

原 著

ファージ型別を利用した家族内結核の感染源追求

第1編 人型結核菌をファージ型別するための実験的研究

北 原 康 平

長崎大学医学部第2内科
(主任 饒島四郎教授
指導 原 耕平 助教授)

受付 昭和 47 年 9 月 28 日

STUDIES ON THE IDENTIFICATION OF INFECTION SOURCE
FOR PULMONARY TUBERCULOSIS IN
FAMILY USING BACTERIOPHAGE
TYPES AS A MARKER*I. Fundamental Studies on Phage Typing of *M. tuberculosis*

Kohei KITAHARA

(Received for publication September 28, 1972)

Phage typing of *M. tuberculosis* isolated from the patients was performed to identify the source of tuberculous infection in families.

1) The phages used were derived from the National Institute of Health in Japan. One RTD was tested by spotting 0.01 ml of ten fold dilutions starting from 1×10^8 /ml onto RVA plates overlaid with semisolid RVA containing 0.5% agar and host bacilli. Complete lysis was observed by 100 particles per 0.01 ml or more for all phages.

Thus it was defined that one RTD in our laboratory was 10^4 particles per milliliter for each phage.

In 1954, Dr. S. Froman originally reported the phage D34. However the D34 which was given to me by Dr. Murohashi did not lyse H₃₇Rv. Consequently this particular phage has been termed D34'.

2) Using one RTD, each phage was spotted on the 160 strains isolated from pulmonary tuberculosis patients. As for susceptibility, the common receptors were observed among DS6A, Y10, C3, B1, GS4E and BK₁ phages each other. D34' phage showed the most specific lysis. Accordingly it was suggested that strains of *M. tuberculosis* were divided into two lytic patterns. In one pattern, the strains show susceptibility to some of the DS6A, Y10, C3, B1, GS4E and BK₁ phages. In the other pattern, only one strain was susceptible to D34'. Since the phage types, to which the least number of strains show susceptible, seemed very useful for epidemiological studies, the BK₁ and D34' were selected for the next experiments.

3) For the reason just stated, BK₁ and D34' were selected and applied to the typing of isolated strains, and further phage typing were carried out by the following procedure. About 0.5 mg of semi-dried isolated strains in 0.5 ml of saline and 3 ml of RVA were poured over a plate of 20 ml of solidified RVA.

* From the 2nd Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 7, Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.

After incubation at 37°C for three days, 0.01 ml of phage suspensions containing 1×10^4 and 1×10^3 /ml were spotted. After additional incubation at 37°C for another 11 days, the degree of lysis was recorded.

Final reading were recorded by classifying the strains "highly susceptible", "intermediately susceptible" and "less susceptible" to each phage. That is, two concentrations of one RTD and 1/10 RTD were spotted on each bacterial lawn of the strains to be tested. When 10 phages (1/10 RTD) spotted produced plaques, such a strain was regarded as "highly susceptible" to the phage; and if 100 phage particles (1 RTD) produced no plaques, such a strain was regarded as less susceptible to the phage; the other strains were regarded as having intermediate susceptibility to the phage.

4) To test the reproducibility for phage typing, 197 isolated strains were typed five times repeatedly using BK₁, D34' and DX phage. DX phage is a mutant phage which was obtained after irradiation of X-ray on D34' phage.

Reproducible results were obtained from 191 strains. Only six strains showed non-reproducible results. The lytic pattern for these three phages was observed by the use of 197 strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis are summarized as bellow.

Thirty-two strains out of 197 strains were highly susceptible to BK₁ and less susceptible or intermediate to D34' and DX. This lytic pattern was named BK₁-Type. Eight strains were less susceptible or intermediate to BK₁ and highly susceptible to D34' and DX. This lytic pattern was named D34'-Type. Altogether sixteen strains were less susceptible or intermediate to BK₁, and highly susceptible to DX. This lytic pattern was called DX-Type. The remaining strains were not highly susceptible to any of these three phages and accordingly they were not typable.

5) The reproducibility of phage types was tested again in standard strains and in mutants resistant to drugs. The phage susceptibility of H₃₇Rv, H₃₇Ra, Aoyama B, Kurono strains to BK₁, and DX was examined 45 times, and the results were reproducible every time; that is, all of these strains were BK₁-Type. The mutants of H₃₇Rv resistant to SM, PAS, INH, KM, TH, CS, VM, EB and CPM were also BK₁-Type.

