

# 喀痰中の結核菌の態度特に塗抹陽性培養陰性菌について

## 第3報 喀痰中の抗結核剤が結核菌培養に及ぼす影響

西 村 宏

国立宮城療養所 (所長 昌山辰夫)

受付 昭和 32 年 8 月 2 日

さきに私は肺結核患者の喀痰中の結核菌が化学療法によつて塗抹陽性培養陰性となる場合は、すでに喀痰中の菌が死滅または生活力が減弱していることが大きい原因であると考えられることを述べた<sup>1)</sup>が、喀痰中に抗結核剤が混入して培養の際に菌の発育を阻止する作用も見逃すことはできない<sup>2,3)</sup>。それで喀痰中の抗結核剤が結核菌の培養に及ぼす影響ならびに薬剤の不活性化によるその影響の除去について実験を試みた。

### 実験 1 抗結核剤を加えた菌液の培養

#### 実験方法

岡・片倉培地に 4 週間培養した人型結核菌青山 B 株を用い、手振法によつて生理的食塩水で  $5 \times 10^{-5} \text{mg/cc}$  の菌液を作り、その 3.6cc ずつを試験管にとつて所期の接触濃度の 10 倍の濃度の P A S・S M および INAH の溶液 0.4cc ずつを加えてよく混和し、直ちにその 0.1cc ずつを Dubos 液体培地 (栄研) および小川の 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地 2 本ずつに接種した。培地は 2 週から 8 週まで 1 週ごとに観察して集落数を数えた。

表 1 抗結核剤を加えた菌液の培養

薬剤の種類 培地	P A S		S M	
	Dubos	小 川	Dubos	小 川
0 $\gamma$ /cc	+	48.5	+	49
1	+	45.5	+	52.5
10	-	** 47	+	* 55.5
50	-	0	-	* 20
100	-	0	-	** 11.5
1000	-	0	-	0

薬剤の種類 培地	INAH	
	Dubos	小 川
0 $\gamma$ /cc	+	41
0.1	+	49.5
1	-	* 10
5	-	0
10	-	0
100	-	0

注 (表 1~4)

数字は最も多く数えられた集落数 (培地 2 本の平均) を示す  
\* は最も多くの集落が数えられた時期が対照より遅いもの  
\*\* は集落初発の時期が対照より遅いもの、したがって \* を含む

#### 実験成績 (表 1)

P A S をそれぞれ 1, 10, 50, 100 および 1000  $\gamma$ /cc の割に加えた菌液では Dubos 培地においては 10  $\gamma$ /cc 以上、小川培地においては 50  $\gamma$ /cc 以上の濃度では集落が発生せず、10  $\gamma$ /cc で小川培地に対照より遅れて集落が発生した。

S M をそれぞれ 1, 10, 50, 100 および 1000  $\gamma$ /cc の割に加えた菌液では Dubos 培地においては 50  $\gamma$ /cc 以上、小川培地においては 1000  $\gamma$ /cc の濃度では集落が発生せず、10~100  $\gamma$ /cc では小川培地上の集落発育が対照より遅延し、かつ集落数も減少した。

INAH をそれぞれ 0.1, 1, 5, 10 および 100  $\gamma$ /cc の割に加えた菌液では Dubos 培地においては 1  $\gamma$ /cc 以上、小川培地においては 5  $\gamma$ /cc 以上の濃度になると集落の発生をみず、1  $\gamma$ /cc では小川培地上の集落は少なく、かつ発育が遅延した。

### 実験 2 菌液に加えた抗結核剤の不活性化

#### 実験方法

実験 1 と同一の菌液 (種々の濃度に抗結核剤を加えたもの) を用い、それぞれ不活性化して培養した。不活性化の方法としては P A S に対してはパラアミノ安息香酸 (PABA) 法<sup>4,5)</sup>と次亜プロム酸ソーダ (NaOBr) 法<sup>6)</sup>の 2 方法を別々に行い、INAH に対しては NaOBr, S M に対しては塩酸チステイン<sup>7)</sup>を用いた。すなわち P A S の不活性化には 1, 5, 10, 50, 100 および 500  $\gamma$ /cc の割にそれぞれ PABA を加えた小川培地, S M の不活性化には 10, 50, 100, 500 および 1000  $\gamma$ /cc の割にそれぞれ Cystein を加えた小川培地を使用し、P A S および INAH を NaOBr 法で不活性化する際は、菌液 1 cc に 2% NaOBr 0.1cc を加えて 5~10 秒間攪拌し、直ちに 2.5% 次亜硫酸ソーダ 0.1cc を加えて小川培地に接種し、別の菌液 1 cc に生理的食塩水 0.2cc を加えたものと比較した。

