

原 著

患者から分離したヒト型結核菌の PH フェージ感受性について

須子田キヨ・長田 富香

東京女子医科大学微生物学教室

受付 昭和 50 年 9 月 23 日

A STUDY OF THE PH PHAGE SUSCEPTIBILITY TO *M. TUBERCULOSIS*
ISOLATED FROM TUBERCULOSIS PATIENTS

Kiyō SUSHIDA* and Fuka OSADA

(Received for publication September 23, 1975)

The PH phage specifically lyses *M. tuberculosis*, which had been maintained as the standard strain in our laboratory. Lytic activity of this phage against *M. tuberculosis* isolated from tuberculous patients was, however, somewhat different from that of our standard strain, namely, the phage susceptibility of patient's strains was lower than that of the standard strain. Strains of *M. tuberculosis* isolated from patients were slow growing rough colonies, cord forming acid-fast bacilli, absence of pigment formation, niacin biosynthetic and susceptible to INH, PAS and SM. Of the total 200 strains isolated from 106 patients, 25 strains (12.5%) obtained from 11 patients, of whom 8 had no clinical signs or previous history of tuberculosis, were susceptible to the PH phage when tested by means of spotting method. These phage susceptible mycobacteria were all sensitive to anti-tuberculous drugs; INH, PAS, SM and others. After the bacteriological confirmation of diagnosis, patients were treated usually by the triple combination of INH, PAS and SM, and in some cases by rifampicin, ethambutol or kanamycin. Acid-fast bacilli converted to negative soon after the introduction of treatment. The phage susceptibility of strains isolated from the same patient at different times was always similar. In contrast, the drug resistant bacilli isolated from 11 patients with a long term history of pulmonary tuberculosis were all resistant to the phage. It has been said that no relationship exists between phage susceptibility and the drug resistance, however, the results of our present investigation suggest that there may be some relationship between drug resistance and the PH phage susceptibility.

著者らは1967年にヒト型結核菌(H₃₇Rv)を宿主菌として、ヒト型結核菌に特異的に強い感受性を示すPHフェージを分離したが、このPHフェージは分離当初にテストした長期試験管内継代培養された結核菌5株のすべてを溶菌したが、患者から分離し、十数代継代したヒト型結核菌19株に対しては26%が感受性を示し¹⁾、更にその後、本院の新鮮分離株33株について行った実験で

は12%が感受性を示したに過ぎなかつた²⁾。一般に新鮮分離結核菌は、試験管内継代培養菌株に比べてこのフェージに対する感受性が低いのではないかと考えられた。

本文はPHフェージの新鮮分離結核菌に対する感受性を確認するために被検株200株を用いて感性試験を行い、PHフェージ感受性菌を排除した患者の病歴を調査して、フェージ感受性と患者病歴との関係を考察した。

* From the Department of Microbiology, Tokyo Women's Med. Coll., Ichigayakawada-cho, Tokyo 162 Japan.

研究 方法

東京女子医科大学, 附属病院中央検査科, 細菌部において分離された結核菌 (T. W. H. 株) 200 株, および対象として慈生会病院検査室から分与された結核菌 (J. H. 株) 11 株, 合計 211 株が用いられた。これらの新鮮分離菌株を 1% 小川培地に 2~3 代継代し, 37°C, 2 週間培養で発育の良好の菌株を用いた。ガラス玉入りコルベンにて菌浮遊液を作り, 10 mg/0.2 ml を 1% 小川平板培地に流し, 37°C で培養し, 3 日目に 1/5 針付注射器でスポット法によつて PH ファージ液 (10⁶) を滴下した。セロテープにて封じたあと, 更に培養を続け, 初めより 2 週間目に完全溶菌斑の認められたものを受感性とした。平板は各菌株ごとに 2 枚ずつを用いた。感受性のある患者株はすべて完全溶菌斑を示し, 不完全溶菌斑や二次集落の認められるものはなかった。

病 態 調 査

PH ファージ感受性菌を排菌した患者について, 検査材料, 抗結核剤耐性検査成績, 治療剤の種類, 投薬後の排菌状態, および同一患者から排出された結核菌のファージ感受性の変動の有無について調査すると共に, 患者の訪れた科別, 主訴, 結核症の既往歴も参考とした。

