

単個菌分離培養法による 3 重耐性結核菌の存在に関する研究

北 本 治・柴 田 一 郎・塩 塚 正 一
松 村 一 雄・松 村 寛 三 郎・村 田 昭 平

東京大学伝染病研究所臨床研究部

受付 昭和 35 年 12 月 1 日

緒 言

最近結核症に対する化学療法の進歩普及に伴い、SM、PAS および INH に対し、2 者ないし 3 者耐性菌を喀出する患者が漸次多くなってきたが、これにはたして種々の耐性の菌が集まって見掛上 2 者ないし 3 者耐性としてあらわれているのか、あるいは 2 重ないし 3 重の耐性を有する菌の集りであるのか疑問とされてきた。双方ともありうるからである。

われわれは以上の問題を解明したいと考えて、化学療法施行中の患者株にして見掛上 3 者耐性と考えられる大谷株を使用し、これより Fonbrune の Micromanipulator を使用して 3 種薬剤混入 1% 小川培地上に単個菌として取り出し、これより増殖した菌株について耐性を測定し、はたして 3 重の耐性を有する株が存在するか否かを検討した。

実 験 方 法

使用菌株としては化学療法施行中の患者より分離した大谷株を使用した。この株の薬剤耐性は表 1 のごとく、Youmans 培地使用による間接法では、SM では 1 γ /cc 主動、10 γ 中間、1,000 γ 別動耐性であり、PAS には 10 γ 主動、1,000 γ 中間耐性、INH に対しては 5 γ 主動、50 γ 中間耐性を示していた。

この大谷株を Dubos Tween-albumin 培地中に増殖せしめて、これから釣菌したものを各薬剤単独あるいは併用混入培地に植えて実験を施行した。

すなわち SM、PAS、INH 各 1 γ /cc 単独混入、および SM+PAS、INH+PAS、SM+INH 各 1 γ /cc 2 者混入、および SM+INH+PAS 各 1 γ /cc の 3 者混入の 7 種の薬剤混入 1% 小川培地を使用して、その耐性菌分布状況を検討すると同時に、上記 Dubos 培地に増殖せるものを菌液として、これよりマイクロニプラトールを使用して型のごとく小寒天フィルム上に単個菌として取り出し、この寒天フィルムを菌の付着せる側を下向きに 3 組の薬剤含有および非含有 1% 小川培地の斜面の上に培養した。以後 2 週より週 1 回ずつ 6 週にいたるまで成績を判定し、その 3 重耐性培地に増殖した 2 株について、このものをさらに

表 1 3 者耐性大谷株およびこれより 3 剤混入培地上に単個菌分離培養した 2 株の薬剤耐性

	γ /cc	大谷株	gr. 1	gr. 2
SM	0	10+	9+	9+
		10+	9+	9+
	1	10+	9+	9+
		10+	9+	9+
	10	5+	gr.2	3+
		5+	C	3+
	100	2+	0	0
		2+	0	0
	1,000	2+	0	0
		0	0	0
PAS	0	10+	8+	8+
		10+	8+	8+
	1	10+	8+	8+
		10+	8+	8+
	10	9+	3+	8+
		9+	3+	8+
	100	5+	0	2+
		4+	0	2+
	1,000	4+	0	0
		2+	0	0
INH	0	10+	8+	10+
		10+	8+	9+
	1	9+	8+	8+
		9+	8+	8+
	5	8+	gr.7	8+
		C	0	4+
	10	4+	gr.1	4+
		4+	gr.1	1+gr.2
	50	2+	0	0
		2+	0	0

gr.1, gr.2 は SM、PAS、INH 各 1 γ /cc 含有培地上に得た単個菌株、耐性測定は Youmans 培地使用による間接法、接種菌量 0.01 mg、成績は増殖度をもって示す