#### 実験成績 (表 2~4)

P A S を PABA 法で不活性化した際には、5  $\gamma$ /cc 以上の PABA を加えた小川培地では 1000  $\gamma$ /cc の P A S を含む菌液でも集落が発生したが集落の発育は遅延し、1  $\gamma$ /cc 以上に PABA を加えた培地では 100  $\gamma$ /cc の P A S を含む菌液まで対照と同じような良好な集落の発育を認めた。

表2 菌液に加えたPASの不活性化

不活性化法 PASの濃度	PABA法 (培地中 PABA 濃度 $\gamma/cc$ )							NaOBr法	
	0	1	5	10	50	100	500	不活性化せず	不活性化
0 $\gamma/cc$	48.5	50.5	42	45.5	* 55.5	* 46	* 49	39.5	38.5
1	45.5	49	32.5	44	* 41	* 45	* 48	40.5	26.5
10	** 47	50.5	49.5	41	* 52	* 50	* 44	** 40	23
50	0	43.5	42	52.5	* 53	* 49.5	* 34.5	0	24
100	0	43	38	45	* 50	* 53.5	* 39	0	* 26
1000	0	0	* 34	* 39	* 46.5	* 50.5	* 37.5	0	0

表3 菌液に加えたSMの不活性化

不活性化法 SMの濃度	Cystein法 (培地中 Cystein 濃度 $\gamma/cc$ )					
	0	10	50	100	500	1000
0 $\gamma/cc$	49	46	44	42.5	*38	*34
1	52.5	46	53	38.5	*36.5	*27
10	*33.5	26.5	36	22	*26	*26
50	*20	*26	*27	*26	*24.5	*23
100	**11.5	*22	*26.5	*19	*22.5	*14.5
1000	0	0	0	0	0	0

表4 菌液に加えたINAHの不活性化

不活性化法 INAHの濃度	NaOBr法	
	不活性化せず	不活性化
0 $\gamma/cc$	41	30
0.1	49.5	27
1	*10	37
5	0	22
10	0	*16
100	0	*15.5

しかし50 $\gamma/cc$ 以上のPABAを加えると結核菌の発育をある程度阻害する結果を得た。NaOBr法で不活性化した場合1000 $\gamma/cc$ のPASでは集落発生せず、100 $\gamma/cc$ のPASでは集落の発育が遅れ、いずれのPAS濃度でも集落数が減少する傾向があつた。

SMをCystein法で不活性化した結果は、10 $\gamma/cc$ 以上

のCysteinを加えた小川培地のいずれにおいても、100 $\gamma/cc$ のSMを加えた菌液よりの集落の発育がCysteinを加えない培地よりやや良好であるのみであつた。そして500 $\gamma/cc$ 以上のCysteinは菌の発育を阻害した。

INAHをNaOBrで不活性化した場合は、100 $\gamma/cc$ のINAHを含む菌液でも集落は発生したが、10 $\gamma/cc$ 以上のINAHの存在する時は集落の発育が遅れ、かつ集落数も減少した。

実験3 不活性化の喀痰への応用

実験方法

化学療法を受けている肺結核患者のうち、喀痰中の菌がPASおよびINAHのいずれにも耐性を有しない感性例40名、PASに100 $\gamma/cc$ 不完全耐性以上のPAS耐性例4名、INAHに1 $\gamma/cc$ 不完全耐性以上のINAH耐性例3名およびPASとINAHの双方に耐性を有する例5名について延べ149回実験を行つた。すなわち朝食後に抗結核剤を投与された後、喀痰中にもつとも薬剤が排泄されると思われる午前10時前後に喀痰を採取し、8%苛性ソーダの前処置後、3%小川培地および5 $\gamma/cc$ の割にPABAを加えた3%小川培地2本ずつ接種し、残りの喀痰にNaOBr法によつて不活性化処理を行い、3%小川培地2本に接種した。培地は8週まで1週ごとに観察した。

実験成績 (表5, 6)

149件行つた培養のうち全然集落の発生をみながつた57件を除いた92件の成績について述べると、まず感性例

表5 感性例における喀痰中抗結核剤の不活性化

施行中の治療 件数	集落数	対照とPABA法との比較			対照とNaOBr法との比較			PABA法とNaOBr法との比較		
		C > P	C = P	C < P	C > B	C = B	C < B	P > B	P = B	P < B
S I P	29	0	10	19	12	13	4	24	5	0
I P	18	1	11	6	3	13	2	4	13	1
S P	13	2	5	6	3	7	3	8	4	1
計	60	3	26	31	18	33	9	36	22	2