成 績

表 1 に示すように, T. W. H. 株 200 株のうち 25 株 (12.5%) が PH ファージ感受性であつた。J. H. 株 11 株では感性を示すものはなかった。T. W. H. 株の PH ファージ感受性 25 株を検出した患者は 11 名で, 全被検患者 106 名に対し 10.3% の陽性率であつた。この 11 名の患者の病歴の一部を表 2 に要約した。年齢は 23 歳から 70 歳で, 既往歴に結核症の明らかなものは 2 名, No. 1 と

No. 2, 残りはその主訴, および科別にみると, 診断中, あるいは治療中の検査結果から結核菌が証明され, 結核症の合併を発見された。すなわち No. 1 の患者は発熱が主訴であるが, 既往歴で, 充填術や, 胸膈形成術をうけているので, 自ら結核症の再発ではないかと外科外来を訪れた。3 者併用療法をうけたこともあつたが, 治癒して投薬を中止していた。また No. 2 は慢性の膵臓炎があり, 今回も腹部異常を訴えたものであるが, 胸膈形成術をうけていた。No. 11 は腎摘出手術をうけている恐らく結核性のもと考えられる。その他の患者は, 風邪, 不眠, 糖尿病, 胸部腫瘍, リンパ節腫脹, 股関節腫脹等が主訴であつて, 過去に抗結核剤の投与をうけたものは No. 1 の他にはなかった。

PH ファージ感受性菌の臨床検査成績は表 3 に示すごとく, 検査材料は喀痰が多く, 次いで膿汁, 尿であつた。いずれも直接塗抹陰性, 1% 小川培地培養 2~6 週後に淡黄白色, R 型集落の発育を認め, 集落数は No. 2 以外は 0.1 ml 当り 0.5~20 コで少数であつた。これらの分離菌は発育速度, 集落の形態, 色調, 抗煮沸試験, 普通寒天培地培養, 発育温度, 光発色試験, ナイアシテスト等によりヒト型結核菌と同定された。また一次抗

Table 1. Lytic Activity of PH Phage

	Hospitals	Susceptibility to PH phage		Total
		Positive	Negative	
Strains	T. W. H.	25 (12.5) %	175	200
	J. H.	0	11	11
Patients	T. W. H.	11 (10.3)	95	106
	J. H.	0	8	8

T. W. H. : Tokyo Women's Medical Collage Hospital
J. H. : Jiseikai Hospital

Table 2. Case History of Patients from Whom Tubercle Bacilli Were Isolated

Patient No.	Age	Complaints	Department consulted	Past tbc. history	Final diagnosis
1	45	Fever	Surgery	Plombage, thoracoplasty	Pul. tbc.
2	40	Abdominal pain & loss of weight	Gastroenterology	Pneumothorax, chr. pancreatitis	Intestinal tbc. & chr. pancreatitis
3	70	Common cold	Internal medicine	None	Pul. tbc.
4	53	Insomnia	Psychiatry	None	Pul. tbc.
5	65	Diabetes	Diabetic center	None	Pul. tbc. and diabetes
6	53	Tumor & chest pain	Plastic surgery	None	Tbc. of vertebrae
7	31	Lymphadenitis	Gastroenterology	None	Lymphadenitis tbc.
8	30	Pus of Hip-Joint	Plastic surgery	None	Tbc. artheritis
9	32	Loss of weight	Internal medicine	None	Pul. tbc. pleurisy
10	23	Diarrhoe	Internal medicine	None	Pul. tbc. pleurisy
11	37	Pollakisuria	Urology	Nephrectomy	Tbc. nephritis, cystitis

Table 3. Examination of the PH Phage Susceptible *M. tuberculosis*

Strain(Patient) No.	Specimens	Staining of smear	No of colonies per 0.1 ml	Colony type	Niacin test	Resistance to			
						INH 0.1	PAS 1.0	SM 10	KM 10mcg/ml
1	Sputum	Negative	8	Rough	Positive	-	-	-	-
2	"	"	+	"	"	-	-	-	-
3	"	"	6	"	"	-	-	-	-
4	"	"	7	"	"	-	-	-	-
5	"	"	20	"	"	-	-	-	-
6	Pus	"	0.5	"	"	-	-	-	-
7	"	"	5	"	"	-	-	-	-
8	"	"	5	"	"	-	-	-	-
9	Sputum	"	0.5	"	"	-	-	-	-
10	"	"	5	"	"	-	-	-	-
11	Urine	"	8	"	"	-	-	-	-

