

## 第59回総会会長講演

## 塗抹陽性培養陰性結核菌

青柳昭雄

国立療養所東埼玉病院

受付 昭和59年7月19日

The 59th Annual Meeting President's Lecture

STUDIES ON SMEAR POSITIVE AND CULTURE  
NEGATIVE TUBERCLE BACILLI

Teruo AOYAGI\*

(Received for publication July 19, 1984)

Studies on clinical and bacteriological problems related to smear positive and culture negative tubercle bacilli (SPCN) were carried out, and the results were summarized as follows.

1) The frequency of SPCN was 8.7-25.1% for sputum and 52.0% for resected lesion in specimens of positive smear.

2) Cases with SPCN were clinically grouped into five patterns, (1) cases found prior to conversion to negative on both smear and culture, (2) cases found three months or later after the complete negative conversion, without following culture positive results, (3) same to (2) but with following culture positive results, (4) chronic tuberculous cases with tubercle bacilli resistant to multiple antituberculous drugs, (5) cases found only at the beginning of treatment. The frequency of each group was 57.6% for the 1st pattern, 12.1% for the 2nd, 4.0% for the third, 12.1% for the 4th and 14.2% for the 5th, respectively. Among cases (2) and (3), cases who showed positive culture one month later after the appearance of SPCN (the 3rd pattern) occupied 60% in retreatment cases and 9.1% in initial treatment cases.

3) 3.04% of specimens which was determined as SPCN became positive on culture by extending the inoculation period up to 24 weeks and 10.5% of specimens which were negative culture by Ogawa's medium showed positive result by Löwenstein-Jensen medium.

4) Sputum taken from cases determined as SPCN by 22 weeks observation by routine technique showed positive culture by the pre-treatment with 0.5% NaOH. This isolated strain showed positive niacin test in spite of the lost virulence to guinea pigs.

5) It was noted that the frequency of SPCN was significantly higher in cases treated with regimens containing RFP than in cases treated with other regimens, and the results suggest that tubercle bacilli exposed to RFP kept their nature of acid fastness better than bacilli exposed to other drugs through bacilli were damaged in both exposures.

## はじめに

結核菌の検出方法としての培養検査は塗抹検査に比

して鋭敏であるので標本中の結核菌が少数の場合には塗抹陰性培養陽性を示すが、すぐれた抗結核薬の登場以来、塗抹陽性培養陰性結核菌 (smear positive and

\* From the National Higashisaitama Hospital, 4147, Kurohama, Hasuda-shi, Saitama 349-01 Japan.

culture negative, SPCN) がしばしばみられるようになった。

SPCN が発現する可能性は工藤<sup>1)</sup>によると、1)鏡検の誤まり、2)培養手技の不備、3)低活性菌、4)死菌であるとされている。

SPCN が低活性菌であるか死菌であるかは臨床的に大きな問題である。

そこで筆者は SPCN の頻度、臨床的なパターン、真の結核の悪化との関連などについて報告したが<sup>2)</sup>、その後標準培養法以外の方法により発育する菌株があるか、rifampicin (RFP) の登場以来その頻度は増加しているか、増加しているとすればその機序などについて検討したので、これらの成績を一括して報告する。

1. 頻度

喀痰の抗酸菌検査で塗抹陽性培養陰性の成績を示した頻度は、表1のごとく晴嵐荘病院では2.6%、東埼玉病院では0.43%である。

塗抹陽性検体のうちではそれぞれ25.1%、8.7%であった。

調査時期は両施設間に大差はないのでこの差は塗抹検査の方法が晴嵐荘では蛍光法、東埼玉では Ziehl-Neelsen 法であること、前施設では SPCN がみられた際は、頻回に検査が行なわれたことなどによると考えられる。

工藤の総説<sup>3)</sup>によれば、SPCN の頻度は塗抹陽性検体の1.1~38.9%と種々であることを示している。

切除病巣では SPCN が高率であることはよく知られているが、晴嵐荘にて昭和55年12月1日より56年11月30日までに切除された病巣では、塗抹陽性25検体中13 (52.0%) が培養陰性であった。

塗抹陽性の患者がどの程度培養陰性を示すかを結核療法研究協議会 (療研) の昭和49年に開始した短期治療の成績より検討した。

この研究は、菌陽性初回治療患者を二群に分ち、一群 (SHRE 群) は6S<sub>2</sub>HRE/6HR<sub>2</sub>E/6H の18ヵ月で治療