注(表5, 6) Cは対照, PはPABA法, BはNaOBr法を示し, SはSM, IはINAH, PはPASを示す

表 6 耐性例における喀痰中抗結核剤の不活性化

耐性		集落数 治療件数	対照とPABA法との比較			対照とNaOBr法との比較			PABA法とNaOBr法との比較		
			C > P	C = P	C < P	C > B	C = B	C < B	P > B	P = B	P < B
P 耐性	SIP	4	2	9	1	2	7	3	3	7	2
	IP	4									
	SP	4									
I 耐性	SIP	4	3	1	4	3	4	1	4	1	3
	IP	4									
	SP	4									
P I 耐性	SIP	4	2	7	5	5	6	1	6	5	1
	IP	4									
	SP	4									
計		32	7	17	8	10	17	5	13	13	6

60件においては表5に示すようにPABA加培地が対照より劣るものが3件、両培地とも集落がほぼ同数のものが26件あつたが、PABA加培地が対照よりよい成績を得たものが31件あつた。31件のうち2件はPABA法陽性、対照陰性であり、29件はPABA加培地の集落数が対照より著明に多いものであつた。NaOBr法においては対照より集落数が少ないか陰性のものが18件あるのに対して、NaOBr法が対照より優れているものは9件のみであつた。したがつてPABA法とNaOBr法とを比較すると、60件中36件においてPABA法がより優れた培養成績を示している。なお集落の発生するまでの期間について各法を比較すると集落数の比較とほぼ同様の傾向を示したが、PABA法とNaOBr法との優劣の差が一層著明であつた。

次にPASとINAHのいずれかまたは双方に高度の耐性を有する症例の喀痰32件の不活性化培養成績は表6のように感性例におけるよりも著明に劣り、あまり不活性化の効果は認められなかつた。対照陽性でPABA加培地陰性のものが3件あつたが(感性例1名1件、INAH 1γ/cc不完全耐性例1名2件)、そのうち2件(後者の症例)はPABA培地に再接種することによつて明らかにPABAに対して感受性を示すことを確めた。

なお感性例および耐性例のいずれにおいても、投与中の化学療法剤の種類別による不活性化成績の相違は著明でなかつた。

考 察

Fruhlingerら<sup>2)</sup>、中村<sup>8)</sup>らは喀痰および唾液中に排泄され、あるいは内服時に口中に残つた抗結核剤、特にPASが喀痰中の結核菌を培養する際に菌の発育を阻害することを述べているが、PAS、INAHおよびSMがどれほどの濃度に存在するとこのような影響を及ぼすかについて試験管内でまず究明しようとした。その結果小川培地においてはPASは50γ/ccで完全に集落の発生を阻止、10γ/ccで発育を抑制し、INAHは5γ/ccで完全に阻止、1γ/ccで発育を抑制し、SMは1000γ/ccで完全に阻止、10γ/ccで発育を抑制した。この成績は藁茂ら<sup>9)</sup>の結果と近似している。喀痰を小川培地に培養する際に前処

置として等量の苛性ソーダを加えるとすれば、喀痰中に20γ/ccのPAS、2γ/ccのINAHあるいは20γ/ccのSMが含まれておれば菌の発育に対して影響すると考えられるわけである。諸家の報告によれば日常治療に用いる用量では喀痰中のPASの濃度は20γ/ccを越え、完全阻止濃度の100γ/cc以上にもなり<sup>2,10-12)</sup>、INAHは2γ/ccを越えるが、完全阻止濃度の10γ/ccに達することはほとんどなく<sup>11-14)</sup>、SMは20γ/ccを越えることはない<sup>15-17)</sup>。それ故、化学療法施行中の喀痰培養における抗結核剤の発育阻止ないし抑制作用はPASが最も多く、INAHはそれに次ぎ、SMはたとえ喀痰中に混入してもほとんど影響ないと思われる。したがつて喀痰に混入したPASないしINAHが直接影響するために、結核菌が塗抹陽性でありながら培養陰性を示すということは考えられることである。

なおDubos培地は5ccの液体培地であるから接種材料が直ちに50倍に稀釈されるので、抗結核剤を加えても比較的菌が発育するのではないかと考えられたが、いずれの薬剤の場合も小川培地より成績が劣つた。

次にPABA加小川培地を用いたPASの不活性化では1γ/ccのPABAで100γ/ccのPASを、5γ/ccのPABAで1000γ/ccのPASを不活性化しえたが、50γ/cc以上のPABAは結核菌の発育を阻害した。したがつて1~10γ/ccの割にPABAを加えた小川培地は臨床的に応用してPASの不活性化に有効と考えられる。NaOBr法では100γ/ccのPASおよびINAHを不活性化しえたが、操作を迅速に行われぬ場合には集落の発生をみないことがあつた。Cystein加小川培地を用いたSMの不活性化では10γ/ccのCysteinによつて100γ/ccのSMを含む菌液の培養成績をやや向上させることができたが、その効果は軽度であり、菌液とともに培地に加えた場合のSMの発育阻止作用は非常に強いものではないのでCystein加培地の実用的価値は少ないと考えられる。

