

原 著

長期間塗抹陽性培養困難な (Smear Positive, Culture Difficult : SPCD)
症例よりの Rifampicin 依存と思われる結核菌の分離

中 村 昌 弘 ・ 原 野 由 美 子

古賀病院附属医学研究所

古 賀 俊 彦

久留米市古賀病院

受付 平成2年1月16日

ISOLATION OF A STRAIN OF *M. TUBERCULOSIS* WHICH IS CONSIDERED
TO BE RIFAMPICIN-DEPENDENT, FROM A PATIENT WITH
LONG-LASTED SMEAR POSITIVE AND CULTURE
DIFFICULT (SPCD) MYCOBACTERIA

Masahiro NAKAMURA *, Yumiko HARANO
and Toshihiko KOGA

(Received for publication January 16, 1990)

During the course of clinical examination of drug sensitivity tests for *M. tuberculosis*, a strain of *M. tuberculosis* which is considered to be rifampicin-dependent was isolated from a patient with persisting smear positive, culture negative (SPCN) or culture difficult (SPCD) mycobacteria status. The strain isolated produced a few tiny colonies on the control Ogawa-egg yolk medium, whereas it showed abundant growth like a bacteria plaque on the medium containing rifampicin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Furthermore, the growth of the strain on Ogawa medium containing rifampicin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ is much better than that on the medium containing rifampicin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Key words : Smear positive and culture negative (SPCN), Smear positive culture difficult mycobacteria, *M. tuberculosis*, Rifampicin-dependent

キーワードズ : 塗抹陽性培養陰性, 培養困難抗酸菌, 結核菌, リファンピシン依存

緒 言

塗抹陽性培養陰性 (SPCN) 結核菌についての報告は

古くから見られるが, リファンピシン (RFP) の使用が増えるにつれて, 最近また SPCN 結核菌の症例や統計が所々の療養所, 病院より報告されるようになって

* From Koga Hospital Medical Research Institute, 120 Tenjin-cho, Kurume 830 Japan.

表1 塗抹陽性、培養困難結核症より分離した結核菌の薬剤耐性試験結果および抗結核剤の投与経過

| 年月日 | 塗抹 | 培養 | 直 接 耐 性 検 査 | | | | | | | | | | 投与抗結核剤 | | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-------------|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|--------|----|----|-----|---|----|----|----|-----|---|-----------------------|
| | | | SM | PAS | INH | KM | CS | TH | EB | RFP | EVM | | | | | | | | | | | | |
| 1984.10.30 | 2号 | + | 20 | 200 | 1 | 10 | 0.1 | 1 | 5 | 25 | 100 | 20 | 40 | 25 | 50 | 2.5 | 5 | 10 | 50 | 25 | 100 | | |
| 11.14 | 5号 | (-) | 0 | 0 | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | INH1.0,RFP2P |
| 1985. 1.23 | 3号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,RFP3P,EVM1g |
| 3.12 | (-) | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | CS2P,TH3T,EB4T |
| 5.14 | (-) | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 同上 |
| 8.13 | (-) | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 同上 |
| 12.19 | (-) | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 同上 |
| 1986. 6.16 | 6号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,RFP1P |
| 7.11 | 5号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 同上 |
| 10.14 | 4号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,RFP3P,KM1g |
| 12.10 | 4号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | CSIP,EB6T,KM1g |
| 1987. 4.15 | 3号 | + | 0 | 0 | | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | EB6T,RFP1P |
| 7.15 | 4号 | + | 0 | 0 | | | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | EB6T |
| 11.10 | 6号 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | INH1.0,EVM0.5g |
| 1988. 1.11 | 7号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,RFP1P,EVM0.5g |
| 4.13 | 4号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,EVM0.5g,PSA10g |
| 6.13 | 5号 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 同上 |
| 7.19 | 6号 | + | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 同上 |
| 8.10 | (-) | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,PASI0g |
| 10.10 | 7号 | + | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | INH1.0 |
| 12.20 | 6号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,PASI0g,CSIP |
| 1989. 1.17 | 6号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,CSIP |
| 3.14 | 3号 | (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | INH1.0,EVM0.5g |
| 5. 9 | 6号 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | INH1.0 |
| 7.13 | 5号 | + | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 同上 |
| 9.11 | 6号 | + | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | INH1.0,PASI0g |