6) Similarly phage type of the strains isolated monthly from the same patient was tested to examine the reproducibility of phage types. The 240 strains were obtained from forty patients, that is, six strains from each patients for six months. Reproducible results were obtained from 38 patients, varying results were obtained from two patients.

From these results, it can be said that practical reproducibility of phage typing are obtainable using the typing method described above, and BK₁-Type, D34'-Type and DX-Type are usefull as epidemiological tools because of their rarity in the isolates.

Epidemiological meaning of these types will be discussed in other report.

はじめに

1954年 Froman ら¹⁾が抗酸菌を溶菌する4種のファージを分離して、人型菌のファージに対する感受性が菌株により異なることを報告した。わが国では、武谷(1957)²⁾⁻⁵⁾、室橋(1959)⁶⁾⁷⁾、高橋⁸⁾、須子田⁹⁾により、多数のファージが土壌から分離されたが、その後世界各国で分離された数多くのファージは、血清学的に整理されるようになってきている。

ファージを利用した人型結核菌の型別として、武谷¹⁰⁾はB1, A2およびA3ファージによる4種の型を提

示したが、同時にこれが絶対的な型でないとも述べている。また Baess¹⁴⁾はBK₁ファージを用いて、BK₁感受性株とBK₁耐性株とに、高橋⁸⁾は、S1およびS2₁ファージ(S1をH₂株で増強して得られたファージ)を用いて、S1型、S1-S2型、S2型と分型した。さらに Bates および Mitchison¹⁵⁾は、DS6A, GS4E, D34ファージを用い、DS6Aのみに溶菌される菌株をA型、DS6AおよびGS4Eの作用を受ける菌株をB型、3種のファージすべてに溶菌される菌株をC型とし、徳永¹⁶⁾は、GS4E, BK₁, B1は結核菌に対して互いに類似した感受性を示すことから、これらのファージに溶菌さ

れる群を highly susceptible, 作用されない群を less susceptible, この中間の感受性のものを intermediate と分類することを提唱した。

著者は、肺結核症の感染源を明らかにするためには、従来行われてきた未治療耐性を参考とするほか、ファージ型を利用することもその一法と考え、本研究を企画した。しかしその応用に先立つて、使用するファージの選定、ファージの型別法、成績の判定法などに検討すべき面も多々あることに気づき、まずそれらを解決して著者自身としての方法を確立した後に実地に应用することを考えた。

本編では、上記の基礎的な検討からファージ型別の方法の確立までの経過と、その後応用面と併行して実施した変異株の分離とその利用の一面とについて述べる。

実験方法

1) 供試ファージ：実験の前期には、いずれも国立予防衛生研究所より分与を受けた DS6A (Redmond), Y10 (徳永), C3 (武谷), B1 (武谷), GS4E (Redmond), BK₁ (Baess), D34 (Froman) の7ファージを使用した。これらのうち D34 は Froman の原著と特に H₃₇Rv に対する作用を欠く点で異なっていたため、本論文では D34' と呼称している。後期には、著者が D34' より分離した変異ファージ DX も追加して用いた。

2) 増殖および指示菌株：ファージと同時に分与を受けた DS6A および GS4E に対する菌株 H₃₇Rv, Y10, B1, BK₁ : F21, C3 : 120, と D34' 用の F130 の4株であり、DX の場合後述のように F130 を使用した。

3) 供試菌株：いずれもナイアシンテスト陽性の人型結核菌であり、標準菌としては教室に保存中の H₃₇Rv, H₃₇Ra, 青山B, 黒野株を、薬剤耐性菌には H₃₇Rv 由来の SM100 mcg/ml, PAS10 mcg/ml, INH50 mcg/ml, KM100 mcg/ml, CS80 mcg/ml, VM100 mcg/ml, EB10 mcg/ml, CPM100 mcg/ml のそれぞれ単独耐性株を、分離菌としては肺結核患者よりの604株を一部では重複して使用した。

4) ファージ液の力価測定：RVA 平板 (表1参照) の上に、指示菌液 (湿菌量約 1 mg/ml) 0.5 ml, 希釈したファージ液 0.1 ml と RVA 軟寒天 (寒天濃度 0.5%) 3 ml を注いで混和、固化後 37°C で培養し、ブラック数を数える方法によつた。