を中止、他の群 (SHE 群) は12S<sub>2</sub>HE で開始し、その後の治療期間、化療方式は任意とするものである。RFP を含む SHRE 群では96例中22例 (22.9%) が SPCN を排出し、SHE 群では84例中9例 (10.7%) であり、RFP を含む群では SPCN を排出する症例は有意に高率であった。

また、SPCN を示した治療開始後の時期をみると、SHRE 群では1ヵ月50%、2ヵ月27.3%、3ヵ月以上22.7%であり、SHE 群では1ヵ月88.9%、3ヵ月以上11.1%で治療開始1ヵ月後が最も高率であった。

菌が完全に陰性化する前段階で SPCN を示した症例で2ヵ月以上にわたり SPCN を排出した症例は、療研の成績では31例中10例 (32.3%)、晴嵐荘では87例中38例 (43.7%) で、いずれも胸部 X 線病型高度進展例に高率である傾向が認められた。

2. SPCN のパターン

晴嵐荘において SPCN を示した99例について化学療法開始よりの発現時期、その後培養陽性を伴うか否かなどを背景因子別に検討して図1のごとく、概ね5つの型に分類された。

即ち、①塗抹、培養ともに完全に陰性化する際に塗抹陰性化が培養陰性化より遅れる、②塗抹、培養ともに完全に陰性化後ある期間を経て SPCN が出現するが、その後培養陽性を伴わない、③②と同じく塗抹、培養とも完全に菌陰性化した後 SPCN が出現し、これを契機に培養陽性となる、④多剤耐性持続排菌例で時に SPCN を示す、⑤治療開始時のみ塗抹のみ陽性を示す、の5つのパターンであり、表2のごとく初回治療74例、再治療25例である。

パターン別の頻度は、塗抹陰性化が培養陰性化に遅れる①が57.6%と圧倒的に多く、これら症例は初回、再治療例とも SPCN を示さなかった症例と同じく経過は良好である。塗抹培養とも完全に陰性化してある時期 (概ね3ヵ月以上) を経て SPCN を示した症例は、②および③で16例 (16.1%) みられ、その後培養陽性

表1 喀痰検査成績

施設	調査時期	塗抹 (+)		塗抹 (-)		計
		培養 (-)	培養 (+)	培養 (+)	培養 (-)	
晴嵐荘	53. 1. 1	329 (2.6)	981 (7.7)	669 (5.3)	10688 (84.4)	12667 (100)
	54. 8. 31					
東埼玉	56. 1. 1	63 (0.43)	664 (4.5)	742 (5.1)	13285 (90.0)	14754 (100)
	57. 10					

SPCN 晴嵐荘 329/1310=25.1%  
東埼玉 63/727 = 8.7%

を示した。③は初回治療で11例中1例，再治療では5例中3例で，再治療例では菌陰性化後塗抹のみの再排菌をみた場合，その後培養陽性を示す症例が高率である。即ち，菌が完全に陰性化後SPCNをみた場合，再治療例では結核の真の悪化に直結することが多いといえる。

④は多剤耐性の慢性排菌者で，このパターンにおけるSPCNの原因は明らかではないが，低活性菌であること，薬剤を中止せずに培養検査が行なわれたことなどが考えられる。

治療開始時のみ塗抹のみ陽性を示した⑤は，14例(14.2%)である。このうちその後非結核であることが判明したものが4例みられた。

表2 SPCNのパターン，初・再治療別症例数

型	初 回	再	計
1	48 ( 64.9)	9 ( 36.0)	57 ( 57.6)
2	10 ( 13.5)	2 ( 8.0)	12 ( 12.1)
3	1 ( 1.3)	3 ( 12.0)	4 ( 4.0)
4	4 ( 5.4)	8 ( 32.0)	12 ( 12.1)
5	11 ( 14.9)	3 ( 12.0)	14 ( 14.2)
計	74 (100.0)	25 (100.0)	99 (100.0)

1. S, Kとも完全に陰性化する時期に引き続き。
2. S, Kとも完全に陰性化してある時期を経て出現，その後培養陰性
3. S, Kとも完全に陰性化してある時期を経て出現，その後培養陽性
4. 慢性持続排菌者で時にSPCN
5. 治療開始時のみ