記) 薬剤の数字はμg, 0:感受性 1:低耐性 2:耐性

抗結核剤: INH: 1.0=0.5g×2/日, RFP: 1P=150mg/日, CS: 1P=250mg/日, TH: 1T=100mg/日, EB: 1T=250mg/日

た^{1)~10)}。SPCN結核菌の本態については現在、RFPによって殺菌された活性のない結核菌であろうというのが、一般の見解のようである³⁾⁶⁾。

著者らは、長期間 SPCN である結核患者の定期喀痰検査中、注意深く観察していると、時に培養陽性となり、培養8週後に10個以下の小さなコロニーを形成することがあることを経験していた。しかし、これを小川培地へ植え継いでも、培養陰性になるか、たまたま継代できてもコロニー数が少ないため、その後の生化学的追及へ進展できなかった。薬剤耐性試験については、塗抹陽性のため、直接法と間接法を試みてはいるが、辛うじて生えた菌株については、薬剤耐性試験成績はもちろん、データとして残されているものの、一般には、対照の小川培地でのコロニー形成が陰性か、極めて少ないために、ルーチン試験成績では『判定不能』としてデータは破棄されていた。今回、著者らは、薬剤耐性試験中の培養試験管を観察しているうち、以前、判定不能として破棄されていたデータの中に、小川培地での発育は極めて悪いにもかかわらず、RFP含有培地に旺盛な発育があるのを見出した。これは恐らく、RFP依存結核菌であろうと判断したので、その患者の経過を加えて、結核菌分離成績とSPCN結核菌についての考察を述べる。

結核菌の分離と薬剤耐性試験成績

1. 症例とその経過

79歳、女性、1976年より1981年の間、肺結核にて国

立療養所へ入院。1984年10月17日、38°C発熱、咳嗽、喀痰の主訴で某医院に受診、10月27日、来院。10月30日、喀痰検査でガフキー2号の抗酸菌を認む。31日、入院。36.5°C、胸部X線写真で右中葉に空洞を認める。その後、治療により喀痰に結核菌を認めなくなり、症状も改善したので1985年9月30日退院、外来治療。しかし、1986年6月16日の検査で、ガフキー6号の排菌があり、入院を勧め、7月16日、入院。

入院時、ツベルクリン反応は2.4×3.0mm。35~37°C、咳嗽、喀痰あり。ガフキー5号の排菌を認めた。入院は現在におよび、その間の結核菌検査ならびに抗結核剤投与の経過は表1のとおりである。また、培養で得た抗酸菌は生化学的試験で結核菌と同定された。現在、ツベルクリン反応は3.3×4.0mm。胸部X線写真所見では右肺野の浸潤は、むしろ増悪し、CT写真で、依然、空洞が認められる。

2. 結核菌検査成績と薬剤耐性試験成績

結核菌の検査は型のごとく、塗抹と培養によった。塗抹標本に抗酸菌を認めた場合は、直接法による薬剤耐性試験を、日本結核菌用耐性小川培地を用いて行い、抗酸菌陰性の場合には、いったん、小川培地で培養の後、得られたコロニーを用いて、間接法を極東製薬結核菌感受性スペクトル検査用培地で行った。材料の前処理は2% NaOHを等量加え、37°C、30分とした。