5) ファージ型別法：後述する予備的検討の結果以下のように実施することにした。径約 10 cm のシャーレに 20 ml の RVA 培地を注加固化させた平板上で、対数期の結核菌浮遊液 (約 1 mg/ml) 0.5 ml と RVA 軟寒天約 3 ml を混和し、固化後 37°C 3 日間培養する (この間に培地表面は乾燥し、凝固水は認められなくなる)。これに 1.0×10^4 /ml および 1.0×10^8 /ml のファ-

Table 1. Preparation of RVA Medium

Composition	
Nutrient broth	3.0 g
Polypeptone	3.7 g
Sodium pyruvate	0.75 g
Disodium phosphate	1.2 g
Monopotassium phosphate	0.55 g
Ammonium chloride	0.5 g
Sodium chloride	2.5 g
Dextrose	5.0 g
Sodium glutamate	0.5 g
Agar	11.0 g
Calcium chloride	111.0 mg
Magnesium sulfate	247.0 mg
Ferric chloride	1.0 mg
Zinc sulfate	0.1 mg
Copper sulfate	0.1 mg
Distilled water	975 ml

After sterilization by autoclave at 121°C for 20minutes, oleic albumin complex was added.

Oleic albumin complex contains bovine albumin fraction V 3.5g, oleic acid solution (oleic acid 0.12ml and 0.05 N NaOH 10ml) 5ml, distilled water 95ml and 2.5 N NaOH 0.35ml.

ジ液を、1/4 針を接続した 1 ml ツ反応用注射器を用いて、1 滴 (0.01 ml) ずつ適当な間隔をおいて滴下する (4~6 スポット/平板)。その吸収をまつて再び 37°C で培養、さらに 11 日後に判定した。なお上記の方法による 1 滴は検定の結果平均 0.01015 ml であつた。

実験と結果

1) Routine Test Dilution (RTD) の決定：人型菌のファージ型別法としては、徳永らの提唱した RTD 法が広く用いられている。しかし実施者によつて使用各ファージの 1 RTD に含まれるファージ粒子数は、 $10^8 \sim 10^9$ /ml とかなりな幅がみられ、これは判定者の主観や検定方法の差によるものと考えられる。ファージ型別に際しては滴下するファージ粒子数が成績に重大な影響を与えることから、1 RTD を 1 ml 中のファージ粒子数として規定する実験を行つた。

予研より分与を受けた7種のファージそれぞれについて、型別法に準じて宿主菌を重層した RVA 培地平板を準備し、あらかじめ実施したブラック算定を基礎として 1.0×10^8 /ml より 1.0×10^9 /ml に至る 10 進希釈液列より、それぞれを 0.01 ml ずつ滴下、それが培地に完全に吸収されるのを待つて 37°C 1~14 日培養し、溶菌が最も進んだ状態で成績の判定を行つた。

実験は5回反復して行つたが、毎回同一の結果が得られ、表2に示すようにいずれのファージにおいても 1.0

Table 2. Phage Particles in 1RTD of Each Phage

Phages	No. of particles
DS 6 A	1×10^4 /ml
Y10	1×10^4 /ml
C3	1×10^4 /ml
B1	1×10^4 /ml
GS 4 E	1×10^4 /ml
BK ₁	1×10^4 /ml
D34'	1×10^4 /ml

Table 3. Lytic Patterns for 7 Phages Observed by the Use of 160 Strains Isolated from Pulmonary Tuberculosis

Phages							No. of strains
DS6A	Y10	C3	B1	GS4E	BK ₁	D34'	
+	+	+	+	+	+	-	30
+	+	+	+	+	-	-	4
+	+	+	+	-	-	-	86
+	+	+	-	-	-	-	20
+	+	-	-	-	-	-	8
+	-	-	-	-	-	-	11
-	-	-	-	-	-	+	1

+ includes even single plaque and - indicates no plaque.

$\times 10^4$ /ml が完全溶菌を認めうる最低濃度であつた。上述の 0.01 ml は型別法の項に記した注射器法によるので、これに含まれるファージ粒子数は約 $100 \times (1.0 \times 10^4 \times 0.01015 = 101.5 \approx 100)$ となる。

2) 分離菌に対するファージの作用域: DS 6 A, GS 4 E, BK₁, B1, C3, Y10 および D34' ファージの7種を使用し、それぞれの1RTD すなわち約100粒子ずつを、分離菌160株上に滴下した。その結果を単個ブラックまたはそれ以上の溶菌を示した場合を+, 全く溶菌を認めないものを-として整理したのが表3である。D34'を除く6種のファージは表示の順に作用域が狭くなり、また順に後者に感受性を示す菌株は前者によつて溶菌され、Receptorの面からみると近縁性を想定させるものであつた。これに対しD34'はこれら6種のファージに感受性を示さなかつた1株のみに作用する特異的な態度を示した。

