

## 非定型抗酸菌症の化学療法のための血清総合抗菌力

中 村 善 紀

日本鋼管清瀬浴風院

受付 昭和 39 年 6 月 30 日

SERUM ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY TEST FOR  
CHEMOTHERAPY OF THE PATIENTS INFECTED  
WITH UNCLASSIFIED MYCOBACTERIA

Yoshinori NAKAMURA\*

(Received for publication June 30, 1964)

The unclassified mycobacteria, especially, scotochromogens and nonphotochromogens are more resistant than *M. tuberculosis* to streptomycin, isoniazid and para-aminosalicylic acid. Today the major problem in the chemotherapy is the formulation of drug regimens for the treatment of the patients infected with unclassified mycobacteria which have become resistant to the primary anti-tuberculous drugs.

The "specific serum antimycobacterial activity test" described by Dye and Kass has been considered as useful for the formulation of the drug treatment of tuberculous patients.

This paper presents the study on modified method of 2-hours serum antimycobacterial activity test to obtain adequate chemotherapy regimens for unclassified mycobacterial patients.

## Materials and methods

1. Unclassified mycobacteria were cultured from sputum or resected lung specimens. The strains used were as follows :  
scotochromogens : Nagashima, Ariga, Mitsui A, Uemura, Aoki and Ishii  
nonphotochromogens : Mitsui B, Hikichi, Tanaka, Kamamori and Shirakashi
2. Serum :  
serum of normal adults  
serum of tuberculous patients under chemotherapy  
serum of patients infected with unclassified mycobacteria
3. The bioassay method is as follows : The serum is diluted with Kirchner liquid medium, to make a series of tubes with dilutions of 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 and 1 : 64. Each tube is inoculated with 0.01 mg of unclassified mycobacteria. These tubes are incubated at 37°C for three days. At the end of this period, one drop of 0.05% Resazurin solution is added to each tube. The tubes with dye are incubated at 37°C for twenty-four hours. The color of the control tube with mycobacteria becomes pink by the reduction of Resazurin. In the tube containing serum with inhibitory activity, the color remains either blue or purple by the complete or incomplete prevention of the reduction of Resazurin. The highest dilution of serum which prevented the reduction of Resazurin to purple is regarded as the titer of antimycobacterial activity.

## Results

Sera of normal adults did not inhibit the growth of unclassified mycobacteria.

Sera obtained from the patients who received SM, INH and PAS scarcely inhibited the

\* From Nippon Kokan Kiyose Yokufuin, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

growth of all scotochromogens and nonphotochromogens.

The serum activity, to unclassified mycobacteria, 2 hours after the drug administration was higher than that after 4 hours.

The chemotherapy with KM plus EB plus INH or TH will be successful in the treatment of the disease caused by unclassified mycobacteria.

It is believed that this test can serve as a guide to the effective antimycobacterial treatment for the patients infected with unclassified mycobacteria.

非定型抗酸菌は今日広く使用されている抗結核剤に対して感受性が低く、化学療法で本症を治療することは困難であるかのようにみられている。切除療法がその根治療法であるという考えが支配的である。しかし数多くある抗結核剤中何が有効であるか、またどの薬剤の組合せが治療効果をあげうるか、実際には解明されていない。

われわれは非定型抗酸菌症の患者の喀痰あるいは切除肺病巣から分離した *Scotochromogen* 5 株, *nonphotochromogen* 5 株と染谷<sup>11)</sup>の分離した *Scotochromogen* 1 株 (石井株) について各種抗結核剤の感受性検査を行なった。それによつて患者の化学療法の指標を得ようと思つた。しかし全部の抗結核剤について耐性検査を行ない、かつその併用療法を知るためにはあまりに繁雑である。日数もかかり、培地を多数用意しおく不便もある。しかも *in vitro* における耐性成績がはたして血中の菌発育阻止力を表現しうるか疑問である。このように考えると実際に化学療法剤を投与した患者の血中の総合抗菌力をしらべたほうが臨床家に都合よく迅速に治療方針を立てるに役立つと思われる。

