

現行耐性検査法に就いての吟味

〔第1篇〕 施設別耐性検査成績及び術式に就いての検討

京都大学結核研究所 化学療法部（主任教授 内藤益一）

大学院学生 吉原宣方

（昭和37年9月10日受付）

第1章 緒 言

近時、結核治療の発展に伴って結核の死亡率は減少し、日本の結核問題は既に解決したかの如き考えを述べる人もあるが、昭和33年の厚生省実態調査¹⁾の結果では全国の要医療患者数は決して少なくはなっていないばかりか、諸種化学療法剤に耐性を示す重症難治性肺結核患者の数は、むしろ増加の傾向を示している事が明らかとなっている。一方、化学療法の普及に伴い、耐性菌感染例が高率に発見され、しかも年々増加しつつある事が内藤²⁾を初め、中泉³⁾、堀越⁴⁾、療研の調査⁵⁾で明らかとなり、合衆国でも A.D. Chaves et al⁶⁾らの報告などがある。これらの耐性患者に対する適切な化学療法施行の基盤をなすものは薬剤の耐性検査である。

ところで耐性検査法は迅速性と正確性が要求されるが、このために現在迄に色々な方法が考案されて来た。迅速性を重じる方法としては、Felsen's plate 法⁷⁾⁸⁾、Tween-albumin 培地を利用する方法、Kirchner Agar 培地を利用する方法、酸化還元色素を用いて発色させる方法⁹⁾¹⁰⁾、遠沈管内培養法¹¹⁾¹²⁾、濾紙法¹³⁾、変法重層培地法¹⁴⁾、半流動寒天培地法¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、Slide Culture 法¹⁸⁾、Silicone Coated Slide 法¹⁹⁾があり、正確性を重じた方法としては、actual count 法²⁰⁾²¹⁾²²⁾がある。その他、培地力価の低下を防ぐために特に考慮した流し込み法²³⁾、直立拡散法²⁴⁾²⁵⁾、滲透法²⁶⁾等があるが夫々一長一短があり、現在我が国で日常最も繁用されている方法²⁷⁾は小川培地に凝固滅菌する前に薬液を所定の濃度に含ませ、85~90°C 1時間加熱滅菌して予め作っておき検査する機会のある時、之を用いて喀痰なり、患者から分離増菌して作った

菌液を一定量接種し、37°C の孵卵器に一定期間培養し判定する方法である。然し此の方法を長年実施されている方々は其の成績に相当の動揺を伴う事を痛感して居られる筈である。

著者の方では耐性菌感染症を数年に亘って研究して来たが、検査成績の正確度に就て常に一抹の不安を感じつつ現在に至って居り、一般に常用されている方法で検査された耐性検査成績が、果してどの程度まで信頼し得るものかを再検討する必要があると痛感するに至ったのである。例えば、もし仮りに耐性培地に対照と同じ程度に発育し、完全耐性を示した場合には感受性菌は全く存在しないものかどうか、或は耐性培地に全く菌が生えなかった場合でも、耐性菌が全く存在しないと云えるかどうか、又同一株であれば誰が検査しても同一の成績が得られるか、などの問題を明らかにしたいと考えたのである。

そこで現在関係諸施設で行われている耐性検査の実態を知り、臨床に真に役立つ耐性検査法は如何にあるべきかに就いての対策を樹てる為めの資料を得んとして、著者は、まず同じ組成を有する5種の耐性菌株を12の研究協力施設に送り、各施設常用の耐性検査法による耐性検査を依頼し、その成績を集計する一方、各施設の耐性検査術式をも細部に亘り調査した次第である。

第2章 研究 方 法

1. 研究材料

供試菌株A, B, C, D, Eの5株は次の様にして作成した。先ず研究室保存の H₃₇Rv 感受性株及び H₃₇RvR-SM10000γ, H₃₇RvR-PAS50γ, H₃₇RvR-INH 5γ Catalase (+) 菌をとりあげ、之等4株を Tw-

表 (1) 耐 性 検 査 供 試 株

株	構 成				予 想 耐 性 検 査 成 績									
	H ₃₇ Rv S	H ₃₇ Rv R-SM 10000γ	H ₃₇ Rv R-PAS 25~50γ	H ₃₇ Rv R-INH 5 γ	SM			PAS			I N H			対 照
					1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ	
A株	約90%	10 %	1 %	0.1%	卅	卅	卅	卅	卅	—	+	+	+	卅
B株	約90%	1 %	0.1%	10 %	卅	卅	卅	+	+	—	卅	卅	卅	卅
C株	約90%	0.1%	10 %	1 %	+	+	+	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅
D株	患 者 分 離 株				卅	卅	—	卅	卅	—	卅	卅	—	卅
E株					卅	卅	—	卅	+	—	卅	—	—	卅

