

結核菌の薬剤耐性迅速測定法に関する研究

〔第1編〕 遠心管内培養早期検出法¹⁾ (山田, 岡田) を
応用した測定法について

京都大学結核研究所細菌血清学部 (指導 植田三郎教授)
国立京都療養所 (所長 蒲田小吉博士)

土 井 和 雄

(受付 昭昭33年 9 月30日)

(本編の要旨は昭和29年 6 月結核病学会近畿地方会
において発表した。

緒 言

結核菌の薬剤耐性測定法としては現在広く薬剤含有卵培養基斜面に培養する方法が行われている。併しこのような方法では成績の判定に少くとも3~4週間を要し、且つ培養基に予め薬剤を加えて加熱凝固させる故、加熱による薬剤濃度の減少を考えねばならない。このことは実地上不利なことは言う迄もないが、同時に著者の研究室の今日迄の関連した実験的研究の結果から見ても亦考えさせられる問題を含んでいるように思う。即ち実施上からは更に迅速な測定法が望まれるわけである。併 著者が迅速測定法を取上げようとする理由は唯単に結果の判定を速かにすると言う点丈ではない。迅速測定法が卵培養基による方法よりもより合理的ではなからうかと考えるからである。以下順次このような考え方で実験を進めその成績を多少とも理論的に考察したいと考える。今日迄迅速測定法として発表された方法には Wright の Slide Cell Culture Method (S.C.C 法)^{2)~7)}, Pryce や Berry and Lowry の Slide Culture Method (S.C 法)⁸⁾, 小川 (辰) 氏の考案した重層法^{4, 6)}, 山田, 岡田氏の考案した遠心管内培養早期検出法¹⁾ に基礎をおいたものが主である。著者は山田, 岡田氏の考案した遠心管内培養早期検出法を応用して結核菌の薬剤耐性の迅速測定を試み、これを在来の卵培養基による直接法と比較し、実地上の

見地から比較検討すると同時に亦それぞれの方法の与える結果がそれぞれ何を意味するか、又相互にどのような関連にあるかを考察したい。此処では実際に患者喀痰を材料とした場合の結果を比較考察したい。

方法及び材料

(1) **材料**: 肺結核患者の塗沫陽性の喀痰29例塗沫陰性の喀痰32例を供試した。

(2) **使用培養基**: 迅速法 (以下迅速法という場合は下記私案の方法を意味する) としては Kirehner 培養基を直接法としては上坂・友田培養基を使用した。薬剤としては Streptomycin (SM), Para-aminosalicylic acid (PAS), Isoniazid (INH) を使用し各培養基における濃度は夫々 1, 10, 100 γ /cc とした。尚直接法の場合 SM は凝固滅菌前に必要量の2倍を使用した。他の PAS, INH は必要量のみを使用した。

(3) 培養方法

迅速法: 喀痰を試験管にとり 4% 苛性ソーダ 5 倍量を加え、強く振盪混和し遠心管に移し、約20分間 37°C に放置した後 20分間強く遠心沈澱し上清を捨て、沈渣に適量の滅菌蒸留水を加えて攪拌、振盪、混和し、20分間強く遠心沈澱した。

上清を捨て、沈渣に薬剤を含ませぬ Kirchner 培養基 1.0cc を加えて十分攪拌して均等液となし、この菌液を各試験培養基 (夫々 SM, PAS, INH 1, 10, 100 γ /c.c を含む Kirchner 培養基及び対照の薬剤を含ませぬ Kirchner 培養基の夫々

1 cc を入れた遠心管合計10本)に1滴宛(約0.1 cc)を加え、密栓して 37°C に置いた。

判定方法：7日後に遠心管を取出し、そのまま駒込ピペットにて上清を捨て、管底の沈澱物を吸取り、スライドグラスに塗沫し、乾燥後火焰で固定し、Ziehl-Neelsen 法で染色し、弱拡大(×80)で鏡検判定した。判定基準は次の様にした。