ファージ型別を疫学面に利用する場合、比較的作用域が狭いファージに対する感受性を用いて特異な菌株を識別したいという著者の方針から、D34'に次ぐものとして、上記6種の近縁とみられるファージのうちよりBK₁ファージを選定した。そこでこのBK₁ファージが他の分離菌群をどのように2分しうるかを検討するとともに、使用ファージ粒子数によつてどのように変化するか

Table 4. Sensitivity of 64 Isolates to Different Concentration of BK₁ Phage

Number of strains	Concentration of BK ₁ (1×10^n)					
	3	4	5	6	7	8
Sensitive	11	13	15	18	23	29
Resistant	53	51	49	46	41	35

Table 5. Host-induced Modification Observed by D34'

Phage	EOP	
	F130	Z43
D34'	1	10^4
D34' · Z43	1	1
D34' · Z43 · F130	1	10^4

D34' was propagated on original host F130.

D34' · Z43 indicates the phage propagated on Z43.

D34' · Z43 · F130 means that D34'·Z43 was propagated on F130.

をも観察することとした。すなわちBK₁ファージ液を 1.0×10^8 /mlより順次10進希釈し、上記160株とは別の分離菌64株にスポットした。

その結果を各濃度における感受性・非感受性の菌株数で示したのが表4である。 1.0×10^4 すなわち約100粒子をスポットした場合13/64株が感受性と判定され、この率は表3の30/160に近似であつた。また 1.0×10^3 (約10粒子)を用いると2株が減じて11株となつていた。この点をファージ型別に際して活用すること、すなわち1/10RTDをも併用し、これにも溶菌される感受性度の強い菌株と1RTDのみで作用される感受性度の比較的弱い菌株を区別してはとの考えが生じた。理論上1RTDを使用した成績では、被検株の増殖用菌株に対する平板効率が1:100以上の場合に感受性ありと判定されることとなるが、これに1/10RTDを併用してブラックを認める場合のみを陽性にとると、より感受性の菌株のみが取り上げられることとなる。

3) 変異ファージ株の分離: 著者の実験前半期においては、予研由来のファージの中から相互に異なつた作用域を示す代表的なものとして、BK₁およびD34'を選んで使用した。しかし、より異なつたファージを得る目的で、宿主依存性変異の面から、また紫外線または放射線照射の面から変異ファージの分離を試みた。

表5に示したようにD34'ファージの宿主菌F130に対する平板効率(EOP)を1とすると、Z43に対しては 10^{-4} であつた。D34'ファージをZ43で増殖するとF130およびZ43のEOPは同率となり、これをさらにF130で増殖しF130に対するEOPを1とすると、Z43に対しては 10^{-4} となつた。この成績から、D34' · Z43は、宿主依存性変異を起したものと考えられ

Table 6. Scheme for Reading of the Results Obtained by Phage Typing

Final readings	RTD used	
	1	1/10
Highly susceptible (+)	+	+
Intermediate (±)	+	-
Less susceptible (-)	-	-

Signs + and - are the same as Table 3.

た。この D34・Z43 は H₃₇Rv, 青山B, 黒野株を溶菌し, また供試分離株 30 株のうちの 16 株を溶菌した。しかしそのうちの 6 株は, D34・Z43 にも BK₁ にも感受性を認めたので, 予研由来の 6 株に類似した作用域を示すものと考え, これを除外した。

ついで D34' ファージに, 生残率が 10⁻⁶ 程度となる条件下で紫外線を照射し, 生残 40 ブラックのそれぞれからファージ液を調製した。分離菌 40 株に対するこれらの作用域を検討したが, 原ファージとの間に差はみられなかった。

そこで上記 40 種のファージ液のうち 1 種をとり, さらに 24,000 R のリニアックを照射し, 生残 40 ブラックから 40 種のファージ液を調製し, 分離菌 40 株に対する作用を調査した。39 種のファージ液は処置前の D34' ファージと同様の感受性を示したが, 1 種のみは D34' ファージに溶菌されない菌株を溶菌する態度を示した。このファージを仮に著者は DX と呼称することとした。なお, 本ファージの 1RTD も 1.0×10⁴/ml であつて, ファージ DS6 A, GS4 E, BK₁, B1, C3, Y10 のすべてに感受性を示す標準菌 H₃₇Rv, H₃₇Ra, 青山B および黒野株は, DX に対し D34' と同じく耐性であつた。