D, E株はシリコンスライド法による耐性検査成績である。

een-albumin 培地に数代継代培養し、最後の培養開始後10日目にとりだして、Bausch & Lomb の Spectrocolorimeter にかけて菌濃度を測定し、表(1)に示す割合に耐性菌を混合したものがA, B, Cの3株である。D, Eの2株は長期入院患者で種々の抗結核剤にて治療したにも拘らず、喀痰中の結核菌が陰性化しなかった者から分離した菌株で、ナイアシンテストにより人型結核菌である事を確認しておいた。従って正確な菌の構成は明らかでないが、培地斜面の結核菌集落からなるべく均等に菌を採取する目的でベンジン液を培地斜面上に流し込んで菌液を作り、研究室の Silicone Coated Slide 法による耐性検査成績を掲げた。これら A, B, C, D, Eの5株から夫々最終濃度 10^{-3} mg/cc の菌液を作り、1%小川培地に0.1cc ずつ接種して、37°C, 3週間培養したものを各施設に送った。

2. 研究 方 法

上述の如き5種の耐性菌株を12の研究協力施設に同時に送り、1週間以内に各施設常用の方法による SM, PAS, INH の3剤に関する耐性検査を依頼し、施設毎の判定成績を集計し、更に判定基準の不同を避けるため、全耐性培地（但し No.12 施設は回収出来なかった）を研究室に集め同一人（著者自身）が再判定を行なう一方、各施設の検査術式を耐性培地作成条件即ち添加薬剤の種類及び添加量、培地 PH, 凝固滅菌の仕方、耐性培地作製後使用する迄の保存期間、保存方法等について調査し、菌液関係に就いては菌集落の採集方法即ち斜面の一部から、或は全面から採集したかどうか、菌塊磨砕の方法、磨砕時間、菌液作成時に生じた粗大な菌塊を処理したか、或は処理しなかったか処理したとすればその方法、菌液濃度の測定法、生菌単位を考慮したかどうか、接種菌量、判定までの培養期間等細部に亘って調査した。

尚同一人再判定の判定基準は、厚生省の衛生検査指

針に従い発育した菌集落数が2,000以上（菌集落が培地斜面の全面を覆う場合）を（卅）とし、発育菌集落数が500~2,000（培地斜面の3/4を覆う場合）を（卅），発育菌集落数が200~500（培地斜面の1/2を覆う場合）を（卅），発育菌集落数が1~200（培地斜面の1/4を覆う場合）を（+），培地斜面に結核菌集落を認めなかった場合を（—）に区分表現した。

（*各施設の判定した日から著者が行った判定の日までに約1週間経過していた）

第3章 研 究 成 績

1. 施設別耐性検査成績

施設別に行った5株の耐性検査成績は表(2), (3), (4), (5), (6)の如くで、表の左側が施設別判定の耐性検査成績であり、右側が同一人（著者自身）による再判定の成績である。

先ず、A株に就いてみると、この株の組成は前述の如く感受性菌が約90%、SM10000γ 耐性菌が10%に含まれているから、対照培地の発育菌量を（卅）とすれば SM 耐性培地では、1γ~100γ まで（卅）であり、PAS 25~50γ 耐性菌が1%であるから、PAS 耐性培地では1γ~10γ まで（卅），100γ では（—），INH 5γ 耐性 catalase 陽性菌が0.1%であるから、INH 耐性培地では0.1γ~5γ まですべて（+）の発育菌量が予想される。ところが実際に得られた成績は表(2)の如くで、例えば No. 6 の施設では対照（卅），SM 1γ, 10γ, 100γ 培地に（+），PAS 1γ（卅），10γ（—），100γ（—），INH 0.1γ, 1γ, 5γ 培地にいずれも（—）であって予想成績とは可成り異っている。同様に他の施設でも予想成績に一致しないもの

表 (2) A 株 耐 性 検 査 成 績

施 設 No	施 設 判 定										同 一 人 再 判 定									
	SM			PAS			INH			対 照	SM			PAS			INH			対 照
	1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ		1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ	
1		++	++	++	++		+	+	-	++		++	++	++	++		+	+	-	++
2	++	++		++	+		-	-	-	++	++	++		++	++		-	-	-	++
3	++	+	+	+	+	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	++
4		+	+	+	+			-	-	++		+	+	+	+			-	-	++
5		++	++	++	++		+	+	+	++		++	++	++	++		+	+	+	++
6	++	++	+	++	-	-	-	-	-	++	+	+	+	++	-	-	-	-	-	++
7	++	+	+	++	-	-	+	+	-	++	++	++	++	++	++	-	+	+	-	++
8	++	++	++	++	++	-	+	+	-	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	++
9		++	++	+	+		++	+	+	++		++	++	++	++		++	+	+	++
10	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	+	+	+	++
11	++	++		+	+		-	-	-	++	++	++		++	+		-	-	-	++
12		++		++	++			+	-	++	No. 12 施設の増地は回収することが出来なかった									

A 株 : S 約 90% R-SM 10%, R-PAS 1%, R-INH 0.1%

表 (3) B 株 耐 性 検 査 成 績

施 設 No	施 設 判 定										同 一 人 再 判 定									
	SM			PAS			INH			対 照	SM			PAS			INH			対 照
	1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ		1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ	
1		+	+	+	+		+	+	+	++		++	++	+	+		++	++	++	++
2	++	+		+	+		+	+	+	++	++	+		+	+		+	+	+	++
3	++	+	+	+	-	-	+	-	-	++	++	+	+	+	-	-	+	-	-	++
4		+	+	++	-			+	+	++		+	+	++	-			+	+	++
5		++	++	++	++		++	++	++	++		++	++	++	++		++	++	++	++
6	++	+	+	-	-	-	+	+	-	++	++	+	+	-	-	-	+	+	+	++
7	+	+	+	+	-	-	+	+	-	++	+	+	+	++	-	-	++	++	+	++
8	++	+	+	++	++	-	+	+	-	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++
9		+	-	+	-		++	+	-	++		+	+	+	+		++	+	+	++
10	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++
11	++	++		++	+		+	+	+	++	++	+		++	+		+	+	+	++
12		++		++	++			++	-	++	No. 12 施設の増地は回収することが出来なかった									

