

通常検査にみられる発育の悪い結核菌について

第1報 耐性検査培地に発育した結核菌についての考察

小川辰次・宮城小枝子
大谷典子・増田礼子

北里研究所附属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和38年5月1日

1) 緒 論

化学療法の広く行なわれている昨今では、塗抹陽性、培養陰性のものが増加していること、検査材料中の結核菌の発育力が弱っているものが多いことは、多数の研究者によつて認められているが、発育した結核菌の発育については、断片的な見解が発表されている程度であつて、詳細な研究はない。発育の実態を把握することは今後の結核菌の検査、研究の手がかりにもなることと思われるので、ここではその手始めとして、通常の耐性結核菌の検査を完了した材料をもとにして、結核菌の発育を観察したので報告する。

2) 方 法

① 耐性検査の方法

ほぼ厚生省の検査指針によつた。培地は3%小川培地を用い、抗結核剤の最終濃度をSMは10r, 100r, PASは1r, 10r, INHは0.1r, 1r, 5rになるように混入した。直接法では塗抹陽性の喀痰に8% NaOH液を等量加えてよく混合し、その0.1cc宛、間接法では分離した結核菌の集落の多いときはそのまま、少ないときは1%小川培地に継代して、発育した菌により菌液を作り、これを4% NaOH液で処理して 10^{-1} mg/ccとし、その0.1cc宛をそれぞれ3%小川培地で作った前述の1組宛のSM, PAS, INHの耐性検査培地に接種し、斜面を水平にして1~2日乾かしたうでゴムキャップにかえ37°Cに培養し、直接法では1カ月後、2カ月後に、間接法ではほぼ1カ月後に耐性値を読んだ。

② 検査成績の処理方法

耐性検査の完了したものについては直接法と間接法とに分け、SM, PAS, INHの混入されている培地に発育

した最高濃度をもつてその菌の耐性値とし、また対照培地については、これらの抗結核剤の混入している培地には発育しないで対照培地にのみ発育したものを感性菌とし、抗結核剤の混入してある培地にも発育して対照培地に発育したものを耐性菌と感性菌の混合した菌株とした。これらの菌株の集落数は数えられないもの(卍~卅)、数えられるもの(1~200個)に分けた。そして、集落の大きさを a...発育のよいもの、b...発育の普通のもの、c...発育の悪いもの に分けて検討した。

3) 成 績

1) 耐性菌、耐性菌と感性菌の混合菌、感性菌の中の発育の悪い結核菌

対象の菌株は、直接法213例、間接法355例、合計568例となる。

イ. SM, PAS, INH 耐性菌

表1にはSM, 表2にはPAS, 表3にはINHの耐性結核菌の発育の状態を示した。

まずSMでは10rの耐性菌は221例、100rの耐性菌は232例であるが、これらの中でc発育をしたものは前者で24.4%、後者で11.2%、これを平均すると17.8%となる。PASでは1r耐性菌127例、10r耐性菌118例であるが、c発育を示すものは前者で29.1%、後者で28.8%、平均29.0%である。INHでは0.1r耐性菌95例、1r耐性菌59例、5r耐性菌205例で、このうちc発育を示すものはそれぞれ11.6%、11.9%、12.7%であつて、これを平均すると12.1%となる。

以上を総括すると、c発育はいずれの耐性菌にも認められるが、もつとも多いのはPAS耐性菌であつて、次はSM耐性菌であり、INH耐性菌はもつとも少ない。直接法でも間接法でも、率において多少の差を示すものもある

Table 1. Growth of SM Resistant Tubercle Bacilli

		Direct method	Indirect method	Total
SM 10 γ	Number of tests	62	159	221
	a	12 (19.4)	21 (13.2)	33 (15.0)
	Size of colonies b	38 (61.2)	96 (60.4)	134 (60.6)
	c	12 (19.4)	42 (26.4)	54 (24.4)
SM 100 γ	Number of tests	122	110	232
	a	22 (18.0)	22 (20.0)	44 (19.0)
	Size of colonies b	88 (72.2)	74 (67.3)	162 (69.8)
	c	12 (9.8)	14 (12.7)	26 (11.2)

Notes: Figures indicate the number of tests.
Figures in parentheses indicate percentage.