成績は表1のとおりである。

表には直接法による耐性試験の前の入院時の成績、

表2 SPCDの喀痰培養、薬剤耐性試験：薬剤含有培地におけるコロニー発生経過

| 塗抹 | 観察(週) | 対照 | SM | | PAS | | INH | | KM | | CS | | TH | | EB | | RFP | | EVM | | |
|-------------------|-------|----|----|-----|-----|----|-----|---|----|-----|----|----|----|----|-----|---|-----|----|-----|-----|---|
| | | | 20 | 200 | 1 | 10 | 0.1 | 5 | 25 | 100 | 20 | 40 | 25 | 50 | 2.5 | 5 | 10 | 50 | 25 | 100 | |
| 4号 10/9 89 | 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — | |
| | 6 | — | — | — | + | — | + | + | — | — | — | — | — | — | + | — | + | 卅 | — | — | |
| | 8 | 13 | — | — | 卅 | — | 卅 | + | — | — | + | — | + | — | 卅 | — | + | 卅 | — | — | |
| | 9 | 20 | — | — | 卅 | + | 卅 | — | — | — | 卅 | — | + | — | 卅 | — | 卅 | 卅 | — | — | |
| 3号 11/13 89 | 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + | + | — | — |
| | 7 | 卅 | — | — | — | — | 卅 | — | — | — | — | — | 卅 | + | — | — | 卅 | 卅 | — | — | |
| | 8 | 卅 | — | — | — | — | 卅 | — | — | — | — | — | 卅 | 卅 | — | — | 卅 | 卅 | — | — | |
| | 11 | 卅 | — | — | — | — | 卅 | — | + | — | — | — | 卅 | 卅 | + | — | 卅 | 卅 | — | — | |
| 12 | 卅 | — | — | 20 | 7 | 卅 | — | 卅 | — | 10 | — | 卅 | 卅 | + | 3 | 卅 | 卅 | — | — | | |
| 3号 11/21 89 | 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + | 卅 | — | — |
| | 7 | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | + | — | — | — | — | + | 卅 | — | — | |
| | 8 | + | — | — | — | — | + | — | — | — | — | + | + | + | — | — | + | 卅 | — | — | |
| | 10 | 卅 | — | — | — | — | + | — | — | — | — | + | + | + | — | — | + | 卅 | — | — | |
| 12 | 卅 | — | — | + | — | 卅 | — | + | — | — | — | 卅 | 卅 | 卅 | — | 卅 | 卅 | — | — | | |

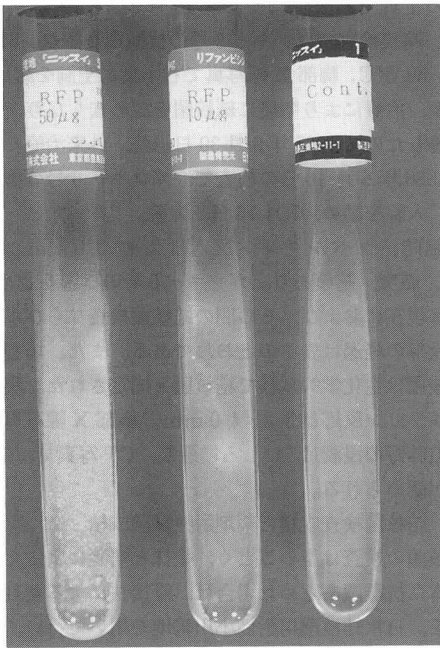


図 塗抹陽性培養困難 (SPCD) 結核菌の小川培地 (右)、RFP 10 μg 含有培地 (中央) および RFP 50 μg 含有培地 (左) における増殖所見 (37°C, 8 週間培養)

通院時、そしてその後の入院の成績を示した。結核菌検査は毎月定期的に行った。すべての成績は紙面の都合で割愛し、そのうちのいくつかを記載した。実際には、塗抹陽性、培養陰性の結果が大部分を占めた。耐性試験成績として記載しているものも、コロニーが形成されるまでに6~8週間かかり、しかもコロニー数は10~120個にとどまった。大部分が50個以下のコロニーしか得られていない。すなわち、この材料は、塗抹陽性培養陰性 (SPCN) か、培養困難 (SPCD) 結核菌である。塗抹でみえる結核菌数は常にかなり多いのが特徴である。

表2に、日時を異にして行った喀痰培養の成績、ことに、コロニー発生の状況と直接薬剤耐性試験の結果を示す。材料は、すべて塗抹陽性で、それぞれガフキー4号、3号であった。

注目すべき点は、対照の小川培地にコロニーが発生する前に、RFP含有培地に早期からコロニーが形成されたことである。しかも、RFP 50 μg 含有培地の増殖が RFP 10 μg のそれより早く、より旺盛であった。ルーチン試験にならって、8週間培養の時点でこれを見ると、この所見は極めて顕著である。すなわち、増殖のために RFP に対して dose response が明瞭である。

