

# 稀釈法による耐性培地上の INAH 耐性菌の Peroxidase 反応による観察

漆 崎 一 朗

国立東京療養所

受付 昭和 35 年 12 月 1 日

## 緒 言

われわれはさきに Peroxidase 反応により培地上に Peroxidase 陽性の菌集落と陰性の菌集落とを染め分け、INAH 耐性と密接な関係において Bacterial population を決定できることを報告した<sup>1)3)</sup>。さらに 1 年の連続観察<sup>2)</sup>、菌陰性化例の観察<sup>3)</sup>等から本法は臨床的に十分 INAH 耐性検査の欠点を補い、かつ実用であることがわかった。このわれわれの結果は個々の菌集落を比色法により観察した、Tirunaryanan & Vischer<sup>4)</sup>、Hedgecock<sup>5)</sup>、Bogen<sup>6)</sup>の結果と大体一致し、本邦でも武田<sup>7)</sup>、工藤<sup>8)</sup>、堀<sup>9)</sup>、友田<sup>11)</sup>らの Peroxidase 反応と INAH 耐性に関する報告が最近みられるにいたつた。

今回は routine に広く用いられている稀釈法による耐性培地上の菌集落に実施した結果を報告する。

## 実 験 方 法

当所入所中の排菌患者の SM, P A S, INAH 耐性培地につき検討した。各種薬剤濃度は SM 1, 10, 100  $\gamma/ml$ , P A S 1, 10, 100  $\gamma/ml$ , INAH 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10  $\gamma/ml$  である。

われわれの所で用いている対照は 1 倍 (略痰に等量の 7% NaOH を加えて均等化したもの) と 100 倍 (前者をさらに 4% NaOH で 100 倍に稀釈均等化したもの) であつて、1 倍稀釈対照培地と同程度の菌発育が認められた最高濃度をもつて完全耐性、100 倍稀釈対照培地と同程度以上の発育を認めたものを不完全耐性として考察している。判定は 4 週から 6 週培養につき検した。

Peroxidase 反応の術式は既報したので省略するが、0.2 M Acetate Buffer pH 4.0 1cc, 2% Catechol 1 cc, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 cc を直接に培地に注入し、30 分から 1 時間で判定した。Peroxidase 陽性菌集落は暗褐色に、Peroxidase 陰性菌集落は着色せずにとどまる。耐性培地に含まれている SM, P A S, INAH の各濃度では本反応の呈色を妨げないことを確かめた。

培地の Peroxidase 反応による分類は Peroxidase 陽性菌集落のみから成るものを P (+) 群、Peroxidase 陽性、陰性菌集落の種々の割合に混在するものを P (+)

P (-) 混在群、Peroxidase 陰性菌集落のみからなるものを P (-) 群として取扱つた。

INAH 耐性は既報したごとくに、感性 (<0.1  $\gamma/ml$ )、低耐性 (<0.5  $\gamma/ml$ )、中等耐性 (<5  $\gamma/ml$ )、高耐性 ( $\geq 5 \gamma/ml$ ) に分けて便宜上観察した。

2 本以上の培地の総合観察では、いずれの培地でも P (-) 菌集落を認めないものを P (+) 例、いずれかの培地で P (-) 菌集落の混在を認めるもの、各培地で P (+) P (-) 混在するもの、これらはすべて P (+) P (-) 混在例とし、いずれの培地でも P (-) 菌集落のみであるものを P (-) 例とした。

## 実 験 結 果

使用された例数は 218 でこれを INAH 耐性から分けると感性 (<0.1  $\gamma/ml$ ) 54, 低耐性 (<0.5  $\gamma/ml$ ) 68, 中等耐性 (<5  $\gamma/ml$ ) 52, 高耐性 ( $\geq 5 \gamma/ml$ ) 44 である。

1. SM, P A S, INAH 耐性と Peroxidase 反応との関係

(1) SM および P A S 耐性培地の菌集落について SM および P A S おのおの 1, 10, 100  $\gamma/ml$  各耐性培地上の菌集落に Peroxidase 反応を実施し、各培地を P (+) 群、P (+) P (-) 混在群、P (-) 群に分けて観察すると図 1, 2 に示すごとく、SM, P A S 耐性の上昇と Peroxidase 反応の結果との間には一定の関係がない。