以上の基礎実験の結果から、5γ/ccの割にPABAを加えた小川培地によるPASの不活性化とNaOBrによるPASおよびINAHの不活性化を患者喀痰の培養に応用したところ、耐性のない症例では60件の培養陽性例中31件においてPABA加培地における集落の発生が良好であ

つた。これに対して NaOBr 法は PABA 法ほどに好成績は得られず、かえつて対照よりよくなかつた例が相当みられた。高橋<sup>6)</sup>は Tween 血清培地を用いた実験では NaOBr の作用時間が 15 秒以内ならば菌数の減少をきたすことはないと言っているが、実際に化学療法施行中のしかも粘稠な喀痰に應用する時には、なるべく迅速に操作しても NaOBr の結核菌に対する殺菌作用を免れえなかつたものと思われ、鈴木ら<sup>8)</sup>の不成績もそのためではなからうかと推察される。

高度の耐性例においては不活性化処理によつて培養成績をさして向上させることができなかつたが、これは当然考えられることであつて、Fruhlinger ら<sup>2)</sup>によれば P A S を高濃度に含む喀痰で結核菌が培養で生えるのは P A S 耐性菌の場合のみであるという。なお Yegian ら<sup>3)</sup>の述べたような PABA 感性菌が INAH に 1  $\gamma$ /cc の不完全耐性を有する菌株に見出されたことは注目される。

施行中の化学療法の種類による不活性化成績の差が著明でなかつたことは、全例が P A S の投与を受けている点よりみて、喀痰中に含まれる抗結核剤の発育阻止作用は P A S が主役を演ずることを裏付けるものであろうか。

## 結 論

1) 結核菌浮游液に種々の濃度の各種抗結核剤を加えた小川培地に接種したところ、P A S は 50  $\gamma$ /cc、INAH は 5  $\gamma$ /cc、SM は 1000  $\gamma$ /cc の濃度で完全に集落の発生を阻止し、P A S の 10  $\gamma$ /cc、INAH の 1  $\gamma$ /cc、SM の 10  $\gamma$ /cc は集落の発育を抑制した。それ故臨床的に抗結核剤を投与する際に喀痰中に混入される薬剤の濃度よりみれば、結核菌培養に及ぼす影響は P A S が最も大きく、次いで INAH であり、SM の影響は非常に小さいと考えられ、したがつて喀痰中に混在する抗結核剤、特に P A S ないし INAH は喀痰中の結核菌が塗抹陽性でありながら培養陰性を示す原因の 1 つとなりうと思われる。

2) 抗結核剤を加えた菌液について PABA、NaOBr および Cystein を用いてそれぞれ P A S、INAH および SM を不活性化して培養した結果、PABA 法と NaOBr 法の効果が著明であつた。

3) 化学療法施行中の患者喀痰について 5  $\gamma$ /cc の割合に PABA を加えた小川培地の使用と NaOBr による不活性化処理を行い、感性例の約半数に PABA 法の効果がみられたが、NaOBr 法はよい成績が得られなかつた。P A S を含む化学療法を行つている患者の喀痰を培養する際、高度耐性菌をもたない症例においては、PABA 加培地の使用は培養成績を高めるのに有効な方法であると思われる。

終りに御指導御校閲を頂いた所長畠山辰夫博士に深謝する。

## 文 献

- 1) 西村 宏：結核，31：222，昭31.
- 2) Fruhlinger, B. et al. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 42, 1953.
- 3) Yegian, D. et al. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 860, 1955.
- 4) Youmans, G.P. et al. : J. Bact., 54 : 409, 1947.
- 5) 小川辰次：臨床病理，2：363，昭29.
- 6) 高橋昭三：最新医学，10：186，昭30.
- 7) Denkelwater, R. et al. : Science, 102 : 12, 1945.
- 8) 中村善紀：日本臨牀結核，13：954，昭29.
- 9) 藁茂上他：結核診療，10：323，昭31.
- 10) Wolfrat, W. : Beitr. Klin. Tbk., 106 : 147, 1951.
- 11) 佐藤正二郎他：抗酸菌病研究雑誌，10：26，昭29.
- 12) 石川哲也：最新医学，11：455，昭31.
- 13) 橋本郁：厚生省療研化学療法科会報告，昭27.
- 14) Bünger, P. : Beitr. Klin. Tbk., 108 : 429, 1953.
- 15) Steenken, W. et al. : Am. Rev. Tuberc., 56 : 403, 1947.
- 16) 堂野前維摩郷他：臨牀，2：503，昭24.
- 17) 北村正夫：抗酸菌病研究雑誌，6 (2) : 133, 昭25.
- 18) 鈴木七郎他：衛生検査，5 (1) : 45, 昭31.