かかる意味で Dye および Kass<sup>12)</sup>の Specific serum antimycobacterial activity test (SSAAT) は実際的である。本法は元來患者自身の結核菌を用いて本人の化学療法中の血清の抗菌力をみる方法である。著者は非定型抗酸菌を用いて化学療法中の結核患者血清および非定型抗酸菌症患者の血清の抗菌力を測定したので、Dye および Kass の方法の変法を考案した。また Kubica の Resazurin を用いての迅速耐性検査法をも応用した。この血清総合抗菌力検査法が、非定型抗酸菌症の化学療法の指標となりうるやを検討するため実験を行なった。

#### 実験材料および実験方法

##### 1. 使用菌株

供試菌株は全部著者の分離したもので本菌による肺炎患患者の喀痰あるいは切除肺病巣から培養したものである<sup>3)~5)13)</sup>。

*scotochromogen*

長島 (SJ-8), 有我 (SJ-9), 三井 A (SJ-10), 植村, 青木 (SJ-14)

*nonphotochromogen*

三井 B (NJ-14), 引地, 田中, 白樫, 釜森

括弧内の記号は非定型抗酸菌研究会に登録されている菌株<sup>14)</sup>である。

##### 2. 血清

健康者成人血清, 化学療法中の結核患者血清, 化学療法中の非定型抗酸菌症患者の血清。

##### 3. 実施方法

a) 単独あるいは併用抗結核剤投与後 2 時間および 4 時間後に採血し, その血清を Kirchner 液体培地で 4×, 8×, 16×, 32×, 64× まで稀釈し各管 2 cc 宛とした。実施にさいしては常に菌液, 血清, 培地の対照をおいた。

b) 接種菌はまず 1% 小川培地に十分増殖した非定型抗酸菌苔の 1 白金耳を約 5 cc の Kirchner 培地に平等浮遊液とした。これを 37°C 孵卵器に 7~10 日間培養する。その菌液の 0.1 cc (菌量として 0.01 mg) を上記稀釈血清中に混じる。

c) 3日間 37°C で培養。

d) 0.05% Resazurin 1 滴を滴下, よく混合して再び 37°C で培養。

e) 18~24 時間後色調の変化をみる。

赤色は菌が十分発育し Resazurin を還元している (+), 紫色は菌の発育が不完全阻止されている (±), 青色は菌の発育が完全阻止されている (-)。

本実験では判定として紫色すなわち菌の発育が不完全ながら阻止されているものとみなして, この紫色を示す最高稀釈倍数を力価とした。

#### 成 績

##### 1. 健康成人血清

4名の健康人血清の非定型抗酸菌に対する抗菌力は表 1 に示すように 4× でやつと認められる程度である。三井 A 株では 8× まで不完全阻止がみられた。*Scotochromogen* と *nonphotochromogen* とでは差異が認められず, 正常血清では非定型抗酸菌に対する抗菌力はまず認められず, せいぜい 4× であつた。

##### 2. 薬剤投与後の採血時間による抗菌力の差異

抗結核剤投与後の血中濃度に時間的差異のあることは周知のことである。したがつて血清抗菌力に差異のある

ことも想像される。肺結核患者のSSAATの実施に当たって研究者によつて採血時間はまちまちである。著者はかつてSM非経口投与では2時間後に血中濃度が最高値に達するのを経験<sup>7)</sup>しているので、2時間と4時間後の血清について比較検討した。

まず抗結核剤の単独投与について差異をみた。結核患者にSM 1gを筋注して2時間および4時間の抗菌力をみた。表2にみるように釜森株、白樫株とも2時間後には16×まで不完全抗菌力を示したが、4時間では釜森株は4×の不完全抗菌力を、また白樫株では全く抗菌力を認めなかつた。SM単独投与ではnonphotochromogenに対しては無効と思われた。