B 株 : S 約 90%, R-SM 1%, R-PAS 0.1%, R-INH 10%

が多い。

次に、各施設間の成績を比較すると A 株の耐性検査成績で、SM 10γ 増地の発育菌量は(+)が3施設、(++)が3施設、(+++)が5施設であり、PAS 10γ 増地でも(+)が3施設、(++)が4施設、(+++)が3施設で No. 6 施設の如きは(-)である。INH 1γ 増地についても(+)が6施設、(-)が5施設である。他の B, C, D, E の株に於ても表(3), (4), (5), (6)に示す如く同

様の傾向がみられる。

2. 施設別耐性検査法の調査成績

5つの供試株の12施設に於ける耐性検査成績が予想された成績よりかなり異っており、特に施設間の成績の変動が極めて大きかった。この原因を明らかにする為めに、各施設常用の耐性検査術式を厚生省の衛生検査指針のそれとを比較しながら細部に亘って調査した。

(a) 使用増地について

表(4) C株耐性検査成績

施設 No.	施設判定										同一人再判定									
	SM			PAS			INH			対 照	SM			PAS			INH			対 照
	1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ		1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ	
1		+	+	冊	冊		+	+	+	冊		冊	冊	冊	冊		+	+	+	冊
2	冊	+		冊	冊		+	+	+	冊	冊	+		冊	冊		+	+	+	冊
3	冊	-	-	+	S	-	+	-	+	冊	冊	-	-	+	S	-	+	+	+	冊
4		+	+	冊	冊			+	+	冊		+	+	冊	冊			+	+	冊
5		+	+	冊	冊		+	+	+	冊		+	+	冊	冊		+	+	+	冊
6	+	+	+	冊	冊	-	+	+	+	冊	+	+	+	冊	冊	-	+	+	+	冊
7	冊	+	+	冊	-	-	+	+	-	冊	冊	冊	冊	冊	冊	-	+	+	+	冊
8	冊	+	+	冊	冊	-	+	+	-	冊	冊	+	+	冊	冊	冊	+	+	+	冊
9		+	-	+	+		冊	+	-	冊		+	+	+	+		冊	+	+	冊
10	冊	冊	冊	冊	冊	-	冊	S	+	冊	冊	+	+	冊	冊	-	+	+	+	冊
11	+	+		+	+		+	+	-	+	+	+		冊	冊		+	+	-	冊
12		冊		冊	冊			+	-	冊	No. 12 施設の培地は回収することが出来なかった									

C株: S 約 90%, R-SM 0.1%, R-PAS 10%, R-INH 1%

表(5) D株耐性検査成績

施設 No.	施設判定										同一人再判定									
	SM			PAS			INH			対 照	SM			PAS			INH			対 照
	1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ		1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ	
1		冊	-	+	+		冊	-	-	冊		冊	-	冊	+		冊	-	-	冊
2	冊	冊		冊	冊		冊	-	-	冊	冊	冊		冊	冊		冊	-	-	冊
3	冊	冊	-	冊	-	-	冊	-	-	冊	冊	冊	-	冊	-	-	+	-	-	冊
4		冊	-	冊	-			-	-	冊		冊	-	冊	冊			+	-	冊
5		冊	-	冊	冊		冊	冊	-	冊		冊	+	冊	冊		冊	冊	-	冊
6	冊	冊	-	冊	冊	-	冊	-	-	冊	冊	冊	-	冊	冊	-	冊	-	-	冊
7	冊	+	-	冊	-	-	冊	+	-	冊	冊	冊	-	冊	冊	+	冊	冊	-	冊
8	冊	冊	-	冊	+	-	冊	-	-	冊	冊	冊	-	冊	冊	冊	冊	-	-	冊
9		冊	+	冊	冊		冊	冊	+	冊		冊	+	冊	冊		冊	冊	+	冊
10	冊	冊	+	冊	+	-	冊	+	-	冊	冊	冊	+	冊	冊	-	冊	冊	-	冊
11	冊	冊		+	-		冊	+	-	冊	冊	冊		冊	-		冊	+	-	冊
12		冊		冊	冊			冊	+	冊	No. 12 施設の培地は回収することが出来なかった									

D株: 患者分離株

(イ) 添加薬剤の種類 SM については指針は Dihydrostreptomycin (DHSM) を使用する様に規定されているが, DHSM の使用施設が9ヶ所, Combined Streptomycin (CSM) の使用施設が3ヶ所あった。PAS, INH に於ては全施設が指針通り PAS-Natrium, INH を使用してあった。

(ロ) 薬剤の添加量について, 表(7)の如く, SM については蛋白の吸着作用により力価が1/2

に低下するために2倍量を, PAS では PAS-Natrium を使用するから分子量比より1.38倍量, INH は1倍量加える様に規定されているが, SM 2倍量が10施設, 3倍量が2施設あり, PAS では1.38倍量が2施設しかなく, 1倍量のみが10施設もあった。INH は全施設が1倍量であった。