4) 分離株のファージ感受性とその再現性: 表 4 の結果から, 今後分離株の型別にあつては実験法の項に記したように, 各ファージについて 1RTD と 1/10 RTD を併用することとした。この場合その成績の整理に際しては, 1/10 RTD で溶菌せず 1RTD で溶菌する株の取扱いが問題となる。そこでこのような感受性度の低い菌株を除外して, しかも感受性度までも含めて再現性がみられる株について表 6 のように判定する方針とした。すなわち“感受性”または“耐性”と表現するのを避け, 被検株があるファージに対して, “highly susceptible 高感受性” “less susceptible 低感受性” と判定することとし, 100 コのファージのみで溶菌を認める菌株は intermediate として整理することとした。

表 3 において作用域に重複を認めた 6 種のファージの中から BK₁ を選び, これと作用域の全く異なるものとして D34' とその変異株 DX とを選んで, わが国および外国で分離された 197 株 (うち 39 株は表 3, 18 株は表 4 にも使用) の型別を 5 回反復して実施した。

Table 7. Results Obtained by Non-Reproducible Strains in Typing of 197 Isolates Using Phages BK₁, D34' and DX

Strains	Lytic phages observed by the typing at				
	1st	2nd	3rd	4th	5th
D47&K86	None	None	None	BK ₁	None
K104	None	None	None	None	BK ₁
K126	BK ₁	None	None	None	None
D9	None	BK ₁	None	None	None
D41	None	None	None	DX	None

Table 8. Reproducible Results Observed by Typing of 197 Isolates Using Phages BK₁, D34' and DX

No. of strains	Sensitivity to phages			Phage type
	BK ₁	D34'	DX	
32	+	-or ±	-or ±	BK ₁ type
8	-or ±	+	+	D34' type } DX type
8	-or ±	-or ±	+	
143	-or ±	-or ±	-or ±	Not typable (NT)

+, ±, - indicates highly susceptible, intermediate and less susceptible respectively.

供試 197 株のうちの 191 株 (97.0%) に, 再現性を伴う型別結果が得られ, 6 株では, 表 7 に示したように, それぞれ 1 回, 該当ファージに対して highly susceptible の態度を示した。この結果は完全な意味では再現性ありとはいえないが, 実地の応用に際しては特に障害となるものではないと考える。

再現性を認めた 191 株の型別成績をまとめると表 8 のようであつた。すなわち 32 株はファージ BK₁ に“高感受性”, D34' または DX には“低感受性”まれに“中等度”の態度を示した。8 株は DX のみに“高感受性”, 他の 8 株は DX と同時に D34' にも“高感受性”だが, これらはいずれも BK₁ にはほとんどが“低感受性”であつた。残る 143 株では 3 種のファージすべてに“高感受性”を示すものはなかつた。そこで BK₁ ファージまたは D34' ファージのみに高感受性を示すものをそれぞれ BK₁ 型, D34' 型と判定し, DX 型に高感受性を示す場合は D34' に対する反応いかんにかかわらず DX 型, その他のものを not typable (NT, 型別不能) と判定することとした。この方針で上記 191 株を型別すると, BK₁ 型 32 株, DX 型 16 株 (うち D34' 型 8 株), NT 143 株となつた。

5) 標準菌を用いた再現性の検討: 標準菌 H₃₇Rv, H₃₇Ra, 青山B, 黒野株と H₃₇Rv 由来の 9 種の抗結核剤に対する各単独耐性株について, 同じく BK₁, D34' および DX ファージを用いた型別を 3 回実施した。その結果は表 9 に示したように全例十分に再現性を示し, 特

Table 9. Reproducibility in Standard Strains and Resistant Mutants to Drugs

Strains	Reproducible	
	Rate	Type
H ₃₇ Rv	45/45	BK ₁
H ₃₇ Ra	45/45	BK ₁
Aoyama B	45/45	BK ₁
Kurono	45/45	BK ₁
H ₃₇ RvSM ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvPAS ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvINH ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvKM ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvTH ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvCS ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvVM ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvEB ^r	3/3	BK ₁
H ₃₇ RvCPM ^r	3/3	BK ₁