Tween-albumin 培地に移植増菌せしめて、Youmans 培地使用による間接法により耐性を測定した。

実 験 成 績

親株大谷株の菌液 (Dubos 培地) を適宜稀釈して、SM、PAS、INH 各 1 γ /cc 含有単独培地およびこれらの 2 剤ないし 3 剤を混合した培地上に接種した場合の集落発生状況を表 2 に示した。すなわち、単独培地上の成績から、この親株は 3 者耐性であり、しかも薬剤混入培地上の成績からこの親株中には SM、INH ; SM、PAS ; INH、PAS ; の 2 重耐性菌およ

表2 3者耐性大谷株の耐性菌分布状況

含有薬剤	1 mg 中の生菌数
対 照	44.5 × 10 ⁶
S M	25 × 10 ⁶
INH	39 × 10 ⁶
PAS	26 × 10 ⁶
SM + INH	2 × 10 ⁶
SM + PAS	4.5 × 10 ⁶
INH + PAS	17.5 × 10 ⁶
SM + INH + PAS	9.5 × 10 ⁶

各薬剤はいずれも 1 γ/cc の濃度, 1% 小川培地使用

び SM, INH, PAS の 3 重耐性菌も含まれていると推定できる。

この親株の菌液より各種薬剤含有培地に単個菌分離した場合の培養陽性数, ならびに培養陽性率は表3に示すごとくであった。結核菌の単個菌培養は現在の段階では釣菌培養したものが毎回培養陽性の結果を得ることは困難であるし, また, 今回は釣菌回数が必ずしも多くはないので, 表中の各薬剤含有培地上の培養陽性数および陽性率についての批判は保留するが, 全体としての釣菌

表3 3者耐性大谷株よりの単個菌分離培養成績

含有薬剤	釣菌回数	培養陽性数	培養陽性率
対 照	10	3	30.0%
S M	9	2	22.2
PAS	10	4	40.0
INH	10	2	20.0
SM + INH	10	0	0
SM + PAS	9	1	11.1
INH + PAS	9	5	55.6
SM + INH + PAS	9	2	22.2
総 計	76	19	25.0

1% 小川培地使用, 各薬剤はいずれも 1 γ/cc とする

回数は 76 回であり, そのうち培養陽性のものは 19 コであり, 25.0% の陽性率であった。

次に SM, INH, PAS 各 1 γ/cc 混合せる 3 重耐性培地上に 2 コの集落発生をみた。このものについて, さらに Dubos 培地に移植均等増殖せしめたのち, Youmans 培地使用により薬剤耐性を測定したところ, 表1の右欄に示すとき値を得た。すなわち gr. 1 は SM 1 γ/cc 主動, 10 γ 別動耐性であり, PAS は 1 γ 主動, 10 γ 中間耐性, INH は 1 γ 主動, 10 γ 別動耐性であった。

gr. 2 については SM 1 γ/cc 主動, 10 γ 中間耐性, PAS は 10 γ 主動, 100 γ 中間耐性であり, INH は 5 γ 主動, 10 γ 中間耐性であった。

以上より単個菌分離株 gr. 1 および gr. 2 はいずれ

も各薬剤につき 1 γ/cc 以上の 3 重耐性株であった。

総括ならびに考察

緒言に述べたごとく, 最近結核化学療法の普及に伴って, 漸次 SM, INH, PAS に対する 2 者ないし 3 者耐性菌を喀出する患者が多くなってきたが, これがはたして種々の耐性の菌が集まって見掛上 2 者ないし 3 者耐性として現われているのか, 真の意味における 2 ~ 3 重耐性菌 (2 種あるいは 3 種の薬に対して耐性を有する菌) の集りであるのか, あるいはさらにいかなる程度の 2 ~ 3 重耐性菌がいかなる割合に出現してくれば以後の化学療法が期待できなくなるのかは臨床未解決の重大な問題と考える。

第 32 回日本結核病学会総会 シンポジウム¹⁾において北本が述べたごとく, たとえば 2 者耐性株の場合少なくとも *in vitro* では単独で無効な濃度であっても, 両者を組合わせて作用させると, その阻止限界が下る場合があることは, SM+PAS, あるいは INH+PAS の場合に認められる。これに対しこの菌株中に占める種々の耐性度の菌のポピュレーションの側からみた説明がなされている。すなわちその菌株がある程度以上の 2 重耐性菌ばかりで占められるようになると併用効果が期待できなくなる。