KM 1g筋注では2時間血清釜森株で16×不完全抗菌力、8×まで完全抗菌力を示し、4時間血清では8×に低下していた。白樫株では2名とも、2時間血清64×、32×不完全抗菌力、16×まで完全抗菌力を示した。4時間血清では1名は32×まで低下したが、1名は64×で2時間と同じであった。KM血清はこの2株に対して強い抗菌力をもっていることがわかつた。KMは非定型抗酸菌症の治療に希望をいだかせたが、菌株によつて差異のあることも明らかとなつた。

Ethambutol (EB) 1g経口投与した血清では釜森株2時間16×、4時間4×、白樫株では2時間8×、4時間8×であつた。大体SM 1g筋注と同じ程度の抗菌力をもつていた。

要約すれば非定型抗酸菌とくにnonphotochromogenに対してKMが血清抗菌力強く、かつ2時間値のほうが4時間値より高い。またEBもかなり強い抗菌力をもっているものと思われる。

以上の成績から次の実験には2時間血清を用いて抗菌力をしらべた。

### 3. 各種併用療法血清の総合抗菌力

結核患者に各種抗結核剤を同時に投与して、2時間後血清について釜森株を用いて抗菌力をみたのが表3である。SM・INH・PAS、CS・INH・THでは釜森株に対して抗菌力をもっていない。しかしKM・INH、KM・INH・SFの血清では64×で不完全抗菌力、16×で完全抗菌力を示した。KM・CS・THでは16×不完全抗菌力、8×

Table 1. The Antimycobacterial Activity Test of Normal Sera to Unclassified Mycobacteria

Name of normal adult	Unclassified mycobacteria	4×	8×	16×	32×	64×	C1	C2	C3	
■■■■	Scotochromogens	Nagashima	+	++	++	++	++	+	-	-
		Ariga	+	++	++	++	++	+	-	-
		Mitsui A	-	+	++	++	++	+	-	-
		Uemura	-	++	++	++	++	+	-	-
		Aoki	+	++	++	++	++	+	-	-
■■■■	Nonphotochromogens	Hikichi	+	++	++	++	++	+	-	-
		Tanaka	+	++	++	++	++	+	-	-
		Mitsui B	+	++	++	++	++	+	-	-
		Shirakashi	+	++	++	++	++	+	-	-
		Kamamori	+	++	++	++	++	+	-	-

Table 2. Difference between Antimycobacterial Activity Tests with 2 and 4 Hours Sera after Application of Single Chemotherapy

Name of patient	Chemotherapy	Non-photo	4×	8×	16×	32×	64×	C
■■■■	SM 1g intramuscularly } 2 h serum 4 h serum	Kamamori	+	+	+	++	++	++
			+	++	++	++	++	++
■■■■	SM 1g intramuscularly } 2 h serum 4 h serum	Shirakashi	+	+	+	++	++	++
			++	++	++	++	++	++
■■■■	KM 1g intramuscularly } 2 h serum 4 h serum	Kamamori	-	-	+	++	++	++
			-	+	++	++	++	++
■■■■	KM 1g intramuscularly } 2 h serum 4 h serum	Shirakashi	-	-	-	+	+	++
			-	-	+	+	++	++
■■■■	KM 1g intramuscularly } 2 h serum 4 h serum	Kamamori	-	-	+	++	++	++
			-	-	++	++	++	++
■■■■	KM 1g intramuscularly } 2 h serum 4 h serum	Shirakashi	-	-	-	+	+	++
			-	-	-	+	+	++
■■■■	EB 1g orally- } 2 h serum 3 h serum	Kamamori	-	+	+	++	++	++
			++	++	++	++	++	++
■■■■	EB 1g orally- } 2 h serum 4 h serum	Shirakashi	-	+	++	++	++	++
			+	++	++	++	++	++

完全抗菌力を表わし、EB・INH・SF、EB・INH・THでは16×不完全抗菌力、4×完全抗菌力を示した。KMを含む併用療法がもつとも抗菌力が強いが、かなり個人差のあることも明らかである。EBを含む併用療法も次いで抗菌力が強い。