に標準菌4株では、他の実験に際しての成績も加えて、45回にわたって完全に一致した結果が得られた。なお表には含まれていないが、ほとんどの菌株について、同時に重複して実施したときでも、一致した成績が得られることも確認している。またこれらの成績から抗結核剤の耐性化に伴つてのファージ感受性の変化は認められないものと推定した。

6) 経時的に分離した菌株群における型別成績：ファージ型別結果の再現性を別の面から検討するとともに、ファージ型の疫学的利用価値を確認する目的で以下の実験を行つた。重症肺結核患者40名について、月1回6カ月にわたって分離した合計240株を対象とし、BK₁, D34' および DX ファージによる型別を行つた。40例のうち38例(95.0%)では毎回のファージ型が一致し、残る2例では(6回のうち、2回および1回)ともに1RTD 使用の場合のみ溶菌を認めた。この知見は、患者の排出菌が、特に各種抗結核剤による治療にもかかわらずファージ型よりみて変化しないことを示し、古川²⁴⁾、武谷¹⁹⁾の先業に加えてファージ型の感染源追及への利用価値を強固にしたものといえる。

考 案

人型結核菌のファージ型別法を著者なりに確立し、また家族内における結核感染の究明に有用なファージを選定することが本論文の目的であつた。

ファージ型別の方法について、徳永らは、RTD法を利用することを提唱¹¹⁾し、これは多くの研究者により賛同¹²⁾を得ている。すなわち徳永は、被検菌を均等に培地面に接種した後、ファージの1RTDをスポットし、溶

菌性状により、感受性を決定するのがきわめて安定した成績が得られる方法であるとした。

そこでまず従来用いられたファージを対象にこのRTD法について検討を加え、 1.0×10^4 /mlのファージ濃度でその1滴(約0.01 ml)がきわめて安定した溶菌斑を示すことを確かめた。これを参考に、また常に同一の手技を用いて再現性のある成績を得るために、以後の実験は、すべて「実験方法ファージ型別法の項」に述べたような順序に従つて行うこととした。

同じく7種のファージを用いて、結核患者から分離された160株の型別を行つてみると、DS6A, Y10, C3, B1, GS4E, BK₁に対する感受性から耐性までの間に段階的な差が認められ、D34'はこれらとは全く異なつていた。疫学的な問題を追求する場合に、類似した作用域のファージで結核菌を細分することには大した意味を認めえないし、また類属の型をも他種のものとして取扱う危険性があるので、BK₁とD34'の両ファージにより型別を行うこととした。

ここでD34'ファージについて付言すると、著者が用いたD34はFromanの原著¹⁷⁾では溶菌されているのに、H₃₇RvおよびH₃₇Raに作用せず、この所見は表9に示した45回の反復成績によつても確認された。そこで著者はこれをD34'と記載して使用した。この性状の違いは、Fromanの原著には、D34を分離する過程で数種の抗酸菌で増強したと記載されていることから、現存するD34はF130を増殖用菌株としてきたことに伴う宿主依存性変異株である可能性もあるものと考えられる。

ファージ型別の判定に際して、1RTDのみで菌株の感受性を調べてみると、感受性とか耐性の境界上にあるものではその成績の再現性が低いことが判明し、これはまたBK₁に対する表4の成績からも否定できなかつた。そこで緒言でふれた徳永らの判定基準をも参考にして、1/10 RTDを同時にスポットして、1/10 RTDでも溶菌する菌株をhighly susceptible, 1RTDで溶菌しないものをless susceptibleとし、1RTDのみで溶菌するものをintermediateとした。したがつて上記のように2種のファージを用いた場合の判定は、BK₁ファージにhighly susceptibleのものをBK₁型、D34'にhighly susceptibleのものをD34'型と型別することとなる。

表3の成績によると、このD34'型は非常に少なく、160株中1株にすぎなかつたので、D34'ファージがH₃₇Rv株を溶菌しないという特性を失わず、作用域がD34'より広い変異ファージを得ることに努めた。宿主依存性の変異ファージは、ただ単に感受性域が広がるばかりでH₃₇Rvをも溶菌してしまい、特異なファージとはいへなかつたし、紫外線照射によつても変異ファージは分離できなかつた。偶然にもリニアック照射によつ