表3 RFP依存結核菌と思われる菌株の継代培養所見 (8週間培養)

| 初代菌株 (source) | 継代培地 | | |
|-----------------------|------|-------------|----------|
| | 小川培地 | RFP50μg含有培地 | Tween卵培地 |
| RFP50μg含有培地に形成されたコロニー | 卍* | 卍 | 卍 |
| 小川培地に形成されたコロニー | +** | + | + |

*斜面を大体覆うコロニー

**約30コのコロニー

RFPと同じ態度を示した薬剤はなかった。この菌株は、RFP依存と同時に TH, INH に耐性であり、低耐性であったのは、KM, CS, EB, PASであった。

SM と EVM には常にまったく感受性であった。

3. RFP含有培地および Tween 卵培地における SPDG 菌の発育

まず、この患者の喀痰を直接法で薬剤耐性試験を行った場合の所見を図に示す。8週間培養の対照小川培地での発育は極めて悪く、数個の小コロニーが形成されるのに反して、RFP 50 μg 含有培地での増殖は極めて旺盛で菌苔を形成するほどであった。さらに興味深いことは RFP 10 μg 含有培地での増殖が RFP 50 μg 含有培地のそれよりはるかに劣ることである。この RFP 50 μg 含有培地上の抗酸菌について生化学的試験を行ったところ、硝酸還元、ナイアシン・テストも強陽性で、紛れもなく結核菌であった。附記すべきことは、小川培地上のコロニーは培養を16週続けることによって大きさも数も幾分増加した。

次に、この菌の継代培養所見を表3に示す。RFP 50 μg 含有培地上の豊富なコロニーと小川培地上の少数のコロニーを source として白金耳で、小川培地、RFP 50 μg 含有培地、および Tween 卵培地¹¹⁾へと塗布接種、継代培養した。その結果、RFP含有培地のコロニーは供試3培地によく生えた。特に RFP 50 μg 含有培地での発育が他より増殖速度も早く増殖率もよかった。小川培地のコロニーはこれに反して、接種量が少ないせいもあるが、3培地にまったく同程度の貧弱な発育を示した。

考 察

長期間 SPCN であり、時に長期間の培養の後、極め

て少数の結核菌が培養できるような菌を排菌する患者より RFP 依存菌ではないかと思われる菌株を最近、分離した。RFP 依存と考えた理由は薬剤耐性試験の結果、小川培地での発育は極めて悪いのに反して、RFP 10 μ g 培地での増殖はやや良く、さらに、RFP 50 μ g 培地では極めて旺盛な発育をきたす菌株だからである。すなわち、増殖が RFP の濃度に依存性 (dose response) がある。そうすれば、今まで SPCN 結核菌と考えられた菌株の中には恐らく RFP 依存結核菌が存在している可能性を強く示唆するものである。

SPCN 結核菌の出現は RFP の使用の増加と深い関連があるという一般の見解は、われわれのえた所見より考察すれば、RFP によって弱活性化されたが、しかし完全には不活性化されなかった少数の耐性菌があり、培養技術の不適正のため生えてこないのではないかと考えられる。現に、SPCN 菌の一部、および培養困難 (SP culture difficult : SPCD) 結核菌は培養時間を 16 週まで続けると、時にコロニーを形成することがあり、また 8 週で数個であったコロニーが 16 週間培養でさらに、増加成長することを実際に経験しているからである。このことは、RFP による弱活性化を否定できない事実である。工藤¹⁾の示唆のごとく、SPCN の場合、16 週までの長期間の培養は必ず試むべきことである。また、今回の経験から、Tween 卵培地⁶⁾¹¹⁾の試用も価値がある。

ここで経験した患者の経過では、しかしながら、この RFP 依存と思われる結核菌の出現が RFP の使用量と期間に関連しているかどうか不明である。ただ、患者の経過を見ると、初期の結核菌は明らかに RFP に感受性があったのに、短期間の間に耐性になり、いったん耐性になると、その耐性がますます増強され、依存性へと誘導されるのではないかとこの印象を受けた。これらの菌は、RFP の作用機作を干渉する酵素を induce し、それが RFP 依存へと進展したのではないかとと思われる。