- ⦿ 各視野に大きな集落(菌数50以上)を多数認めるもの。
- ⦿ 各視野にやゝ大きな集落(菌数20~50)を50個位認めるもの。
- ⦿ 各視野にやゝ大きな集落(菌数20~50)を少数認めるもの。及び各視野に中等大の集落(菌数10~20)を20~50個認めるもの。
- ⦿ 各視野に中等大の集落(菌数10~20)を5~10及び小集落(菌数7~10)を辛うじて認めるもの。
- ⦿ 全視野に小集落を辛うじて少数認めるもの(発育形態を示さぬもの)。
- 全視野に集落を認めないもの。

直接法：迅速法と同時に同一材料について行い、37°C 5週間で判定した。判定基準は次の様にした。

- ⦿ 集落数多数(約500以上)培養基全面に融合しているもの。
- ⦿ 集落数200以上のもの。
- ⦿ 集落数100以上のもの。
- ⦿ 集落数100以下のもの。
- 集落を認めないもの。

実 験 成 績

(1) 塗沫陽性喀痰29例についての成績

SM の場合：両方法共に一致したのは19例66%であつた。迅速法の方が高い値を示したのが5例18%で、直接法の方が高い値を示したのが5例18%であつた。不一致例の1例は迅速法では対照培養基及びを1γ/cc SM 含む培養基には集落を認めなかつたが、10, 100γ/cc. SM を含む培養基では多数の集落を認めた。併し直接法では対照培養基にも少数の集落を認めた。尚不

一致例の中で直接法では耐性が認められたにも拘はらず迅速法では認められなかつた例が2例あつた。

PAS の場合：両方法共に一致したのは17例59%で、迅速法の方が高い値を示したのが5例17%、直接法の方が高い値を示したのが7例24%であつた。

INH の場合：両方法共に一致したのは22例76%、迅速法の方が高い値を示したのが3例10%、直接法の方が高い値を示したのが4例14%であつた。

第 1 表

薬 剤	総 数	一 致	不 一 致	
			迅>直	直>迅
SM	29	19(66%)	5(18%)	5(18%)
PAS	29	17(59%)	5(17%)	7(24%)
INH	29	22(76%)	3(10%)	4(14%)
計	87	58(67%)	13(14%)	16(19%)

以上の成績を総括すると第1表に示すように総数87例の中一致したのは58例67%迅速法の方が高い値を示したのが13例14%、直接法の方が高い値を示したのが16例19%であつた。併乍ら両方法に著明な差異を生じたものはSM の場合3例、PAS の場合2例、INH の場合1例で計6例約7%であつた。

(2) 塗沫陰性喀痰32例についての成績

数ヶ月間月1回の培養検査成績で微量排菌を行う患者喀痰32例について行つた。塗沫陰性32例の中集菌陽性5例他は陰性に留つた。1回の耐性測定検査で培養陰性(何れの試験管にも発育を示さなかつたもの)及び集落数が極めて微量のため成績判定不能のものは1週間間隔にて2, 3回と繰返した。3回行つても陰性及び判定不能のものが5例認められた。1回の検査で成績判定可能のものは集菌陽性を含む14例、2回の検査で可能のもの6例、3回の検査で可能のもの7例であつた。以下判定可能であつた27例の成績について記述する。

SM の場合：両方法共に一致したのは11例40

%, 迅速法の方が高い値を示したのが6例22% 直接法の方が高い値を示したのが10例38%であつた。この10例のうち2例は直接法にのみ発育を示した。

PASの場合: 両方法共に一致したのは16例59%, 迅速法の方が高い値を示したのが3例11% 直接法の方が高い値を示したのが8例30%であつた。

INHの場合: 両方法共に一致したのは16例59%, 迅速法の方が高い値を示したのが5例19%, 直接法の方が高い値を示したのが6例22%であつた。

第2表

薬 剤	総 数	一 致	不 一 致	
			迅>直	直>迅
SM	27	11(40%)	6(22%)	10(38%)
PAS	27	16(59%)	3(11%)	8(30%)
INAH	27	16(59%)	5(19%)	6(22%)
計	81	43(54%)	14(17%)	24(29%)