Table 4. PH Phage Susceptibility Compared with Drug Resistance to *M. tuberculosis* Isolated from Patients

PH phage	No. of strains	Resistant to							
		INH (mcg/ml)			SM(mcg/ml)			PAS(mcg/ml)	
		0	0.1	1 5	0	1 10	0	10 100	
Susceptible	11	11	0	0 0	11	0	0	11	0 0
Resistant	95	82	7	3 3	86	7	2	84	5 6
Total	106	93	13		97	9		95	11

Table 5. Antituberculous Drugs and Response to Treatment

Patient No.	Used drugs	Acid-fast bacilli after treatment							
		1	2	3	4	5	624	(Month)
1	INH, PAS, SM	+	-	-	-	-	-	-	-
2	None	-	-	-	-	-	-	-	-
3	INH, PAS, SM	-	-	-	-	-	-	-	-
4	INH, RFP, EB	+	+	-	-	-	-	-	-
5	INH, PAS	-	-	-	-	-	-	-	-
6	INH, PAS, SM	-	-	-	-	-	-	-	-
7	INH, PAS, SM→KM	-	-	-	-	-	-	-	-
8	INH, PAS, SM	-	-	-	-	-	-	-	-
9	INH, PAS, SM	+	+	+	-	-	-	-	-
10	None	-	-	-	-	-	-	-	-
11	INH→RFP	+	-	-	-	-	-	-	-

結核剤に対する耐性検査成績においては、INH 0.1 mcg/ml, PAS 1 mcg/ml, SM 10 mcg/ml に耐性を示すものを認めなかった。

PH フェージに耐性を示した95株(95名)中、薬剤感受性のは79株であつて、一次抗結核剤のいずれかに耐性を示したものは16件であつた。その内訳は表4のごとく、INH 耐性13株、SM 耐性9株、PAS 耐性

11株であり、INH, PAS, SM の3者に耐性を示すものは16件中5件であつた。

これら患者の大部分は表5に示すように、治療としてINH, SM, PAS の3者併用療法を受けたものが多く、RFP, EBを投与されたものもあつた。No.2とNo.10の患者は治療開始前に他に転院した。

治療開始後の排菌状態は、投薬1カ月目の検査で陰性

化したものは9名中5名で、2名は2カ月目の検査で排菌陰性、1名は3カ月目、残る1名は4カ月目の検査で陰性となり、以降2カ年間の培養成績はすべて陰性であった。

同一患者から時期を異にし、あるいは検査材料を異にして得られた結核菌について、PH フェージ感受性に相違があるかどうかについてしらべた。対照としてPH フェージ耐性菌を検出した患者についてもしらべた。PH フェージ感受性群では5名の患者から時期を異にし(2~4カ月の間)、あるいは材料を異にして得られた18株はすべて完全溶菌を示した。すなわち No.1 患者からは5株が得られ、No.4 患者からは4株が、No.3 患者からは2株が、いずれも喀痰から検出された。No.9 からは喀痰と滲出液から3株が、No.10 患者では糞便、滲出液から4株が得られた。対照としてPH フェージ耐性株の中から選ばれた18株は、5名の患者からのもので、それぞれ2~5株が分離されたものであるが、PH フェージに感受性を示すものは認められなかった。

J. H. 株 11株は、8名の患者から分離されたものですべてPH フェージ耐性であった。10株(7名)はINH, PAS, SM に高度耐性を示すばかりでなく、KM, TH, CS, EB にも耐性を示すものがあつた。1株(1名)はTH, CS, RFP のみに耐性を示した。いずれも長期入院患者であつた。

考 察

PH フェージは1973年、W. H. O. 主催の *M. tuberculosis* のフェージタイプングのサブタイプ用として登用され⁸⁾、*M. tuberculosis* の国際分類協同研究によつてMTPH 9として報告された⁹⁾。この研究報告によるとPH フェージはA型菌には感受性を示さないことがわかつた。

上記PH フェージ感受性実験に用いた患者株は検査室で結核菌と同定された分離後間もない菌株で、本院における新鮮分離株では先の少数例における成績とほぼ同様に12.5%の感受性率を示した。国際分類協同研究の場合には比較的長期間継代培養した菌株が用いられたという。しかし分離株を継代培養することによつて感受性が変つたという報告はない。