RFP 依存と思われた菌株の継代培養所見は、SPCD の中に、RFP 非依存と依存の 2 つの population があるような結果を示した。すなわち、小川培地に辛うじて生えたコロニーを継代培養すると、RFP 50 μ g 培地に特に旺盛な発育を示すことなく小川培地と同程度の発育を示した。この所見は明らかに RFP 耐性ではあるが依存性はない。一方、RFP 50 μ g 培地上のコロニーを継代培養すると、RFP 含有培地での増殖は小川培地のそれより明らかに良い。このことは依存性を示しているからである。換言すれば、小川培地に辛うじて生えた菌はただの RFP 耐性菌であり、RFP 50 μ g 培地に生えた菌には RFP 耐性菌と依存菌とが混在しているといえよう。

近い将来、この 2 つの型の population の分離と純化を達成する予定である。また、橋本¹²⁾が SM 依存菌株

をえた手法にならって、SM を RFP に代えて実験し、純粋な RFP 依存菌株を選択したいと計画している。

薬剤耐性試験の結果で興味ある所見があったのは、RFP 依存性と SM 感受性との相反した性状の対照である。RFP と SM のこの相反する薬剤に対する態度は、今後その作用機序、臨床的意義から、極めて重要な課題である。もし、SPCD 結核菌の中に、このような性状のものが多数存在するとすれば、難聴障害のない患者に SM の投与がこれを治癒へ導く可能性があるからである。

結 論

長期間塗抹陽性培養陰性 (SPCN)、時に、陽性であるが極めて発育の悪い (SPCD : smear positive culture difficult) 結核菌を排菌する結核患者の結核菌の薬剤耐性を検査中、RFP 依存ではないかと思われる 1 結核菌株を分離した。この菌株は、対照培地である小川培地での発育は極めて悪く、8 週間培養で、2~30 個の小さいコロニーしか形成せぬのに、RFP 50 μ g 含有小川培地では、菌苔を形成するほどの極めて旺盛な発育を呈した。そして、RFP 10 μ g 含有培地での発育は、RFP 50 μ g 含有培地でのそれよりはるかに劣った。

文 献

- 1) 工藤祐是：塗抹陽性培養陰性結核菌、臨床と細菌、5 : 359~62, 1978.
- 2) 酒井一郎、山本健一、有馬 純：結核患者の喀痰に見られる“塗抹陽性培養陰性菌”の生死、医学と生物学、100 : 279~83, 1980.
- 3) 工藤祐是：喀痰における抗酸菌塗抹陽性培養陰性、抗酸菌検出における諸問題に関連して、結核、56 : 291~99, 1981.
- 4) 青柳昭雄：塗抹陽性培養陰性結核菌、臨床医、7 : 1720~21, 1981.
- 5) 青柳昭雄：塗抹陽性、培養陰性結核菌、結核、59 : 191, 1984.
- 6) 東村道雄、外山春雄、塗抹陽性培養陰性結核菌の成因および臨床的意義に関する研究、結核、59 : 451~59, 1984.
- 7) 横内裕佳：長期間にわたり SPCN を呈した 2 症例について、結核 64 : 475~77, 1989.
- 8) 和田龍藏、岸本波是明、白井正浩他：塗抹陽性培養陰性抗酸菌の臨床的検討、結核、64 : 743, 1989.
- 9) 和田雅子：肺結核症の疫学的変貌と本院入院患者の 25 年間の臨床的変貌、結核、64 : 801~06, 1989.
- 10) 河合 健：肺結核症の再治療例と治療方式に関する研究成績を中心に、結核、64 : 795~98, 1989.
- 11) 東村道雄：喀痰から抗酸菌を分離するための新しい卵培地、医学と生物学、97 : 129~32, 1978.

12) 橋本達一郎 : Streptomycin 依存性結核菌の分析に基づいた結核症の感染と免疫に関する実験的研究, 第1報 Streptomycin 依存性菌の分離, 生物学的

性状および Streptomycin 投与の病原性に及ぼす影響, 結核, 30 : 4~8, 1955.