白樫株についても結核患者の併用療法血清の総合抗菌力をみた。その成績は表4のとおりである。この場合も相当個人差が認められるが、一次抗結核剤SM・INH・PAS併用療法では全く抗菌力がなく、強力な二次抗結核剤と思われるTH・CS・INH併用でも抗菌力は全くなかつた。KM・CS・THでは8×~16×の不完全抗菌力を示し、KM・INH・SFでは64×まで不完全抗菌力を、

16×まで完全抗菌力を示した。これは個人の有する特異的な抗菌因子が考えられる。EB・INH・SFでは8×まで不完全抗菌力を示して、SM・INH・PAS併用より強いようにみられる。

非定型抗酸菌症患者釜森および白樫に表5に示す併用療法を行ない、2時間血清について両菌株について抗菌力を検査した。すなわちSSAATの力価をしらべてみた。患者釜森に対してはKM・EB・TH併用療法がもつとも有効であるようにみえる。また患者白樫については同菌を32×まで発育阻止するKM・EB・INHあるいはKM・EB・THが効果治療と考えられた。

考 案

今日のように多数の抗結核剤が発見され、かつ併用療法が広く行なわれるようになり、その有効な組合せを迅速に知るためにDyeおよびKassによつて提唱された特異血清抗菌力試験は利用価値があると思われる。また耐性菌患者が増加してきているので、その化学療法方式の選択にも簡易な技術として大いに取りあげられるべきであろう。結核患者についてのSSAATの研究はすでに岡(捨)<sup>8)</sup>、村田ら<sup>9)</sup>および下村<sup>10)</sup>がその成績を報告し、臨床上有用であることを述べている。SSAATの値が耐性検査成績と必ずしも一致しないことは村田も認めている。その力価に個人差のあることは岡および村田も述べている。このtestの力価が8×~16×以上であれば結核菌の場合は陰転する率が高いといわれている。

非定型抗酸菌は多くの抗結核剤に対して感受性が低いので、有効化学療法剤あるいはその併用療法を選択は困難である。通常の耐性検査をもつてしては繁雑であり、迅速性を欠く点で臨床家には不便である。今日非定型抗酸菌症に対していかなる併用療法が効果的、換言すれば菌を陰性化することができるか未知数である。著者はかかる意味で非定型抗酸菌症の有効化学療法方式を発見しようと血清総合抗菌力の研究を企図した。元来非定型抗酸菌はphotochromogenを除いて、S型で平等浮遊液になりやすく、かつ発育も迅速なので結核菌の場合とその方法を変えることにした。実験法の項

Table 3. Serum Antimycobacterial Activity Test to Nonphotochromogens (Kamamori strain)

Name of tuberculous patient	Chemotherapy	4×	8×	16×	32×	64×	C
■	SM, INH, PAS	++	++	++	++	++	++
■	SM, INH, PAS	++	++	++	++	++	++
■	CS, INH, TH	+	++	++	++	++	++
■	CS, INH, TH	++	++	++	++	++	++
■	EB, INH, SF	-	+	+	++	++	++
■	EB, INH, TH	-	+	+	++	++	++
■	KM, INH	-	-	+	+	+	++
■	KM, INH, SF	-	-	-	+	+	++
■	KM, CS, TH	-	-	+	++	++	++

Table 4. Serum Antimycobacterial Activity Test to Nonphotochromogens (Shirakashi strain)

Name of tuberculous patient	Chemotherapy	4×	8×	16×	32×	64×	C
■	SM, INH, PAS	++	++	++	++	++	++
■	SM, INH, PAS	+	++	++	++	++	++
■	CS, INH, TH	++	++	++	++	++	++
■	EB, INH, SF	+	+	++	++	++	++
■	EB, INH, SF	+	+	++	++	++	++
■	KM, CS, TH	+	+	+	++	++	++
■	KM, CS, TH	+	+	++	++	++	++
■	KM, INH, SF	-	-	-	+	+	++

Table 5. Specific Serum Antimycobacterial Activity Test of the Patients Infected with Nonphotochromogens

Name of patient infected with nonphotochromogen	Chemotherapy	nonphot.	4×	8×	16×	32×	64×	C
■	SM, INH, SF		+	++	++	++	++	++
	KM, CS, TH	■	-	-	+	+	++	++
	KM, EB, TH		-	-	-	+	++	++
■	KM, CS, TH		-	+	+	++	++	++
	KM, INH, SF	■	-	+	+	++	++	++
	KM, EB, TH		-	-	-	+	+	++
■	KM, EB, TH	■	-	-	+	+	++	++
	KM, EB, INH		-	-	+	+	++	++
	KM, EB, INH	■	-	-	-	+	++	++

KM and SM, 1g, intramuscularly.  
INH 0.1g, PAS 3g, SF 0.5g, CS 0.25g, TH 0.1g, and EB 0.25g orally.