Table 2. Growth of PAS Resistant Tubercle Bacilli

		Direct method	Indirect method	Total
PAS 1 γ	Number of tests	64	63	127
	a	11 (17.2)	13 (20.6)	24 (18.9)
	Size of colonies b	38 (59.4)	28 (44.5)	66 (52.0)
	c	15 (23.4)	22 (34.9)	37 (29.1)
PAS 10 γ	Number of tests	72	46	118
	a	6 (8.3)	8 (17.4)	14 (11.9)
	Size of colonies b	47 (65.3)	23 (49.9)	70 (59.3)
	c	19 (26.4)	15 (32.7)	34 (28.8)

Note: The same as in table 1.

が、大部分はほぼ同じ程度に c 発育を認めることができる。

ロ. 耐性と感性の混合菌, 感性菌

耐性菌と感性菌の混合 491 例, 感性菌 77 例中の c 発育をみると, 表 4 のように前者で 5.7%, 後者で 6.5% であつて, 両者の間に差はない。また感性菌および感性菌の混合の菌での c 発育の率は, SM, PAS, INH の混入した培地に発育したこれらの耐性菌に比して著明に少ない。

Table 3. Growth of INH Resistant Tubercle Bacilli

		Direct method	Indirect method	Total
INH 0.1 γ	Number of tests	36	59	95
	a	12 (33.3)	14 (23.7)	26 (28.4)
	Size of colonies b	20 (55.6)	38 (64.4)	58 (60.0)
	c	4 (11.1)	7 (11.9)	11 (11.6)
INH 1 γ	Number of tests	27	32	59
	a	3 (11.1)	8 (25.0)	11 (18.6)
	Size of colonies b	22 (81.5)	19 (59.4)	41 (69.5)
	c	2 (7.4)	5 (15.6)	7 (11.9)
INH 5 γ	Number of tests	99	106	205
	a	24 (24.2)	31 (29.2)	55 (26.8)
	Size of colonies b	63 (63.7)	61 (57.6)	124 (60.5)
	c	12 (12.1)	14 (13.2)	26 (12.7)

Note: The same as in table 1.

Table 4. Growth of Mixed Drug Resistant and Sensitive Tubercle Bacilli and of Drug Sensitive Tubercle Bacilli

		Direct method	Indirect method	Total
Mixed resistant and sensitive strains	Number of tests	192	299	491
	a	33 (17.2)	56 (18.7)	89 (18.1)
	Size of colonies b	145 (75.5)	229 (76.6)	374 (76.2)
	c	14 (7.3)	14 (4.7)	28 (5.7)
Sensitive strains	Number of tests	21	56	77
	a	5	4	9 (11.7)
	Size of colonies b	15	48	63 (81.8)
	c	1	4	5 (6.5)

Note: The same as in table 1.

2) 発育と集落数

抗結核剤の混入してある培地に発育した SM, PAS, INH のすべての耐性菌を集計して, 集落数と発育の状

Table 5. Growth and Number of Colonies

		Number of colonies				Countable	Total
		Not countable					
		冊	冊	冊	冊		
Direct method	Number of tests	44	87	104	163	84	482
	a	1 (2.3)	8 (9.2)	19 (18.3)	34 (20.8)	28 (33.3)	90 (18.7)
	b	42 (95.4)	70 (80.5)	74 (71.1)	88 (54.0)	42 (50.0)	316 (65.5)
	c	1 (2.3)	9 (10.3)	11 (10.6)	41 (25.2)	14 (16.7)	76 (15.8)
Indirect method	Number of tests	23	78	162	264	48	575
	a	0	7 (9.0)	44 (27.2)	54 (20.5)	12 (25.0)	117 (20.5)
	b	21 (91.3)	60 (76.9)	99 (61.1)	126 (47.7)	33 (68.7)	339 (58.8)
	c	2 (8.7)	11 (14.1)	19 (11.7)	84 (31.8)	3 (6.3)	119 (20.7)

Note: The same as in table 1.