(昭53. 1. 1～54. 4. 30 国療晴嵐荘病)

しかしながら，これらの例はいずれもガフキー1号，1回のみ排菌で，結核症で⑤の型を示した10例ではガフキー1号，1回のみ排菌は1例のみであった。結核症が激減した国では抗酸菌検査の技術が低下して非抗酸菌を抗酸菌と誤認することが多くなっているといわれている<sup>4)</sup>。ガフキー1号，1回のみ塗抹陽性成績は臨床的に充分に考慮することが必要である。

SPCNの際の菌量はガフキー1～2号の少量が多いといわれているが，以上の各型別のガフキー号数は①3.84②2.17③2.5④5.1⑤2.65で平均3.57号であり，必ずしも少量排菌のみでないことが認められた。

3. 標準培養法以外の培養成績

1) 長期培養成績：晴嵐荘において昭和55年1月1日より56年11月30日までに8週観察時塗抹陽性培養陰性を示した624検体を24週まで観察し，19株(3.04%)が9週以後に集落を生じた。表3のごとく喀痰よりの19菌株中15菌株(78.9%)はガフキー5号以上で，また菌がはじめて陽性を示す週は12週が42.1%と最も多く，いずれも16週までに陽性を示した。

しかしながら，切除病巣では22週目に初めて+<sub>8</sub>を示した菌株がみられた。

これら遅発育菌を排出した症例は14例で，遅発育菌が発現した時期別にそのパターンをみると，初回治療では7例中全例が塗抹，培養とも菌が陰性化する前段階であり，再治療では7例中5例は慢性持続排菌例であった。

2) Löwenstein-Jensen(L-J)培地を使用した成績：既往にSPCNを排出した症例よりの喀痰16と切除病巣の4検体を1%小川培地とL-J培地に同時に接種した。L-J培地の喀痰の前処理は原法と異なり，等量の2%NaOHにて処理した後，硫酸で中和して接種した。

表4のごとく一般に小川培地により早期に発育したが，小川培地で陽性を示さずL-J培地に9週で発育した検体が2つみられた。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12ヵ月	.....
1) 塗抹	7	5	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	→
培養	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→
2) 塗抹	7	5	3	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-
培養	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3) 塗抹	7	5	3	-	-	-	-	2	3	5	3	2	-
培養	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
治療法変更													
4) 塗抹	2	5	7	4	5	-	2	3	6	3	7	3	3
培養	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
5) 塗抹	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→
培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→

図1 塗抹陽性，培養陰性の型

表3 遅発育菌の菌陽性時期

発育時期週 ガフキー 号数	10週	11週	12週	14週	16週	計
2~4	1	1	1	1	0	4 (21.1)
5~	2	2	7	2	2	15 (78.9)
計	3 (15.8)	3 (15.8)	8 (42.1)	3 (15.8)	2 (10.5)	19 (100)

55.1.1~56.11.30

切除病巣 Gaffky 2号, 22週目+

表4 小川培地と Löwenstein-Jensen 培地の比較成績 (2% NaOH 前処理)

小川培地 L-J培地	(-)	3~4週 (+)	5~8週 (+)	9週~ (+)	計
(-)	10				10
3~4週 (+)		4			4
5~8週 (+)		3			3
9週~ (+)	2		1		3
計	12	7	1	0	20

喀痰 16, 切除肺病巣 4 検体

	昭和50年												51年												52年	
	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2						
塗抹	8	7	-	6	-	8	-	-	-	-	6	-	8	-	5	-	-	-	-	7						
培養	##	##	##	-	-	-	-	-	-	-	+4	-	-	-	##	-	-	-	##	##						
	RH →						SHR →												SHR							
	SET →						53年						54年						55年							
塗抹	7	6	-	-	3	-	→						5	→						12	1	2				
培養	##	##	+3	-	+3	-	→						→	ST	→						→	8	6			
	→						→						→						→							
	56年																									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7									
塗抹	6	3	8	8	8	8	8	6	-	3	-	-	5	→						3~7	-					
培養	+	⊕	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→						-	-					
	KHT →												KCE →													
	57年																									
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									
塗抹	6~7 →					8 3 2 4 7 6 7 6 5 5																				
培養	→					→																				
	STE					右上葉切除 右胸成																				