(2) INAH 耐性培地の菌集落について INAH 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10  $\gamma/ml$  各耐性培地のすべてに Peroxidase 反応を実施すると図 3 に示す

図 1 SM 耐性培地の Peroxidase 反応による観察

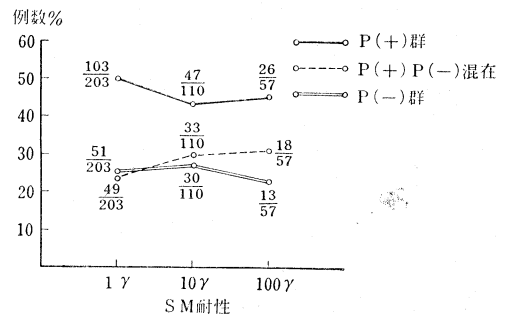


図 2 P A S 耐性培地の Peroxidase 反応による観察

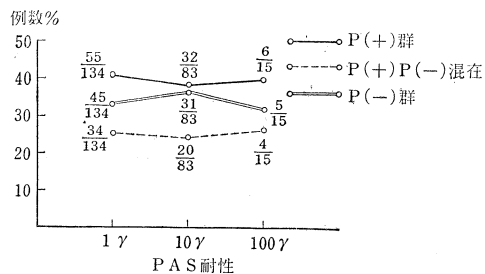
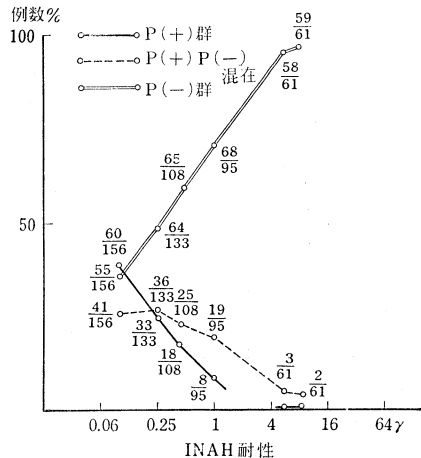


図 3 INAH 耐性培地の Peroxidase 反応による観察



ように、INAH 耐性の上昇に伴い P (+) 群および P (+) P (-) 混在群の減少とそれに伴い P (-) 群の増加を認めた。INAH 耐性と Peroxidase 反応との間に密接な関係のあることが示され、この変化は 5γ/ml 耐性培地を境にして著明であった。

表 1 INAH 耐性と Peroxidase および Catalase 反応 [ I ]

INAH 耐性度	検査菌株数	Peroxidase 反応			Catalase 反応		
		P (+) 群	P (+)P (-) 混在	P (-) 群	(+)	(+)(-)混在	(-)
0.1 γ	30	22 (73%)	8 (27%)	0	24 (80%)	6 (20%)	0
0.25	29	15 (52%)	14 (48%)	0	16 (55%)	13 (45%)	0
0.5	15	6 (40%)	7 (45.6%)	2 (13.4%)	7 (46.6%)	6 (40%)	2 (13.4%)
1	38	9 (23.7%)	17 (44.7%)	12 (31.6%)	13 (34.3%)	17 (44.7%)	8 (21%)
5	2	0	0	2	0	0	2
10	55	0	2 (3.5%)	55 (96.5%)	4 (7.1%)	3 (5.3%)	49 (87.6%)
計	170	52	47	71	64	45	61

[ II ]

INAH 耐性	0.1γ	0.25	0.5	1	10
総例数	30	29	15	38	56
P (+)C (+) 菌集落群	22 (73%)	15 (52%)	6 (40%)	9 (23.7%)	0
P (-)C (+) 菌集落群	2 (6.6%)	1 (3.5%)	1 (6.6%)	4 (10.5%)	6 (10.7%)
P (-)C (-) 菌集落群	0	0	2 (13.4%)	8 (21%)	49 (87.5%)