態につき相関関係を求めてみた。その成績は表5のようである。c発育を示したものは、直接法482例中76例(15.8%)、間接法575例中119例(20.7%)であるが、直接法ではおおよび数えられるものにおいては冊〜冊に比して多いが、間接法では冊においてとくに多く、数えられるものでもつとも少ない成績を示した。これを総括すると、われわれの成績では、集落数とc発育の間にははつきりした相関関係は認められない。なおa発育は集落数の少ないほど多い傾向を示しているが、直接法においてはとくにこの関係ははつきりしている。

3) 発育と耐性検査方法

表1~4にはSM, PAS, INH耐性菌, 耐性菌と感性菌との混合, 感性菌についての発育の状態を直接法と間接法に分けて記してある。SM, PAS, INHの耐性菌および感性菌では間接法においては直接法に比しc発育が多いが、耐性菌と感性菌の混合したものでは、反対に直接法に多い。

総括および考察

われわれは抗結核剤に対する耐性検査の完了した耐性菌や感性菌を材料にして、主として発育の悪い菌についてはたして発育の悪いものがどの程度存在するものか、さらにSM, PAS, INH等の薬剤の種類により耐性の度によりあるいは耐性検査の方法によつて、発育の悪いものの出現する率に差があるかどうかを検討した。その結果、発育の悪い菌は、抗結核剤の混入した培地に発育した耐性結核菌, 抗結核剤の混入しない対照培地に発育した耐性, 感性の混合した菌, 感性菌のいずれの場合にも認めることができたが、耐性結核菌ではもつとも多く平均20%であり、これに比して感性菌や耐性菌と感性菌との混じった菌ではいずれも6%前後で、前者に比して非常に少ない。感性菌で発育の悪いものが少ないことはともかくとして、耐性菌と感性菌の混合したものでも感性菌同様に少なかったのは、抗結核剤の混入された培地に

発育した発育の悪い耐性菌であつても、抗結核剤の混入していない培地では発育のよいものもあること、あるいは大量の発育のよい菌の中に少量の発育の悪い耐性菌がまじつても結局はよい発育を示すものであろう。耐性菌についてさらに耐性の種類別に分けてみると、もつとも多いのはPAS耐性菌であつて、次はSM耐性菌であり、もつとも少ないのはINH耐性菌であつた。PAS¹⁾およびINH^{2)~6)}耐性菌に発育の悪いものが多いことは、以前からいわれていることであるが、比較的多いのではないかと推定されたINH耐性菌に少なく、SM耐性菌に多かつたことは予想外であつた。また、耐性の度について分けてみると、PASの1r, 10r, INHの0.1r, 1r, 5rの耐性菌の間には差がなかつたが、SM耐性菌では10rにおいては100rに比して2倍も多かつた。これは偶然だつたのかも知れない。方法別にみると、直接法と間接法との間には差はない。このことは、c発育はその性状のある期間保持することを暗示するのかもしれないがさらに検討したい。

次に、耐性菌, 感性菌を全部一緒にして、これを集落の数で区分し、集落数と発育の悪い菌との関係を追及したが、はつきりした傾向を認めなかつた。

われわれの研究の成績は以上のものであるが、結核菌の発育はそのおかれた環境の種々の事情で左右されることは周知の事実である。たとえば封鎖の仕方によつても異なるし、同じキャップによる封鎖でも、それが密であるか粗であるかによつても異なってくることは、われわれの常に経験するところである。しかしその影響の大部分は発育がaであるかbであるかの程度の差であつて、bとcとの発育の差を示すことは少ない。したがつてc発育の大部分は結核菌自身の性状によるのではないだろうか。しかし今回は、それが本当の意味の劣性発育かどうかについては検討していない。この点についてはさらに検討を進めたいと思つている。またこれらc発育を示す耐性菌あるいは感性菌が臨床的にどのような意味をも

つものであるかについても、さらに検討したいと思つているが、大ざつばにいつて、耐性検査においてわれわれが通常検査として取り扱つているものの中に相当数の発育の悪いものが存在していることは、化学療法下の現今の傾向であつて、化学療法以前にはなかつたものと思われる。したがつて、その集落の少ない場合には発育の悪い耐性菌は見落とす可能性もあるが、耐性検査の成績がその後の化学療法のうえに影響するのであるから、観察はとくに慎重にすべきである。