(ハ) 培地の pH について 指針では1%又は3%小川培地であるが, 1%小川培地が5施

表(6) E株耐性検査成績

施設 No.	施設判定										同一人再判定									
	SM			PAS			INH			対 照	SM			PAS			INH			対 照
	1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ		1 γ	10 γ	100 γ	1 γ	10 γ	100 γ	0.1 γ	1 γ	5 γ	
1		卅	—	+	+		卅	卅	—	卅		卅	—	+	+		卅	卅	—	卅
2	卅	卅		卅	卅		卅	卅	—	卅	卅	卅		卅	卅		卅	卅	+	卅
3	卅	卅	—	卅	+	—	卅	卅	—	卅	卅	卅	—	+	+	—	卅	+	—	卅
4		卅	—	卅	卅			卅	—	卅		卅	—	卅	卅			卅	—	卅
5		卅	—	卅	+		卅	卅	—	卅		卅	—	卅	卅		卅	卅	—	卅
6	卅	卅	—	卅	+	—	卅	卅	—	卅	卅	卅	—	+	+	+	卅	卅	—	卅
7	卅	+	—	+	—	—	卅	+	—	卅	卅	卅	—	卅	+	+	卅	卅	—	卅
8	卅	卅	—	卅	卅	—	卅	—	—	卅	卅	卅	—	卅	卅	—	卅	—	—	卅
9		卅	+	卅	卅		卅	卅	卅	卅		卅	+	卅	卅		卅	卅	卅	卅
10	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	+	+	卅
11	卅	卅		+	+		卅	卅	+	卅	卅	卅		卅	+		卅	卅	+	卅
12		卅		卅	卅			卅	卅	卅	No. 12 施設の培地は回収することが出来なかった									

E株：患者分離株

表(7) 12施設の耐性検査法調査成績(1)
使用培地

	検査指針		調査成績	施設数
添加薬剤	SM	DHSM	DHSM CSM	9 3
	PAS	PAS-Na	PAS-Na その他	12 0
	INH	INH	INH その他	12 0
薬添加量	SM	2 培量	2 3 培量 培量	10 2
	PAS	1.38 培量	1.38 培量 1 培量	2 10
	INH	1 培量	1 培量 その他	12 0
使用培地	1%又は3% 小川培地		1% 3%	5 7

設、3%小川培地が7施設あり、この中培地のpHを修正した個所は2施設しかなかった。

(二) 凝固滅菌の仕方について、指針では85～90℃1時間加熱凝固する様になっているが、指針通りに行った施設が11ヶ所、80～90℃30分間づつ3回の間歇加熱凝固滅菌した施設が1ヶ所あった。

(ホ) 耐性培地作成後の保存方法及び保存期間について、指針では5～10℃の氷室に保存し、なるべく早く少くとも1ヶ月以内に使用する様

に決められているが、調査では冷室保存が1施設、室温保存が11施設であった。

又保存期間では、10日以内が9施設、1ヶ月前後が1施設、2ヶ月以上が1施設、不明が1施設であった。

(b) 集落の採集法、菌液の作り方、濃度の判定法、接種菌量について

(イ) 集落の採集方法、斜面の全集落より出来るだけ平等に採集した所が6施設、斜面の集落の一部から採ったものが6施設であった。

(ロ) 菌液の作り方、表(8)に示す如く集落の磨砕にガラス玉コルベンを指針は規定しているが、指針通りが10施設、試験管の壁に白金耳をあててすりつぶした所が2施設あった。指針では、菌液を作る時蒸留水を用いるが、蒸留水又は生理的食塩水を用いた所が10施設、4%苛性ソーダ溶液を用いた所が2施設であった。磨砕時間は指針では3～4分間とされているが、1～2分間が6施設、残り6施設は時間を厳密には計っていなかった。

(ハ) 粗大菌塊の処理について、粗大菌塊を処理せず、そのまま用いた所が5施設、静置又は遠沈して上清を用いた所が7施設であった。

(ニ) 菌液濃度の判定法について、指針では、0.15mg/ccのBaSO₄溶液の濁度をもって、1mg

表 (8) 12施設の耐性検査法調査成績 (2) 菌接種

	検 査 指 数	調 査 成 績	施設数
菌 液 の 作 り 方	ガラス玉コルベンで集落磨砕	ガ ラ ス 玉 法 そ の 他	10 2
	蒸溜水で分散	蒸溜水又は生理的食塩水 4%苛性ソーダ	10 2
菌 液 濃 度 の 判 定 法	標 準 菌 液 (0.15mg/ccBaSO ₄) と 比 濁	標 準 菌 液 と 比 濁 BaSO ₄ 液 結 核 菌 液 チ ブ ス ワ ク チ ン	7 3 3 1
		1 白金耳 2 mg とし換算	4
		不 定	1
接 種 菌 量	0.001~0.0001mg	0.1mg 0.01mg 0.001mg 0.0001mg 0.00001mg	3 4 2 2 1 4