で述べたように稀釈血清中の菌の培養期間を3日とし、TTC (2,3,5-triphenyl-2,1,3,4-tetrazolium chloride) のかわりに Resazurin を用いて、菌増殖による色素の変化をみた。この方法で一応所期の目的を達することができた。

まず健康成人血清の非定型抗酸菌 Scotochromogen および nonphotochromogen に対する抗菌力をみた。力価はせいぜい4×までで、健康人血清は村田らが行なつた

結核菌に対する抗菌力価と同じであつた。

血清総合抗菌力は岡らのいうごとく薬剤の血中濃度のほかに、免疫を含めた個体の抵抗力および血中の中間代謝物質などが関係するであろうが、やはり薬剤の血中濃度がその主役を演ずるものと思われる。よつて薬剤投与後の時間的推移が、この力価に関係あることは推察される。Dye および Kass は 6 時間血清の抗菌力を測定している。村田、下村は 4 時間血清を、岡らは 3~4 時間血清について検査している。著者はかつて SM 筋注後の血中濃度を測定したことがあるが、そのさい 2 時間後に最高濃度に達し、爾後時間の経過とともに低下していくことを報告<sup>7)</sup>した。Place および Thomas<sup>10)</sup>は Ethambutol を経口投与したとき、2 時間で最高血中濃度に達することを発表している。著者は結核患者に SM 1g 単独投与して 2 時間、4 時間の血清について nonphotochromogen 釜森株、白樫株を用いて抗菌を測定した。SM は非定型抗酸菌に対して発育阻止力は弱く 2 時間血清では 16× まで不完全抗菌力で、4 時間では全く抗菌力が消失している。しかし KM 1g 筋注では非定型抗酸菌の発育阻止力は強い。とくに白樫株に対しては 2 時間血清で 64× まで不完全抗菌力 16× まで完全抗菌力を示した。4 時間血清では 32× と一段階低下したものと、2 時間値と全く同じ値を示したものとあつた。釜森株は 2 時間値 16×、4 時間値 8× と低下している。同じ nonphotochromogen でも菌株によつて発育阻止される値がかなり違つている。EB 1g 経口投与では白樫株では 2 時間値 8×、4 時間値 4× となり、釜森株では 2 時間値 16×、4 時間値では全く抗菌が認められなかつた。これは Place らの成績と一致していた。これらの成績から血清総合抗菌力測定には 2 時間血清を用いることによつて最高値を知ることができるので妥当と考える。単独投与の成績から KM が非定型抗酸菌に対してもつとも血清抗菌力が強く、EB は SM とほぼ同じ抗菌力を示した。

表 3 に示すように釜森株について各種の併用療法を行なつた結核患者の 2 時間血清の抗菌力をみた。一次抗結核剤併用療法では全く血清の総合抗菌力が認められなかつたが、KM, INH, KM·INH·SF および KM·CS·TH では 64~16× の抗菌力を示した。表 4 の白樫株についてみると、通常の一次抗結核剤併用療法では全く血清抗菌力を示さなかつたが、KM·CS·TH 療法では 16×、KM·INH·SF 療法では 64× まで抗菌価を示した血清もあつたが、個人差も影響あることがわかつた。

非定型抗酸菌症患者の治療下血清について同患者の排出した菌で抗菌力を測定したのが表 5 でいわゆる特異血清抗菌力試験である。患者釜森血清は釜森株に対して SM·INH·SF 投与ではほとんど抗菌力を表わさないが、KM·CS·TH あるいは KM·EB·TH では 32× まで抗菌価を示した。ことに後者では完全抗菌価は 16× まであ