○ 遅発育菌

図2 入院後の治療と排菌状況

4. 長期 SPCN を排出し病巣切除を行なった症例よりの考察

1) 症例：47歳の男，職業は農業で，現病歴は昭和48年10月肺結核兼糖尿病にて某病院に入院治療し，49年7月退院したが，50年7月に喀痰中結核菌陽性のため晴嵐荘に入院した。

入院時胸部 X 線は，II<sub>2</sub>で右上野に硬化壁空洞が存した。喀痰中結核菌はガフキー8号，培養++で RFP50 μg/ml 完全耐性であった。図2のごとく治療を行ない，52年6月には INH 5 μg/ml 完全耐性，KM100 μg/ml，RFP50 μg/ml 完全耐性，PAS10 μg/ml 不完全耐性となったが，52年8月より塗抹，培養とも陰性化した。しかしながら，55年1月より再排菌し，55年5月より SPCN の排菌が22ヵ月間みられたので57年3月右上葉切除を行なった。術後膿胸を併発し，且つ SPCN の排菌が持続し，この SPCN は活性を有する菌である

ことが推測された。

2) 本症例の喀痰ならびに切除病巣よりの培養成績：本症例の術前の喀痰を0.5%NaOHで前処理したのならびに切除病巣を生食にて混濁したものを1%小川，L-J，Dubos寒天，Dubos液体培地に接種した。2%NaOHの前処理では長期培養でも発育不能であったが，本方法により表5のごとく病巣の1検体を除き，すべて1%小川培地に発育した。喀痰より分離された菌は種々培地に継代可能でナイアシンテスト陽性であった。

3) 切除病巣のモルモット接種成績：本症例の切除病巣はガフキー4～7号でその異なる3ヵ所を生食にて混濁液を作り，0.2ml ずつモルモットに接種した。接種部位は皮下または腹腔でそれぞれデカドロン0.1ml (7 mg/kg) 投与，非投与群に区分し，デカドロンは週6日皮下または腹腔に接種後6週間投与した。接種7週目に剖検して肺，肝，脾を表6のごとく4種の培

表5 分離培養成績—0.5% NaOH 前処理—(郷州株)

検体	検査日	ガフキー No.	1% 小川	L-J	Dubos 液体	Dubos 寒天
喀	2. 26	8	+ <sub>1</sub> (11) ↓ + <sub>40</sub> (22)	+ <sub>1</sub> (5)	—	—
	2. 27	7	+ <sub>1</sub> (14) ↓ # (22)	K	+ (9)	# (7)
痰	3. 2	7	+ <sub>60</sub> (6) ↓ # (7)	—	+ (3)	—
病巣	a	8	—	—	—	# (8)
	b	6	+ <sub>1</sub> (9) ↓ # (22)	+ <sub>6</sub> (15)	—	—

( )は発育週

表6 モルモット接種成績

接種法	PSL 投与	ツ反応 (6週後)	体 重		重 量		培養成績			
			前	7週後	肺	脾	小川	L-J	D寒天	D液体
皮下	+	22×22	270	510	5.15	0.56	—	—	—	—
	—	17×22 32×32	260 260	590 490	5.62 4.45	0.62 0.42	—	—	—	—
腹腔	+	7×8 28×25	260 250	530 460	5.24 4.13	0.70 0.40	—	—	—	—
	—	23×22 32×32	260 270	590 610	4.08 4.44	0.64 0.82	—	K	—	—
対照			290 260	620 535	5.56 4.06	0.76 0.68	—	—	—	—

地に接種し、30週まで観察したが、いずれの培地にも集落の発育は認められなかった。

5. 0.5%NaOH 前処理による培養成績

本症例の結核菌は前処理によって培養不能となり、SPCN を示したことは明らかである。

そこで、前処理に0.5%NaOH を使用して1%小川とL-J培地に接種する方法で喀痰の分離培養を試みた。19の喀痰のうちL-J培地に陰性、小川培地に陽性が1検体その逆も1検体みられたが、小川培地では7検体がL-J培地では4検体が汚染のため判定不能であった。