/cc の結核菌液の濁度と等しいと仮定して之と肉眼的に比濁して決める様になっている。表(8)に示す如く、標準液と比濁した所が7施設、1白金耳1盛りを2mgとして換算した所が4施設、不定が1施設あった。標準液は指針のいうBaSO₄溶液が3施設、結核菌液(秤量)が3施設、チフス診断液が1施設であった。

(ホ) 菌液濁度と菌の濃度について、培地成分の混入を避ける様に注意した施設が10施設、考慮をしなかった所が2施設あった。

又菌液作成中、菌が死滅してゆく事に考慮を払って、特に磨砕時間に注意した所が6施設、考慮しなかった所が6施設あった。

(ハ) 接種菌量について、表(8)に示す如く、接種菌量は指針では培地一本あたり 10^{-3} ~ 10^{-4} mgとなっているが、指針よりも多く 10^{-1} mgの所が3施設、 10^{-2} mgの所が4施設、指針通りが4施設、指針より少く 10^{-5} mgの所が1施設あった。

(C) 培養期間について

判定を行うまでの培養期間は3週間が3施設、4週間が8施設、1ヶ月が1施設であった。

(d) 各施設耐性検査法と検査指針との異同

著者が調査した各施設の耐性検査術式と厚生省の衛生検査指針とを、添加薬剤の種類、薬剤の添加量、菌液作成法、濃度の判定法、接種菌

表 (9) 各施設耐性検査法と検査指針との異同

施 設 No.	培 地		菌 接 種			検査指針 との 一致数
	1 添 加 薬 剤	2 薬 剤 添 加	3 菌 液 濃 度 作 成 法	4 濃 度 判 定 法	5 接 種 菌 量	
1	○	●	○	●	○	3/5
2	○	●	●	●	●	1/5
3	●	○	○	○	○	4/5
4	○	○	●	○	○	4/5
5	○	●	○	●	●	2/5
6	●	●	○	○	●	2/5
7	○	●	○	○	●	3/5
8	○	●	○	○	○	4/5
9	○	●	○	○	●	3/5
10	○	●	○	●	●	2/5
11	○	●	○	○	○	4/5
12	●	●	●	●	●	0/5
一致数	9	2	9	7	5	

0/5...1, 1/5...1, 2/5, 3/5...各3, 4/5...4, 5/5...0

量の5つの項目について比較すると表(9)の如くなる。表に於て、指針と一致している場合を○印で表わし、指針と異っている場合を●印で表示した。これで見ると5項目とも一致しない所が1施設、1項目のみ一致の所が1施設、2項目一致の所が3施設、3項目一致の所が3施設、4項目一致の所が4施設であり、5項目とも一致した所は1施設もなかった。

第4章 総括及び考按

著者の研究室では数年前から十数ヶ所の研究協力施設と共に未治療結核患者の耐性検査成績を集め、耐性菌感染例の調査を行なって来たが、集計に当って私共が最も懸念した事は、検査手技上の誤差であった。事実私共の調査成績で、耐性菌感染例は年々増加してゆく傾向があるが、34年度にはその増加曲線に一つの谷がみられたのである。この原因を種々分析した処、耐性検査術式が33年度に改訂された事と深い関係があるものの様に思われる。諸施設の検査成績を調査し集計する場合、それに用いられた検査法はもとより出来る限り同じ方法であらねばならないし、若し同一の組成を有する株であれば、何処で検査を行っても常に量的にも、質的にも一定の成績が得られなければならない。しかしながら、耐性検査法が生物学的な方法である限り、耐性検査成績の多少の動揺は免れ難いし、又施設が異り検査担当者が異なる限り、検査術式を完全に統一する事は甚だ困難である。

まして実際に各施設が常用している耐性検査法は一応厚生省衛生検査指針によっているものとは考えられるが、細部に至ってはかなり異っているかも知れない。そこで現行の耐性検査方法の実態を知るために、同一株を12の研究協力施設に送りその施設常用の耐性検査法による検査を依頼し、その成績を集計し、更に判定基準の不同を一定にするため著者自身が再判定を行った次第である。

その成績内容を考察してみると、

- 1, 各施設の耐性成績は予想された成績と多少とも異なるものが多い。
- 2, 施設間の成績の相違がかなり大きい。

例えば、A株の成績(表2)で PAS 10 γ 培地についてみると No.6 施設では(—)で感受性、No.10 施設では(卅)で完全耐性である。

3, 耐性菌の量的吟味

感受性菌と耐性菌の量的関係が検査成績に必ずしも反映されていない。例えば、A株の構成比率は感受性菌:SM 耐性菌: PAS 耐性菌: INH 耐性菌=100:10:1:0.1であるから、理論的

表 (10) 10%, 1%, 及び 0.1% 耐性株の耐性検査成績

判定成績	10% 耐性株				1% 耐性株				0.1% 耐性株				合計
	S	P	I	小	S	P	I	小	S	P	I	小	
	M	S	H	計	M	S	H	計	M	S	H	計	
完全耐性	2	7	0	9	1	5	1	7	3	2	0	5	21
不完全耐性	10	5	11	26	11	7	11	29	8	9	7	24	79
感受性			1	1				0	1	1	5	7	8