つた。患者白樫に KM·EB·TH あるいは KM·EB·TH を投与するとその血清は白樫株に対して 32× まで不完全抗菌力を、8× まで完全抗菌価を認めた。

Dye らは SSAAT 値が 16× 以上示した結核患者 23 名中 22 名は 3 カ月以内に菌が陰転したのをみて、SSAAT 値 16× 以上になるような regimen をえらぶべきであるという。村田らは血清総合抗菌値は高いほうが一般に陰転率がよく 8× 以上のものは全例菌に対してなんらかの打撃を与えると述べている。下村は SM, KM, VM を含む療法では SSAAT 値 8× 以上示した 25 例中 16 例 (64%) が菌の陰転をみ、4× 以下では 1 例もなかつた。SSAAT 値と菌の陰性化との間にある程度平行関係がみられるという。

非定型抗酸菌症でも 16× 以上の血清抗菌値を示す併用療法を行なえば菌の陰転の希望がもてるものと考えられる。すなわち KM·EB·TH あるいは KM·EB·INH 併用療法に期待がかけられる。非定型抗酸菌は Runyon の分類によつて分けても各群中の菌はそれぞれ異なつていものと思われるので、菌株ごとに血清抗菌力を測定して有効治療法を選択すべきである。しかし非定型抗酸菌症の病巣の拡り、病巣の新旧、空洞の有無、年令等の因子もまた治療効果を左右することも考えねばならない。血清総合抗菌力測定は有効治療方式選定の水先き案内として役立てることができる。

現在非定型抗酸菌症患者に KM·EB·INH 療法を行なつて菌が陰性化し、レ線写真で病巣の改善を認めた例がある。

## 結 論

肺非定型抗酸菌症患者から自家分離した Scottochromogen 5 株と Nonphotochromogen 5 株を用いて健康人血清の抗菌力を測定し、釜森、白樫 2 株については抗結核剤投与後の血清総合抗菌力をみた。非定型抗酸菌症の SSAAT 値から本症の化学療法方式の指針を得ることができた。

- 1) 健康人血清は非定型抗酸菌に対して抗菌力はほとんど認められない。
- 2) SM, KM および EB 単独投与の場合 2 時および 4 時間血清の抗菌力を測定すると、2 時間値のほうが高い。
- 3) KM 筋注血清がもつとも高い抗菌値を示し、EB, INH は抗菌力を増強するような印象を受けた。
- 4) 一次抗結核剤 3 者併用療法血清にはほとんど抗菌力が示されなかつた。KM を含む併用療法 KM·EB·INH や KM·EB·TH が非定型抗酸菌症治療に効果的であることが期待された。

した。

本研究に御指導と御援助（ことに Ethambutol について）をいただいた結核予防会結核研究所長岩崎竜郎博士に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) W. E. Dye & I. Kass : Transaction of the 21st Research Conference in Pulmonary Disease. 293, 1962.
- 2) G. P. Kubica : Am. Rev. Resp. Dis. 83, 593, 1963.
- 3) 中村善紀ら : 日本胸部臨床, 19 : 134, 1960.
- 4) 中村善紀ら : 日本胸部臨床, 20 : 188, 1961.
- 5) 中村善紀 : 日本胸部臨床, 23 : 190, 1964.
- 6) 日比野進 : 日本医事新報, 2086号, 1964.
- 7) 中村善紀 : 日本臨床結核, 9 : 604, 1950.
- 8) 岡捨己 : 日本胸部臨床, 21 : 920, 1962.
- 9) 村田彰 他 : 胸部疾患, 7 : 654, 1963.
- 10) V. A. Place & J. P. Thomas : Am. Rev. Resp. Dis. 87 : 6, 1963.
- 11) 染谷四郎 他 : 日本細菌学雑誌, 7 : 605, 1952.
- 12) 下村康夫 : 胸部疾患, 8 : 250, 1964.
- 13) 中村善紀 : 日本医事新報, 1959号, 1961.