6. RFP 登場前後の SPCN の頻度

RFP の登場する以前の昭和40年と登場後の53年のSPCN の頻度を検討すると表7のごとく昭和53年のSPCN の頻度は昭和40年に比し、有意に高率である。

また、既に述べた療研の成績でもRFPを含む群(SHRE群)のSPCN の頻度はSEH群に比し、有意に高率である。

したがって、RFP を含む化学療法的方式ではSPCN の頻度は高率であると言える。

7. 抗結核薬の結核菌抗酸性に及ぼす影響

マイコバクテリアは抗酸性を示すものと非抗酸性を示すものとに分けられることは知られている<sup>5)6)</sup>。

抗結核薬が結核菌の抗酸性に及ぼす影響については明らかでないが、もしもRFPに接した結核菌は、培養不能となるほどの傷害を受けても抗酸性を保持する程度が他の抗結核薬に比して強いならば、RFPを含む化学療法ではSPCN が高率に出現することが考えられる。

そこで、人型結核菌のDubos-Albumin 液体培地22日培養液に1 μg/ml のRFP, INH を添加し経過を追ってZiehl-Neelsen 法により染色し、その抗酸性の状況を検討した。

INH を添加した際は、添加10日後に抗酸性を失い、後染色により青く染まった菌(青染菌)がかなりみられるがRFPではその数は僅少であり、14日、20日後でも同様傾向が認められた。(図3, 図4)

臨床的には薬剤の単独療法は稀で、併用療法が行な

われる。

そこで、人型結核菌 Dubos-Albumin 液体培地14日培養液にRFP 1 μg/ml, INH 1 μg/ml, SM 3 μg/ml, EB 3 μg/ml, RFP・INH いずれも1 μg/ml, RFP・INH・EB いずれも1 μg/ml, RFP・INH・SM いずれも1 μg/ml を添加して経時的にZiehl-Neelsen 法により染色し、抗酸性の状況を検討した。

INH を加えた場合は7日目に、EBを加えた際は10日目に青染菌がみられたが、RFPを含む抗結核薬を添加した際、RFPのみを添加した際には青染菌は殆んど

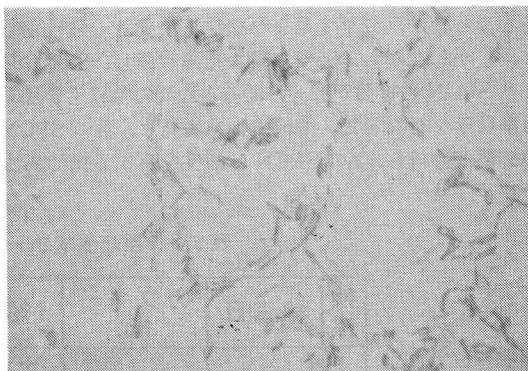


図3 INH 1μg/ml 10日

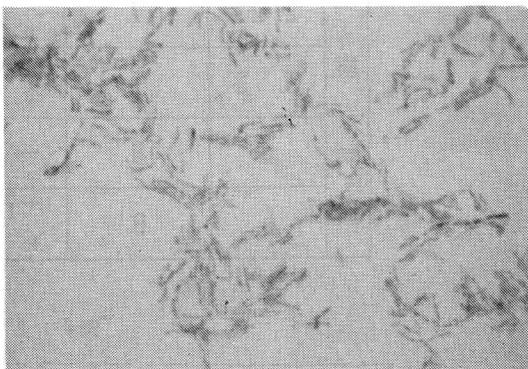


図4 RFP 1μg/ml 10日

表7 年代別塗抹陽性培養陰性の頻度

年 度	培養成績		
	—	+	計
昭和53年 (53. 1. 1~54. 8. 31)	329 (25.1)	981 (74.9)	1310 (100)
昭和40年 (40. 1. 1~40. 12. 31)	76 (6.3)	1129 (93.7)	1205 (100)

みられなかった(図5, 図6)。したがって、他の抗結核薬との併用であってもRFPと接触することによって傷害された結核菌は、抗酸性を保持することが推定された。

結核菌の抗酸性は、細胞壁と密に関連するとされているが、INHならびにRFP  $1 \mu\text{g/ml}$  添加後それぞれ20日の結核菌を電顕にて検討するとRFPを加えた際は、INHに比し細胞壁がよく保たれているごとき像が得られた。(図7, 図8)