P は P.oxidase, C は Catalase を意味する

2. INAH 耐性度の明らかな菌集落の Peroxidase 反応、および Catalase 反応との比較

ある濃度の INAH 耐性培地上に菌集落が生えそれ以上の濃度の INAH 耐性培地で菌発育を示さぬ場合、菌集落はその培地の濃度に相当する INAH 耐性度を有するものと考察される。このような INAH 耐性培地上の菌集落について検すると表 1 のごとくである。P (-) 菌集落がすでに 0.1 γ/ml 耐性で出現する。しかし同一

耐性度の菌集落でも必ずしも酵素学的に同じ性質をもつたものでないというこの事実は、Peroxidase 反応と INAH 薬剤感受性との直接関係にあるものでなく、INAH による菌の酵素的性状の変化が移行しつつある過程にみられるものと考えられる。次に Peroxidase 反応と Catalase 反応の結果とを比較してみると大体平行するが Peroxidase 陰性 Catalase 陽性菌集落の存在が 1 γ/ml および 10 γ/ml の耐性において比較的高率にみとめられた。

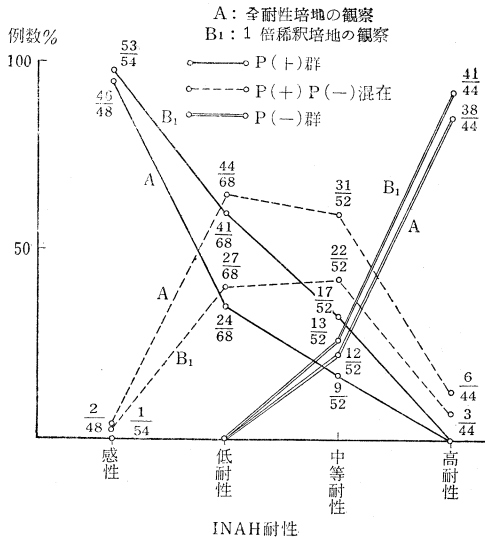
3. 1倍稀釈対照培地と SM, P A S, INAH 全耐性培地の比較

INAH 耐性培地にて P (-) 菌集落が選択的作用を受ける。Middlebrook<sup>10)</sup>は対照培地と INAH 耐性培地上の菌集落の Catalase 活性の差異につきすでに述べ、友田<sup>11)</sup>は Peroxidase 活性につきふれている。

1倍稀釈対照培地と全耐性培地について Peroxidase 反応の結果を比較すると図 4 に示すように、P (+)P (-) 混在例が全耐性培地の観察で非常に増加し、とくに低耐性、中等耐性で顕著である。これに反し P (+) 例はとくに低耐性、中等耐性で減少し、P (-) 例もわ

ずかながら減じている。すなわち全耐性培地の観察で単一菌株群が減じ、混在菌株群が増加している。これは1倍稀釈対照培地でP (+) 群、P (-) 群と観察されるもののなかに P (-) 菌集落や P (+) 菌集落が混在している可能性があることを示している。みかけの陽性、陰性ともいうべきものである。