結 論

われわれは通常検査としてゴムのキャップを使用した3%小川培地に1~2カ月培養し、耐性結核菌の検査の完了した(直接法213例、間接法355例)菌株について、SMについては10r, 100r, PASについては1r, 10r, INHについては0.1r, 1r, 5rの混入した培地に発育した耐性結核菌、対照培地に発育した感性菌および耐性菌と感性菌の混合したものについて、発育の程度をよい発育、普通の発育、悪い発育に分けて観察し、とくに発育の悪いものがどの程度に存在するものであるかを観察した。その結果、次のような成績を得た。

1) 抗結核剤の混入した培地に発育した耐性結核菌では、PASでもつとも多く29.0%、次にSMで17.8%、INHでは12.1%でもつとも少なかつたが、耐性の度による差を認めなかつた。また対照培地に発育した耐性菌と感性菌との混合および感性菌では、それぞれ5.7%

6.5%であつて、前者のSM, PAS, INHの耐性結核菌に比して著明に少なかつた。

2) この発育の悪い結核菌は直接法でも間接法でも認められ、両方法の間には差はなかつた。

3) 次に集落数と発育の悪い結核菌との関係をみたが、はつきりした傾向をつかむことはできなかつた。

以上の成績からわれわれは耐性検査の観察にはこれらの発育の悪い菌を見落とすことのないように注意する必要があるが、発育の悪い菌の諸性状、臨床的な意味についてはさらに検討したいと思つている。

文 献

- 1) 小酒井・石川・飯村：臨床病理，41：278，昭31。
- 2) Myron, W. Fischer：Am. Rev. Tbc., 66：626，1952。
- 3) Morse, W. C., Major, M. S. C., Walrath, P. Z., Weiser, O. L. and Stratten, G.: Transaction of the 13th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration, U.S.A., 277, 1954。
- 4) Cohn, M. L., Oda, Kovity, C. and G. Middlebrook：Am. Rev. Tbc., 70：465，1954。
- 5) Middlebrook, G., Cohn, M. L. and Schaefer, W. B.: Am. Rev. Tbc., 70：852，1954。
- 6) 高橋：モダンメディア，2：8，昭31。

Studies on Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis Grown Poorly on Media Used for Routine Clinical Tests I. Studies on Mycobacterium tuberculosis cultured on sensitivity test media.

It is well known that nowadays many strains of tubercle bacilli from clinical test materials do not reveal a vigorous growth, since antituberculous chemotherapy is widely employed. However, only fragmentary views have been reported on the growth of such strains.

Since this fact will exert much influence on the results of examination of tubercle bacilli, the authors attempted a study on it, especially from the point of the frequency of such strains.

The strains used were those grown on the media of routine sensitivity tests (213 strains by direct method and 355 strains by indirect method). The growth of tubercle bacilli was examined on the drug resistant strains which had grown up on the media containing either streptomycin 10 mcg, 100 mcg, PAS

1 mcg, 10 mcg. or INH 0.1 mcg, 1 mcg, 5 mcg/ml, on the drug sensitive strains which had grown on the control media and on the mixed drug resistant and sensitive strains. The growth was rated as excellent, usual or poor.

The following are the results obtained.

1) On the drug resistant strains grown on the media containing an antituberculous agent, frequency of poor growth was highest in PAS resistant strains (29%) and decreased in the order of SM resistant strains (17.8%) and INH resistant strains (12.1%). There was no significant difference in the frequency due to the degree of sensitivity.

On the mixed drug resistant and sensitive strains and on the drug sensitive strains, percentages of the frequency were 5.7% and 6.5% respectively which were much lower as compared with those of SM, PAS or INH resistant strains.

2) These strains grown poorly were examined both by the direct and indirect methods, and there

was no difference between the results obtained by these two methods.

3) There was found no definite relation between the number of colonies and the strain with poor growth.

From the results obtained, one must be cautious not to leave these poorly growing bacilli unnoticed when the drug sensitivity tests are performed. The characteristics of such strains and their clinical significance will be investigated in the future.