てこの目的に近い1つのファージが得られたので、著者はこれをかりにDXファージと命名した。

そこですでに実用化していたBK₁とD34'に加えて、上記DXも用いての型別を、再現性をも含めて実施した。この結果からみると、D34'に感受性の株はすべてDXの作用も受け、BK₁とDXファージの使用で十分型別できると考えられた。

ただこの型別は全く著者独自の型別法であるが、分離株に対する再現性の面でなお3~5%の範囲で不安定な面があり、また得られたファージが変異ファージであるだけに、今後その性状をチェックしてゆく必要があると考えている。また著者の目的とする疫学的研究の追求に対する本法の価値に関しては次編で考察を加えることとする。

結 論

既存の抗酸菌ファージを用いて、人型結核菌のファージ型別に対する基礎的検討を行い、下記の見所を得た。

- 1) 予研由来7ファージのうち最も特異的な作用域を示したのはD34'である。
- 2) D34'を除く6ファージは互いに作用域の重複を認め、これらのうちではBK₁が最も狭い作用域を示した。
- 3) 紫外線処理したD34'のうち1株にさらにX線照射を行つて、原ファージよりやや広域に作用するファージ1株を検出し、DXファージと仮称した。
- 4) 上記8種のファージの1RTDはいずれも100粒子/0.01 ml (1.0×10⁴/ml)であつた。
- 5) ファージBK₁, D34', DXによる分離株および標準株の型別を、その再現性を重視しつつ実施し、満足しうる結果を得た。
- 6) 一部に定量性を加味したファージ型別法として1および1/10 RTDを併用することにより、被検菌株を“highly susceptible”, “less susceptible”, “intermediate”と区別して整理することを提示した。

稿を終るに当たりご指導いただいた饒島四郎教授および原耕平助教授に感謝するとともに、本実験にご助言いただいた国立予研結核部の室橋豊穂部長、徳永徹博士、九州大学細菌学教室武谷健二教授、本学熱研臨床部内藤達郎教授に深甚の謝意を表す。また、本研究に終始ご援助いただいた国立長崎療養所楠木繁男所長にも感謝の

意を表す。

本論文の要旨は第46回および47回日本結核病学会“The Fifth International Symposium on Phage Typing of the Mycobacteria”に報告した。

文 献

- 1) Froman, S., Will, D. W., Bogen, E.: Am. J. Pub. Health, 44: 1326, 1954.
- 2) Takeya, K., Yoshimura, T.: J. Bact., 74: 540, 1957.
- 3) 武谷健二・吉村哲也・森良一・中島教隆・小池聖淳・宮内恭一: 日新医学, 45: 251, 1958.
- 4) Takeya, K., Yoshimura, T., Yamamura, K. and Toda, T.: Amer. Rev. Resp. Dis. 80: 543, 1959.
- 5) 武谷健二: 日結, 18: 147, 1959.
- 6) 室橋豊穂他: 医学と生物学, 53: 242, 1959.
- 7) 水口康雄・徳永徹・室橋豊穂: 結核, 40: 25, 1965.
- 8) 高橋友夫: 横浜医学, 17: 258, 1966.
- 9) 須子田キヨ: 医学と生物学, 74: 187, 1967.
- 10) 徳永徹・丸山米夫・室橋豊穂: 結核, 37: 672, 1962.
- 11) Tokunaga, T., Seki, M., Murohashi, T.: Med. Biol., 57: 114, 1960.
- 12) Redmond, W. B., Cater, J. C. and Ward, D. M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 87: 257, 1963.
- 13) 武谷健二: 福岡医学雑誌, 54: 1061, 1963.
- 14) Baess, I.: Acta Path. Microbiol. Scand., 76: 464, 1969.
- 15) Bates, J. H. and Mitchson, D. A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100: 189, 1969.
- 16) Tokunaga, T. and Maluyama, Y.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97: 469, 1968.
- 17) Froman, S., Will, D. W.: Dis. Chest, 28: 377, 1955.
- 18) Baess, I.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93: 622, 1966.
- 19) Murohashi, T., Tokunaga, T., Mizuguchi, Y.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88: 664, 1963.
- 20) Redmond, W. B.: Advan. Tuberc. Res., 12: 191, 1963.
- 21) 浜田良英: 医学研究, 32: 166, 1962.
- 22) Segawa, J., Takeya, K.: Amer. Rev. Resp. Dis., 81: 419, 1960.
- 23) 室橋豊穂・徳永徹・水口康雄: 結核, 38: 187, 1963.
- 24) 古川和宏: 医学研究, 29: 2903, 1959.