1924. : ibid ; 41 : 497, 1924. : ibid ; 51 : 402, 1927. : ibid ; 54 : 285, 1928.
- 5) Porter, A.E. : McJunkin 6) より引用.
- 6) McJunkin, F. A. : Am. Rev. Tbc., 8 : 393, 1923.
- 7) Nègre, L. : 結核菌の脂質と結核症, 堀・関・山村訳, 1950, 53 頁より引用.
- 8) Steenken, W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 33 : 33, 1935.
- 9) Steenken, W. : Am. Rev. Tbc., 38 : 777, 1938.
- 10) Baisden, L. & Yegian, D. : J. Bact., 45 : 163, 1943.
- 11) Redmond, W. B. & Bowman, B. u. : J. Bact., 69 : 293, 1955.
- 12) Bowman, B. u. & Redmond, W. B. : Am. Rev. Tbc., 73 : 907, 1956.
- 13) Marshak, A. : J. Bact., 16 : 1, 1951. ; Marshak, A. & Schaefer, W. B. : Am. Rev. Tbc., 65 : 75, 1952.
- 14) 浅見他: 日獣誌, 13 : 276, 昭26.
- 15) 浅見他: 結核, 27 : 246, 昭27.
- 16) Choremis, C., Melanides, G. et al. : Am. Rev. Tbc., 72, 859. 1955.
- 17) Froman, S., Will, D. W. & Bogen, E. : Am. J. Publ. Health, 44 : 1326, 1954.
- 18) Redmond, W. B. : J. Bact., 69 : 619, 1955.
- 19) 渡辺他: 共済医報, 5 : 519, 昭31.
- 20) Clark, M. E. : 1951, Am. Rev. Tbc., 65. Abst. 88, 1952より引用.
- 21) Yegian, D. et al. : Am. Rev. Tbc., 68, 557, 1953.
- 22) Collins, C.H. : Acta Tbc. Scand., 38 : 340, 1953.
- 23) Coster, J. F. & Mantén, A. : Am. Rev. Tbc., 74 : 985, 1956.