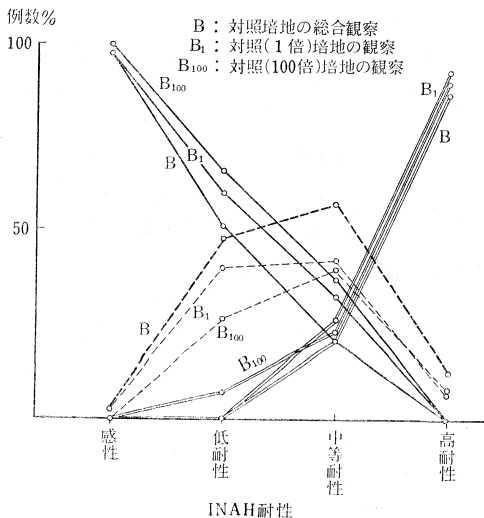
図4 1倍稀釈対照培地と全耐性培地の比較



4. 対照培地における接種菌液稀釈の影響

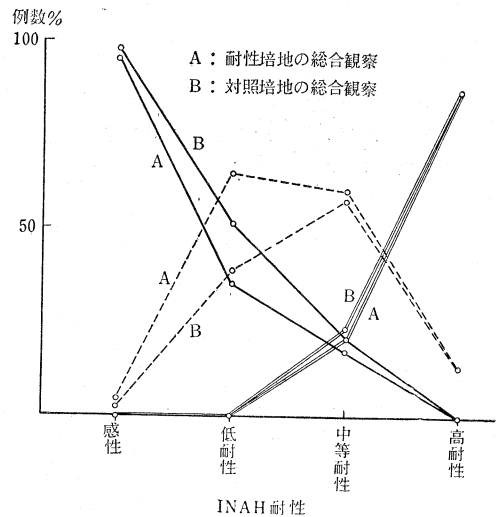
われわれの所では1倍稀釈と100倍稀釈の菌液接種の対照培地が用いられているが、この稀釈の影響をみるに、稀釈によりP (-) 菌集落の出現、または消失するもの、P (+) 菌集落の出現または消失するものがあり、この両対照培地を総合観察すると、低耐性、中等耐性でP (+) P (-) 混在例は図5に示すごとく著明に増加している。

図5 対照培地と INAH 耐性の関係



対照培地における稀釈の影響のみられるものは低耐性、中等耐性が大部分を占め、これらは一応ほとんどがP (+) 菌と P (-) 菌の混在するものであつて、稀釈の影響は接種菌量および P (+) 菌と P (-) 菌の比率、その繁殖力の差によつて生ずるものと考えられ、この問題については試験管内実験を実施中である。

図6 全対照培地と全耐性培地の比較観察



5. 対照培地と全耐性培地の総合観察の比較

図6に示すごとく低耐性を除いては両者の総合観察の結果にあまり差がない。低耐性のあるものにあつてはP (-) 菌集落の出現がきわめて少ないために、INAH耐性培地においてのみ観察できるというものがあろう。これらのものが対照培地で発見しがたいのも当然である。

総 括

今回の耐性培地を取扱つた所見では Peroxidase 反応は SM, P A S 耐性とは関係なく、INAH 耐性と密接な関係があることがわかつた。

Peroxidase 反応と INAH 耐性の関連性を観察するにさいし、P (+) 菌集落がどの程度の INAH 耐性で消失し、P (-) 菌集落はどの程度から出現するかを決定することは大切である。0.1  $\gamma/ml$  耐性ですでに P (-) 菌集落の出現が認められ、10  $\gamma/ml$  耐性では 97% 以上が P (-) 菌集落群であるが、わずかに P (+) 菌集落も認められた。Tirunaryanan<sup>4)12)</sup>らはすでに 0.1  $\gamma/ml$  INAH 耐性で Peroxidase 陰性化することを報告している。Peroxidase 反応は INAH 耐性を直接示すものではなく、Catalase (は毒力<sup>13)</sup>) と関係があるともいわれているが、INAH に対して菌体がうける生活現象

の変化として Peroxidase 反応を観察することは INAH 耐性との関連において有意義である。この変化は個体差、血中薬剤濃度の差等によつて影響されることであつて、耐性度が低いにかかわらず菌体への影響の早く現われるもの、また Middlebrook<sup>11)</sup> のいう低濃度に長くさらされていると Catalase 陽性の INAH 高耐性菌が生ずるという説も妥当性があるように思われる。