には耐性培地上菌発育が(卅):(卅):(卅):(+)であるべき筈である。然るに実際の成績では、表(2)の如く A 株の成績は No.1, No.5 の施設では対照培地(卅)で、SM 10 γ (卅), 100 γ (卅)で正しいが PAS 1 γ (卅), 10 γ (卅)で過大に出ている。No.10 の施設でも対照 (卅) で SM 1 γ (卅), 10 γ (卅), 100 γ (卅), PAS 1 γ (卅), 10 γ (卅), INH 0.1 γ (+), 1 γ (+), 5 γ (+) でいずれも正しくない。

(a), 耐性菌の混入率が 0.1% の場合は感性の成績を示す場合が割合多い。(表10)

成績の判定を耐性培地の発育菌量が対照培地に比し略等しい場合を完全耐性とし、明らかに少い場合(75%以下)を不完全耐性とし、全然発育しなかった場合を感受性とする組成の明らかな A, B, C の 3 株の成績を耐性菌混入率別及び SM 10 γ , PAS 1 γ , INH 1 γ の耐性培地別に集計すれば表(10)の如くなる。この表から 0.1% 耐性株では 36 例中 7 例が感受性で、感受性を示す場合が多く、特に INH 耐性菌に多い。

(b), 大多数に於ては予期された耐性成績が認められたが、一部では或は感受性に、或は強い耐性に誤まれた成績が出た。但し、そのうちでは後者の誤りの方がやや多かった。

表(10)を全体的にみると、これらの耐性菌株は混入率からすれば、量的にはすべて不完全耐性であるが、108 例中、感受性が 8 例、完全耐性が 21 例であり、換言すれば、耐性菌を見逃がすよりも、本来不完全耐性を完全耐性とする場合の方がやや多い傾向がみられた。

(c), 耐性の量的誤差の許容を、仮りに次の範囲まで拡大すれば、表(10)の成績で 8 割~9 割は満足すべき結果を示している。即ち、「1) 耐性

菌の混入率が10%の時は、完全耐性か不完全耐性かのどちらかに」の成績であれば良いとすれば合格率は97%であり、「2) 1%の時は必ず不完全耐性」でなければならない、とすれば合格率は80.5%であり、「0.1%の時は不完全耐性か感性のどちらかに」の成績であれば良いという、基準に幅をもたせれば合格率は86%となる。

耐性菌混入率	枠内の成績を示したもの	枠外の成績を示したもの	合格 率
10 %	35	1	97 %
1 %	29	7	80.5%
0.1%	31	5	86 %

然しながら、10コに1コの割合に耐性菌を含むものでも感受性菌と耐性菌を区別しなければならない(即ち、完全耐性とならず不完全耐性という成績)とすれば、合格率は72%、又1000コに1コの耐性菌をも見逃がしてはならない(即ち、感受性とならず不完全耐性という成績)とすれば、合格率は67%となり約7割である。

4. 耐性菌の質的(耐性の高さ)吟味

耐性の高さが成績に正しく現われてない。

SM 耐性菌は前述の如く、10000 γ の耐性度をもっており、PAS では50 γ の耐性度、INH では5 γ -Catalase 陽性の耐性度の高さであるから、SM 1 γ と10 γ 、PAS 1 γ と10 γ 、INH 0.1 γ と1 γ 培地には夫々の耐性菌のみが同量だけ発育し、感受性菌は生えないから発育量

は等しい筈である。然るに、表(2)で発育量の異なる施設が SM では7例中2例に、PAS では12例中2例、INH では10例中1例に認められた。

5. 培地力価について

耐性培地の発育菌量及び対照培地の発育菌量との関係から、耐性培地の薬剤力価に就いて検討した。表(11)に示した様に、SM 培地に於ては力価が高いと判定しうるものが3施設あったが、その中の2施設は事実 SM を3倍量加えていた。PAS 培地では、力価が高いものが4施設あり、その中の2施設は、PAS の添加量が1.38倍量であった。SM 及び PAS 両培地では力価が低いと判定しうる施設はなかったが、INH 培地では高いと判定し得る施設はなく、逆に低いと判定しうるものが1施設あった。この施設では、培地作製後、2ヶ月以上経ったものを使用していた事が判った。

6. 接種菌量の吟味

報告された接種菌量と実際に対照培地に発育した菌量に相違が認められ、必ずしも一定でなかった。

表(12)は、接種菌量と対照培地の発育菌量との関係を示したものである。この表から判る如く接種菌量は同じ0.1mgでも対照培地の菌発育量は(卅)9例、(卅)4例、(卅)2例。又、0.0001mgの場合でも(卅)8例、(卅)3例、(卅)1例で変動が非常に大きい。

この事は、見かけ上の菌液濁度、又は計算上

表 (11) 培 地 力 価 の 検 討

施設No.	S M		P A S		I N H	
	判 定	添 加 量	判 定	添 加 量	判 定	培地作成後の期間
1	不能		正	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
2	正	DHSM 2 倍量	正	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
3	正	CSM 2 倍量	高い	PAS-Na 1.38倍量	正	1 W 以内
4	不能		高い	PAS-Na 1.38倍量	不能	10 日 以内
5	不能		正	PAS-Na 1倍量	正	4 W
6	高い	CSM 3 倍量	高い	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
7	高い	DHSM 3 倍量	高い	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
8	正	DHSM 2 倍量	正	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
9	不能		正	PAS-Na 1倍量	低い	2 ヶ月以上
10	正	DHSM 2 倍量	正	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
11	高い	DHSM 2 倍量	正	PAS-Na 1倍量	正	1 W 以内
12	不能		不能		不能	不 明