2 ~ 3 重耐性菌の存在については, また日常の耐性検査にさいし, 集落算定ができる程度に喀痰を適宜稀釈して培養した場合, 対照培地と比較して SM, INH, PAS 耐性培地にもおのおの同等な数に集落のみられる場合があり, かかる場合には該菌株はほとんど 3 重耐性株から占められているのではないかと推定されるし, またこれら 2 種または 3 種の薬剤を同時に含む培地に培養して増殖してきた場合はこれらの集落は 2 ~ 3 重耐性菌であろうと考えられる。

このさい 1 コの菌を取り出して培養し, それが 3 種の薬剤に耐性を担っていることが証明できれば確実に厳密な意味での 3 重耐性菌の存在が確認され, また純系ともいふべき 3 重耐性株を得ることができるという観点からこの実験に単個菌培養法を応用した。すなわち 3 者耐性を示す大谷株より菌液を作製し, これより単個菌分離して, SM, PAS および INH 3 種薬剤各 1 γ/cc 含有 1% 小川培地上に増殖せしめて得た 2 株はいずれも程度は必ずしも高くはないが, 3 種の薬剤に対し耐性を示し, これの源となるべき分離された単個菌は 2 コとも 3 重耐性菌であったことを証明することを得た。

なおわれわれはさきに結核菌の薬剤耐性に関する研究の都合上, 生物学的に純系ともいふべき耐性株の必要を痛感したので, ミクロマンプラトールを使用して結核菌の分離培養法を考案した²⁾ ののであるが, 金井・勝山³⁾

はわれわれとは別の方法を考案して発表した。

われわれの方法は、マイクロマニプラトールによつて寒天フィルム上に取り出した単個菌を、小試験管中のわれわれのいわゆる Youmans-albumin 培地 (Youmans 培地の血清の代りに、albumin-V (Difico) を10%に加えたもの) 中に挿入し、これに発生した集落をさらに1%小川培地に還元培養する方法であるが、金井氏らの方法は、マイクロマニプラトールを使用して分離した単個菌含有寒天フィルムを、菌の付着した部分を下にして直接 Kirchner 寒天の斜面の上に、そのまま培養する方法である。文献によれば同氏らの方法は操作もやや簡単であり、培養成績もはなはだ良好であるので、今回の実験は大体金井氏らの方法に準じて行つてみた。ただ、使用培地は金井氏らは Kirchner 寒天であり、われわれが行つたのは1%小川培地であることおよび薬剤を含んでいること等が若干条件を異にするが、培養陽性率は25%であり、以前われわれが実験を行つたさいと今回とでは熟練の程度も異なつているので、陽性率の比較を行うことは避けたいと考えるが、金井氏らの方法は固形培地上に集落を得るまでの日時が、液体培地を通過させないために短かくてすむということと、陽性率も相当高いという点より、はなはだ優れた方法であると考えられ、われわれの方法と、その目的により使い分ければいいのではあるまいかと考えられる。

結 論

日常の耐性検査で、見掛上 SM, INH, PAS 3者に耐性を示す菌株(3者耐性株)中には真の意味で3重耐性を担っているもの、すなわち1コの菌でしかも3種の薬剤に耐性のものがはたして存在しているかどうか、存在していればこれを取り出して継代し純系の3重耐性株ともいふべき株を得ようと試みた。

患者より分離した3者耐性大谷株より、マイクロマニプラトールを使用して、SM, INH, PAS 各1 γ /cc含有1%小川培地上に単個菌を釣菌、移植培養して2コの集落を得、これを別々に Dubos 培地で増菌しこのものについてさらに薬剤耐性を測定した。この2株は3種薬剤に対し少なくとも1 γ /cc以上の耐性を有することを認め、これより真の意味の3重耐性菌が存在することを確認した。

なお本論文の要旨は昭和33年5月第33回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 北本治：第32回日本結核病学会シンポジウム，昭32.
- 2) 柴田一郎：結核，32：17，昭32.
- 3) 勝山茂・金井興美：医学と生物学，40：11，昭31.