著者らが分離したPH フェージ感受性株はすべて薬剤感受性であつたが、多数の薬剤感受性菌がPH フェージに感受性を示さなかつた。他方本院患者の薬剤耐性株16株と、J. H. 株の11株からはPH フェージ感受性のものが得られなかつた。したがつて抗酸菌フェージ感受性と薬剤耐性との関係は上記研究結果からは明らかにすることはできなかつた。またフェージ感受性と薬剤耐性との相関性について患者分離株について検討されたこれまでの報告では関係がないと明らかに記されている^{5)~7)}。一

方エスキモー患者から分離された結核菌についてフェージ感受性をしらべた成績によると、サブタイプングとして用いたPH フェージに感受性のある集落はすべてEB (8 mcg/ml) に感受性であり、SM (5 mcg/ml)、INH (1 mcg/ml) に耐性を示すものがわずかにあることが表中に示されており⁸⁾、PH フェージ感受性に関しては、あるいは薬剤耐性と何らかの関連性を見出しうるかも知れないと考えられた。

今回はこのPH フェージ感受性菌を排菌した患者の病歴を詳細に調査する機会が与えられた。その結果を整理すると、患者のほとんどは外来患者で、短期入院の者もあつたが、治療によつて速やかに排菌陰性化したことが明らかとなつた。このことはPH フェージ感受性菌を排出した患者の病因菌が薬剤感受性であつたことを裏付けるものである。しかしPH フェージ耐性菌を排菌した多数の患者については精細に病歴を調査することはできなかった。また少数例ではあつたが、長期療養患者から分離された高度多剤耐性菌はPH フェージに感受性を示さなかつたので、多剤耐性菌ではフェージ感受性に変化を生ずることがあるかどうか興味あることと考えられた。PH フェージ感受性株を試験管内で3者耐性菌(SM, INH, PAS)とし、PH フェージ感受性の変動について実験を行つた。その結果、溶原化したものか、レセプターに変化が生じたものか不明であるが、PH フェージに不感受性を示した1株を得た²⁾⁹⁾。この実験結果が偶然に得られたものか、一般的な現象と認めてよいものか不明であるので新しく3者耐性株を得、また単剤耐性ではどうか、更に薬剤による差異があるか等について実験を行つており、その詳細については別に報告する予定である。

結 論

患者から分離されたヒト型結核菌200株(T. W. M. H. 株)のうちPH フェージ感受性株は25株、12.5%であつた。これら陽性株を排菌した患者の病歴を調査した結果、大部分の患者は結核症の既往歴がなく、また薬剤投与によつて速やかに排菌陰性となつた。同一患者から材料を異にし、また時期を異にして分離された菌株は、PH フェージ感受性のものも、耐性のものもその感性に変動はみられなかつた。

結核菌を分与いただいた慈生会病院、および病歴調査の便宜をおかりいただいた本院、内科、外科、消化器病センター、神経科、糖尿病センター、整形外科、泌尿科に心から感謝致します。

文 献

- 1) Sushida, K. and Hirano, N.: Am. Rev. Resp.

- Dis., 106 : 269, 1972.
- 2) 須子田キヨ・長田富香: 結核, 48 : No. 2, 50, 1973.
 - 3) Murohashi, T. and Mizuguchi, Y.: Lytic patterns of tubercle bacilli isolated in Netherland and in Japan, 5th International Symposium on phage typing of the Mycobacteria, Montreal, 1972.
 - 4) Rado, A.T., Bates, J.H., Engel, H.W.B., Mankiewicz, E. and Sula, L.: Am. Rev. Resp. Dis., 111 : 459, 1975.
 - 5) Mankiewicz, E.: Can. J. Public Health, 63 : 342, 1972.
 - 6) 武谷健二: 福岡医学誌, 54 : 1061, 1963.
 - 7) Bates, J.H. and Fitzhugh, J.K.: Am. Rev. Resp. Dis., 96 : 7, 1967.
 - 8) Mankiewicz, E. and Maimo, L.: Am. Rev. Resp. Dis., 111 : 307, 1975.
 - 9) Sushida, K.: Study of the PH phage activity against *M. tuberculosis* isolated from patients at the Tokyo Women's Med. Coll. Hospital; 6th International Symposium on phage typing of the Mycobacteria, Tokyo, 1973.