以上の成績を総括すると第2表に示すように総数81例の中一致したのは43例54%, 迅速法の方が高い値を示したのが14例17% 直接法の方が高い値を示したのが24例29%であつた。上記のように喀痰中結核菌が微量の場合には直接法の方が迅速法に比較して高い値を示す傾向がみられる。特に培養上可成りの菌集落を認めるものより集落数の少ないものの方が高い値を示す傾向が強いように観察される。

総括及び考按

卵培養基による耐性測定法は成績の判定に4週前後を要するが、併し実地上より速に知りたいことが多い。この点を解決するものが迅速測定法であらう。最近本邦においては種々の迅速測定法が報告されている。此等と比較しつつ著者の迅速測定法による成績を考察したい。S.C.M法は Prycc の Slide Culture¹⁸⁾ 法発表以来 Berry and Löwry⁸⁾ を初め本邦でも多数の追試及び変法⁹⁾ が発表されている。この方法は操作に熟練を要し操作如何では可成り培養成績に影

響するようである。S.C.C法はS.C.M法に比して更に操作が複雑で雑菌が侵入しやすい。著者の方法は操作も簡単であり、雑菌の侵入も非常に少い。他に小川(敏)¹⁰⁾、馬場¹¹⁾氏等と同じく山田、岡田氏の方法を応用した迅速測定法を報告しているが、喀痰を苛性ソーダで処理したものをそのまま加え、又培養基を酸性にして加えている。著者は本実験の予備実験として苛性ソーダで喀痰を処理遠沈したもの、苛性ソーダで処理し塩酸で中和後遠沈したもの、及び苛性ソーダで処理遠沈後蒸溜水で洗滌遠沈したものについて比較検討し第3の方法が最も良好な成績を得たので本実験では専ら第3の方法によつた。併し喀痰中の菌数の多いものでは苛性ソーダで処理後遠沈したまゝの方法で十分であるが菌数の比較的少ないものでは第3の方法がよいと考える。次に小川(辰)¹⁴⁾¹⁵⁾氏の変法重層培地による方法は培養基作製が複雑であり、培養後遠沈を行う故前処理が簡単なようであるが操作全体としては著者の方法と同程度である。尚血清を必要としない点は有利であるが著者の方法でも培養基1cc.につき血清0.1cc.を要するにすぎず、日常入手に左程困難を感じない。

上述の如く塗沫陽性喀痰29例についての成績は総数87例中一致したのは58例67%, 迅速法の方が高い値を示したのが13例14%, 直接法の方が高い値を示したのが16例19%であつた。この成績を他の迅速法による成績と比較すると、S.C.C法では弘末、堀本氏³⁾、小沢、川本、滝井¹⁶⁾氏等の直接法とよく一致したという報告を除くと、芦野氏⁵⁾、藤村氏⁴⁾、佐伯氏²⁾、海老名氏⁶⁾、遠藤氏⁷⁾等の成績は何れも直接法よりも高い値を示している。S.C.M法ではM. Cummings, C. Drummond, B. Schwntz¹²⁾氏等のSMについての成績では88%が一致している。田坂、松本¹³⁾氏等の成績は高く出ているようである。遠心管内培養法の小川(敏)¹⁰⁾氏、馬場氏¹¹⁾等の成績もよく一致しているようである。

小川(辰)¹⁴⁾¹⁵⁾氏の重層変法培地による成績でも80~90%においてよく一致している。以上の成績のうち恐らく弱拡大でみたものがよく一致し、油浸装置でみたものが高い値を示している

ようである。著者の成績では直接法が迅速法よりも高い値を示したものが多くみられた。

塗沫陰性例における成績は一般に迅速法は菌数の少い喀痰では応用出来ないと言われている故現在のところ小沢、滝井、川本氏¹⁷⁾等の500例について行われたS.C.C法と小川(辰)氏による直接法との比較の報告以外にはない。氏等の報告によると500例を通じて菌の発育を示したもののについては98.8%の高率において一致している。著者の成績では総数81例中一致したものの54%迅速法が高い値を示したものの17%、直接法が高い値を示したものが29%であつた。

以上のように著者の成績では塗沫陽性陰性例を通じて、直接法の方が高い値を示す傾向がみられるのが他の研究者とは異つている。多少この様な傾向を認めた研究者は小沢、滝井、川本氏等の外に現在迄の報告ではみられない。