### 終りに

塗抹陽性培養陰性結核菌に関する諸問題について臨床的、細菌学的に検討した。

1) SPCNの頻度は、喀痰では塗抹陽性検体の8.7~25.1%, 切除病巣では52.0%であった。

2) 臨床的にみられるSPCNの60%は、結核菌が完全に陰性化する前段階としてみられた。

塗抹培養とも完全に陰性化して3ヵ月以上経過して出現するSPCNは16%にみられ、再治療例ではこれを契機に培養陽性を伴うことが高率である。

3) 塗抹陽性8週培養陰性の場合、更に長期培養することにより3.04%が培養陽性を示した。1%小川培地に陰性Löwenstein培地に陽性の検体が存した。

4) 長期SPCNを排出した症例よりの喀痰を0.5% NaOHにて前処理することにより1%小川培地を含む種々培地に発育を認めた。この菌はナイアシンテスト陽性でモルモットに毒力は認められなかったが、術後膿胸を生じ排菌持続し活性を有する菌であることが推測された。

5) RFPを含む化学療法方式ではSPCNが高率であることが認められた。

Dubos-Albumin液体培地に培養結核菌にINHを添加した際には抗酸性を失った青染菌が多くみられたが、RFPを含む抗結核薬を添加した際には、青染菌は殆んどみられなかった。したがって、RFPを含む化療では菌がかなり傷害を受けても抗酸性を長く保つことが推測された。

本研究の一部は、国立療養所中央個別治療研究費により行なわれた。また、御援助を戴いた国療晴嵐荘病院柳内登、渡辺定友、田子令治、小俣庄一、国療東埼玉病院小堀与四郎、深沢行夫、慶応義塾大学医学部内科河合健の諸先生に御礼申し上げます。

### 文 献

1) 工藤祐是：喀痰における抗酸菌塗抹陽性培養陰性



図5 INH  $1 \mu\text{g/ml}$  14日



図7 RFP  $1 \mu\text{g/ml}$  20日

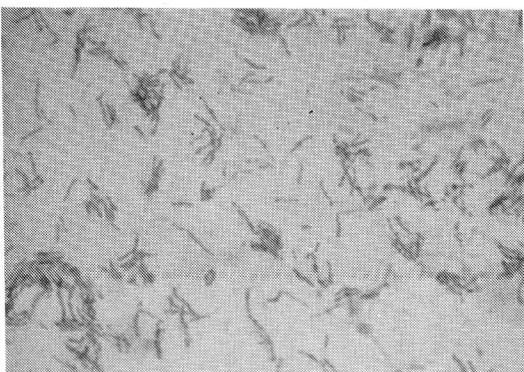


図6 SM・RFP・INH それぞれ  $1 \mu\text{g/ml}$  14日

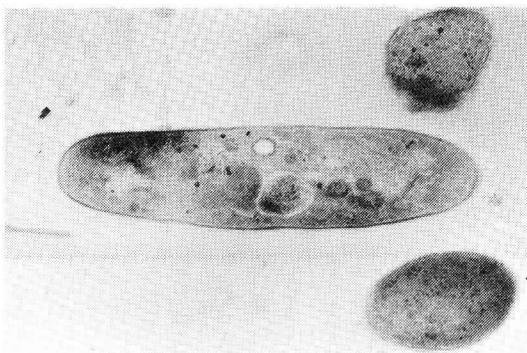


図8 INH  $1 \mu\text{g/ml}$  20日

- 抗酸菌検出における諸問題に関連して, 結核, 56 : 291, 1981.
- 2) 青柳昭雄 : 塗抹陽性培養陰性結核菌, 臨床医, 7 : 1720, 昭56.
- 3) 工藤祐是 : 塗抹陽性培養陰性結核菌, 臨床と細菌, 5 : 359, 1978.
- 4) Boyd, J.C. et al. : Decreasing reliability of acid-fast smear techniques for detection of tuberculosis, Ann Int Med, 82 : 489, 1975.
- 5) 原田澄他 : 結核病巣内の Chromophobic mycobacteria の存在について—“らい”のそれとの比較, 医療, 37 : 1090, 1983.
- 6) Nyka, W. and ÓNeill, E.F. : A new approach to the study of non-acid-fast mycobacteria, Ann N Y Acad Sci : 174 : 862, 1970.