INAH 化学療法に伴い INAH 耐性菌の出現は予想されるが、INAH 感性菌と耐性菌との割合は種々雑多でありうるし Szybalski & Bryson<sup>14)</sup>, Fischer<sup>15)</sup>, Dissmann<sup>16)</sup> らは INAH 耐性菌は感性菌より発育速度が遅いとしており、佐藤<sup>17)</sup> は *in vitro* で INAH 耐性菌と感性菌を人工的に混合した菌群について、継代培養を重ねると耐性菌の比率が減少することを認め、河盛<sup>18)</sup> は INAH 耐性菌と感性菌の混在下における前者の自然淘汰、ことに他剤に対する感受性のわずかの差による増殖遅延が考えられるとし、耐性菌の耐性低下はこのためであり、生活条件が不良な場合には他剤の併用がなくても起りうるとしている。1倍稀釈対照培地と全耐性培地の比較からも、対照で P (+) 群、P (-) 群とみなされているもののなかに、みかけの現象であつて実は P (-) 菌集落、P (+) 菌集落を混在しているものであることがわかつた。次に接種菌液の1倍稀釈と100倍稀釈の対照培地につき検するに稀釈により P (+) 菌集落や P (-) 菌集落の出現するものがあり、これらの影響はおそらく接種菌量および P (+) 菌数と P (-) 菌数の比および上記した P (+) 菌と P (-) 菌との繁殖力の差により起るものと考えられ、試験管内実験を実施中である。

この1倍稀釈と100倍稀釈の両耐性培地の総合観察と全耐性培地の総合観察を比較すると、低耐性を除いては両者の結果にあまり差がないことを認めた。低耐性では P (-) 菌数が極端に少数の場合がありうる。かかるさい対照培地でも証明できぬのは当然であろう。それゆえ1倍稀釈、100倍稀釈の対照培地の総合観察の結果は一応、P (+) 菌集落と P (-) 菌集落の Population の実態に近いものと考えられる。

### 結 論

1) Peroxidase 反応は SM 耐性、PAS 耐性と関係なく、INAH 耐性とのみ密接な関係が認められた。

2) INAH 耐性度と Peroxidase, Catalase 活性の関係をみるに、0.1  $\gamma/ml$  耐性で P (-) 菌集落の出現が

認められ、5  $\gamma/ml$  耐性以上で 97% の著明な P (-) 群の出現をみた。P (-) C (+) 菌集落群は 1  $\gamma/ml$ , 10  $\gamma/ml$  耐性において約 10% に認められた。

3) 1倍稀釈対照培地と全耐性培地の比較から、1倍稀釈対照培地で P (+) 群または P (-) 群とみなされるもののなかに、みかけの現象で P (+) P (-) 混在群であるものが示された。さらに接種菌液稀釈の影響は、菌量および P (+) 菌数と P (-) 菌数の比率および繁殖力の差により影響されることを暗示した。

4) 対照培地の1倍稀釈、100倍稀釈の2本の総合観察は P (+) 菌と P (-) 菌の Population の実態に近いものと考えられた。

終りに臨み御校閲いただいた砂原所長、小川医長ならびに御援助いただいた研究室の諸氏に感謝する。

### 文 献

- 1) 漆崎・小川：医学と生物学，47：206，昭33。
- 2) 漆崎・小川：日本臨牀結核，17：851，昭33。
- 3) 漆崎・小川：結核研究の進歩，-24：201，昭34。
- 4) M.O. Tirunaryanan & W.A. Vischer：Am. Rev. Tbc., 75：62，1957。
- 5) L.W. Hedgecock & I.O. Faucher：Am. Rev. Tbc., 75：670，1957。
- 6) E. Bogen：Am. Rev. Tbc., 76：1110，1957。
- 7) 武田：結核菌の耐性研究班第2回協議会，昭32。
- 8) 工藤：結核，32：551，昭32。
- 9) 堀：第33回日本結核病学会総会特別講演要旨，昭33。
- 10) G. Middlebrook et al.：Am. Rev. Tbc., 70：852，1954。
- 11) 友田：結核，33：841，昭33。
- 12) W.A. Vischer & M.O. Tirunaryanan：Schweiz. Zeit. f. Tuberk., 14：243，1957。
- 13) E. Wolinsky et al.：Am. Rev. Tbc., 73：768，1956。
- 14) W. Szybalski & V. Bryson：Am. Rev. Tbc., 65：768，1952。
- 15) M.W. Fischer：Am. Rev. Tbc., 66：626，1952。
- 16) E. Dissmann：Naturwissenschaften, 41：218，1954。
- 17) 佐藤：結核，30：119，昭30。
- 18) 河盛：結核研究の進歩，-14，23，昭31。