直接法の方が迅速法に比し高い値を示しているのは迅速法では耐性を示さず直接法では耐性を示すという例のみではなくて、迅速法では薬剤含有培養基に発育した集落が薬剤を含みぬ対照培養基に発育した集落に比し非常に小さく、それと同一材料による直接法では薬剤含有培養基と対照培養基に発育した集落の間には5週後判定時には差異をみないという例が多い。併乍ら卵培養基を用いる直接法では薬剤含有培養基に長期間培養するのであるから、薬剤の影響に堪えて残つた菌体が多少とも耐性を獲得して発育するのではないかと云うことが疑われる。又一方迅速法の方が高い値を示しているものでは、殆んど例において薬剤含有培養基に発育した集落は薬剤を含みぬ対照培養基に発育した集落に比し小さく、同一材料の直接法では薬剤含有培養基に発育を示さぬか、又非常に少数の集落を認めるのみである。この点より考えれば菌体が薬剤濃度に影響されず、短期間は発育を示すが、それ以上は薬剤の影響を受け発育を示さぬのではなからうかと考える。以上の考察が若し正しいとするならば、薬剤の一次的な影響の結果丈を見ようとする迅速法による成績の方が卵培養基による直接法よりもむしろ正しい値を示しているのではなからうかと考える。

但し喀痰中結核菌が極めて少い場合には上述の他の迅速法と同様に成績の判定が困難で実地上不可能ではないかと考える。

結 言

山田、岡田氏の考案した遠心管内培養早期検出法を応用して、喀痰中結核菌の薬剤耐性測定 of 迅速法を考案し、これと同時に卵培養基による直接法を行つてその成績を比較検討し、次のような結論を得た。

(1) 本法は操作も比較的簡単であり、汚染率も低く、培養基に要する血清も少く、弱拡大で判定を行う故鏡検が簡単である。

(2) 塗沫陽性例では67%陰性例では54%に迅速法の成績は直接法と一致した。併し不一致例では直接法の方が迅速法に比し高い値を示す傾向がある。

(3) 塗沫陰性例では菌含有量の少い喀痰では培養成績にて集落20個位を示すような範囲のものが測定可能ではなからうかと考える。

(4) 直接法の方が迅速法に比し高い値を示す傾向は上記考察よりすれば誤つており、薬剤の一次的な影響の結果丈を見ようとする迅速法の成績が正しい値を示していると考えられる。

稿を終るに臨み終始御指導並びに御校閲を賜つた恩師植田教授に深甚の謝意を表し併せて種々御便宜をいただいた国立京都療養所所長蒲田小吉博士に感謝する。

文 献

- 1) 山田・岡田：結核 27巻 162頁 昭和27年。
- 2) 佐伯：結核 25巻 576頁 昭和25年。
- 3) 河盛・堀本・弘末：臨床 4巻 395頁 昭和62年。
- 4) 藤村：日結 10巻 17頁 昭和26年。
- 5) 芦野：抗研誌 7巻 242頁 昭和26年。
- 6) 海老名：文部省科学研究費，結核研究班。
- 7) 遠藤：昭和25年度研究業績 451頁
同上 475頁
- 8) Berry and Lowry：Am. Rev. Tbc, 60. 51. 1949.
- 9) 辻・山本：日結 11巻 392頁 昭和27年。
- 10) 小川(敏)：日結 12巻 81頁 昭和28年。
- 11) 馬場・二村・斉藤：最新医学 9巻 191頁

昭和29年.

- 12) **Cummings, C. Drmmond, & Schwnty: Gis. of Chest** 18. 202, 1950.
- 13) 田坂・松本: 診断と治療 38巻 17頁 昭和25年.
- 14) 小川(辰): 日結 13巻 119頁 昭和29年.
- 15) 小川(辰)・長田・小関: 結核 31巻 302頁 昭

和31年.

- 16) 小沢・滝井・川本: 結核 30巻 14頁 昭和30年.
- 17) 小沢・滝井・川本: 結核 30巻 86頁 昭和30年.
- 18) **Prycc: J. Path & Bact.** 53. 327. 1941.