表 (12) 報告された接種菌量と対照培地の菌発育度

報告された 接 種 菌 量	対 照 の 発 育				計
	卍	卍	卍	+	
0.1mg	9	4	2	0	15
0.01mg	12	8	0	0	20
0.001mg	3	6	1	0	10
0.0001mg	8	3	1	0	12
0.00001mg	0	0	3	0	3
計	32	21	7	0	60

の菌液濃度は、実際の生菌濃度と、必ずしも一致しない事を示す。

この関係を施設別に検討すると、表(13)の如くなり、報告された接種菌量よりも、実際の菌量が多いと考えられるもの1施設、やや多いもの1施設、等しいもの6施設、やや少ないもの2施設、少ないものが1施設であり、不規則なもの1施設があり、施設によって一定の傾向が認められた。

この傾向を菌液作成条件、即ち、菌塊磨砕法、懸濁媒、粗大菌塊の除去及び菌液濃度の判定法との関連性について、表(14)の如く検討したが、一定の関係を見出せなかった。

対照培地に発育した菌量から、各施設の実

表 (13) 施設別接種菌量と菌発育の不一致の吟味 (1)

施設No.	報告された 接 種 菌 量	予想され る菌発育	各 株 の 実 際 の 発 育 度					予想発育度 との比較	推定接種菌量
			A	B	C	D	E		
1	0.0001	卍〜卍	卍	卍	卍	卍	卍	多 し	0.1〜0.01
2	0.01	卍	卍	卍	卍	卍	卍	正	0.01〜0.001
3	0.0001〜0.00001	卍〜+	卍	卍	卍	卍	卍	正	0.0001
4	0.0001	卍〜卍	卍	卍	卍	卍	卍	やゝ多し	0.001
5	0.01	卍	卍	卍	卍	卍	卍	正	0.1〜0.01
6	0.01	卍	卍	卍	卍	卍	卍	少 い	0.001
7	0.01	卍	卍	卍	卍	卍	卍	やゝ少い	0.001
8	0.001	卍〜卍	卍	卍	卍	卍	卍	正	0.001
9	0.1	卍	卍	卍	卍	卍	卍	不 規 則	0.1〜0.0001
10	0.1	卍	卍	卍	卍	卍	卍	やゝ少い	0.001
11	0.001	卍〜卍	卍	卍	卍	卍	卍	正	0.001
12	0.1	卍	卍	卍	卍	卍	卍	正	0.1〜0.01

表 (14) 施設別接種菌量と菌発育の不一致の吟味 (2)

報告接種菌量と 対照培地の菌発 育度	菌 液 作 成 条 件					生菌数に対す る考慮
	菌 磨 砕 法	懸 濁 媒	菌液組成	菌 液 濃 度 判 定		
多 し	ガラス玉	水	全 層	白金耳採取量	(+)	
やゝ多し	白金耳	4 %NaOH	上 清	比濁(結核菌液)	(+)	
正	白金耳	水	全 層	白金耳採取量	(-)	
正	ガラス玉	水	上 清	比濁(チフス菌液)	(+)	
正	ガラス玉	水	全 層	白金耳採取量	(-)	
正	ガラス玉	水	上 清	比 濁(BaSO ₄)	(+)	
正	ガラス玉	水	上 清	比濁(結核菌液)	(+)	
正	ガラス玉	水	全 層	不 定	(-)	
やゝ少い	ガラス玉	水	上 清	比濁(結核菌液)	(+)	
やゝ少い	ガラス玉	水	上 清	比 濁(BaSO ₄)	(-)	
不規則	ガラス玉	水	全 層	白金耳採取量	(-)	
少 い	ガラス玉	4 %NaOH	上 清	比 濁	(+)	

(H)は考慮したを示し (H)は考慮せずを示す

表 (15) 0.1 %に耐性菌を含む供試株の耐性検査成績

施設 No.	接 種 菌 量		耐 性 検 査 成 績			
	報 告 菌 量	推 定 菌 量	SM(10 γ)	PAS(1 γ)	INH(1 γ)	
1	0.0001	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	性 性
2	0.01	0.01~0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
3	0.0001~0.00001	0.0001	不 完	不 完	不 完	感 性
4	0.0001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
5	0.01	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	感 性
6	0.01	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
7	0.01	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
8	0.001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
9	0.1	0.0001	不 完	不 完	不 完	感 性
10	0.1	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
11	0.001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
12	0.1	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	感 性

表 (16) 1 %に耐性菌を含む供試株の耐性検査成績

施設 No.	接 種 菌 量		耐 性 検 査 成 績			
	報 告 菌 量	推 定 菌 量	SM(10 γ)	PAS(1 γ)	INH(1 γ)	
1	0.0001	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	性 性
2	0.01	0.01~0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
3	0.0001~0.00001	0.0001	不 完	不 完	不 完	感 性
4	0.0001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
5	0.01	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	感 性
6	0.01	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
7	0.01	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
8	0.001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
9	0.1	0.0001	不 完	不 完	不 完	感 性
10	0.1	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
11	0.001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
12	0.1	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	感 性

表 (17) 10%に耐性菌を含む供試株の耐性検査成績

施設 No.	接 種 菌 量		耐 性 検 査 成 績			
	報 告 菌 量	推 定 菌 量	SM(10 γ)	PAS(1 γ)	INH(1 γ)	
1	0.0001	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	性 性
2	0.01	0.01~0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
3	0.0001~0.00001	0.0001	不 完	不 完	不 完	感 性
4	0.0001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
5	0.01	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	感 性
6	0.01	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
7	0.01	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
8	0.001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
9	0.1	0.0001	不 完	不 完	不 完	感 性
10	0.1	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
11	0.001	0.001	不 完	不 完	不 完	感 性
12	0.1	0.1~0.01	不 完	不 完	不 完	感 性

際に接種した菌量を推定する事が出来、施設によって一定の傾向がある事は前述したが、この推定接種菌量と耐性検査成績との間にどのような関係があるかをみたものが、表(15), (16), (17)である。これらの表で、0.1%に耐性菌を含む株から感受性の成績を出している施設では、接種菌量(推定値)が少い傾向があり、10%に耐性菌を含む株では、完全耐性の成績を出している施設は、接種菌量の多い傾向がみられる。この事実、接種菌量の多い、少いという事が耐性検査の量的な判定(完全耐性、不完全耐性、感性)に影響を与える重大な因子である事を示唆している様に思われる。

尚、同一の組成を有する耐性株の施設別耐性検査成績に就いては、本研究の他に、佐藤(直)²⁸⁾、小川(政)²⁹⁾、河盛³⁰⁾の報告があるが、成績の不一致率はかなりある模様である。

第5章 結 語

種々の耐性菌を種々の割合に人工的に混合した結核菌株について12か所の研究協力施設で耐性検査を試みてもらった結果、大多数に於ては予想された耐性成績が認められたが、一部では或は感受性に、或は強い耐性に誤まれた成績が出た。但しそのうちでは後者の誤まりの方がやや多かった。

以上の誤差発生の原因を知るために、各施設の耐性検査術式を厚生省の衛生検査指針を参考にして調査したところ、小川固型培地を用いている点を除けば、細部に於ては少しずつ異っている事が判ったが、そのうちで培地力価の不定、接種菌量殊に生菌量の動揺という事が重大な因子と考えられた。

本研究に際して、御協力下さいました国立京都療養所、国立兵庫療養所、国立宇多野療養所、日赤阿武山病院、結核予防会京都支部、那賀病院、加茂川病院、草津療養所、新三菱京都病院、神田病院、微生物研究所、東山高原サナトリウムの関係各位、並びに執筆に当り御指導下さいました当研究室津久間博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) 厚生省：結核実態調査 Ⅲ, 114, 昭和35年
- 2) 内藤：京大結研紀要, 9—2 : 129, 昭和36年
- 3) 中泉：結核研究の進歩, 22 : 94, 昭和33年
- 4) 堀越：臨床内科小児科, 16—8 : 929, 昭和36年
- 5) 療研調査：日本医事新報, No. 1900 : 3, 昭和35年
- 6) A.D.chaves et al : Am.Rev.Resp.Dis., 84—5, 649, 1961
- 7) 齊藤：結核, 34 : 574, 1959
齊藤：結核, 34 : 641, 1959
齊藤：結核, 34 : 686, 1959
- 8) 近藤：慈恵医大雑誌, 75—12 : 2719, 昭和35年
- 9) J. M. Dickerman and H. F. Easom : Am. Rev. Resp. Dis., 85—6 : 910, 1962
- 10) H. Mac Vandiviere : Am. Rev. Resp. Dis., 84—3 : 399, 1961
- 11) 土井：京大結研紀要, 7—2 : 52, 昭和34年
- 12) 小川(政)：厚生省衛生検査指針, I ~ (6) : 26, 昭和34年
- 13) 鈴木：医学と生物学, 51—3 : 106~109, 昭和34年
- 14) 小川(辰)：厚生省衛生検査指針, I ~ (6) : 27, 昭和34年
- 15) 大川：結核, 36—12 : 753, 昭和36年
- 16) 伊藤：結核, 37—6 : 305, 昭和37年
- 17) 河盛, 松崎：結核, 37—特別号 : 105, 昭和37年
- 18) 山本：京大結研紀要, 36—1 : 58, 昭和29年
- 19) 松島：京大結研紀要, 8—1 : 増刊Ⅱ号 : 595, 昭和34年
- 20) 松山：九大結研紀要, 6—2 : 362, 昭和34年
- 21) 林：名古屋医学, 78—3 : 558, 昭和34年
- 22) 杉山, 篠田：結核, 37—特別号 : 105, 昭和37年
- 23) 平沢：結核, 30 : 199, 昭和30年
- 24) 小川(政)：日本臨床結核, 16 : 417, 昭和32年
- 25) 小川(政)：日本臨床結核, 20—8 : 545, 昭和36年
- 26) 中村(彰)：京大結研紀要, 5—2 : 158, 昭和32年
- 27) 厚生省検査指針, I ~ (6) : 14, 昭和34年
- 28) 佐藤：臨床病理, 5—4 : 349, 昭和32年
- 29) 小川(政)：結核, 36 : 475, 昭和36年
- 30) 河盛：結核, 37 : 160, 昭和37年

(昭和37年9月10日受付)