

結核菌の薬剤耐性迅速測定法に関する研究

〔第2編〕 湿室内培養早期検出法（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 昭和33年9月30日）

（本編の要旨は昭和31年11月結核病学会近畿地方会
において発表した。）

緒 言

今日迄薬剤耐性の迅速測定を行うために種々の方法が考案され、多少は実用化されているようである。併し何れの方法もその操作が複雑であり、手技に熟練を要する故に、一般に広く日常検査には利用されていない。そこで著者は前編に於て考察したように薬剤耐性の測定法としては、迅速測定法の方が卵培養基に培養する直接法よりもより合理的であると考えるので、操作が簡単な山田，岡田¹⁾氏の湿室内培養早期検出法を耐性の迅速測定に応用を試み、これを前編の遠心管内培養早期検出法及び卵培養基による耐性測定法と比較検討した。

方法及び材料

(1) **材料**：肺結核患者の塗沫陽性の喀痰を供試した。

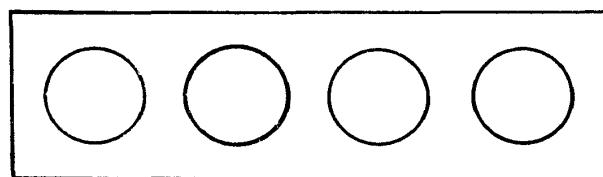
(2) **使用培養基**：迅速法としてはKirchner培養基を、直接法としては上坂，友田，培養基を使用した。薬剤としてはSM, PAS, INHの3種類を使用した。

(3) 実施方法

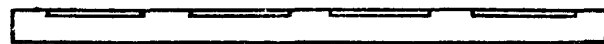
迅速法：（下記私案の方法）喀痰に5倍量の4%苛性ソーダを加えて処置し、遠沈した沈渣に更に適当量の蒸溜水を混和し、再度遠沈して洗滌した沈渣をよく攪拌、混和した後供試した。

第1図に示すように4つの円い凹みのあるオブジェクトを用意し、夫々の凹みに沈渣の1白金耳宛を塗抹する。乾燥後図のように第1の凹みには薬剤を含まぬKirchnerの1滴を、第2の凹みには薬剤1 γ 含有のKirchnerを、第3の凹みには10 γ 含有Kirchnerを、第4の凹みには100 γ 含有Kirchnerの夫々一滴宛を加えた。このようにしたオブジェクトをスライド棚にのせ、更に湿室におさめて37°Cに7日間おいて結果を判定した。

第 1 図



0% c.c. 1 10 100



判定方法：7日後にオブジェクトを湿室から取出して乾燥し、固定染色，弱拡大（ $\times 80$ ）で鏡検判定した。記載は次のようにした。

- 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。（夫々の菌集団に発育の徴のみられないもの。）
- 全視野に集落を認めないもの。

遠心管内培養法による迅速法及び卵培養基による直接法：第1編記載と全く同様の方法により湿室法の迅速法と同一材料について同時に実施し結果は第1編と同様の基準により判定した。

実験成績

(1) 遠心管内培養法との比較成績

湿室内培養法をM、遠心管内培養法をCとするとその成績は第1表（SMの例）、第2表（PASの例）、第3表（INHの例）に示す通りで

ある。何れの場合も全例に於いて殆んど一致し、湿室内培養法と遠心管内培養法による成績には差異はないものとする。

(2) 卵培養基による直接法との比較成績

湿室内培養法をM、直接法をEとするとSMの例では第4、5表に示すように18例中大体一致したもの10例55%、湿室法が高い値を示したもの3例17%、直接法が高い値を示したもの5例28%であつた。PASの例では第6、7表に示すように16例中大体一致したもの10例63%、湿室法が高い値を示したもの2例12%、直接法が高い値を示したもの4例25%であつた。INHの例では第6、9表に示すように10例中大体一致したもの5例50%、湿室法が高い値を示したもの2例20%、直接法が高い値を示したもの3例30%であつた。以上の成績を総括すると第10表に示すように総数44例の中大体一致したもの25例57%、湿室法が高い値を示したもの7例16%、直接法が高い値を示したもの12例27%であつた。

第 1 表

SM の 例

	1	2	3	4	5	6	7	8
培養方法 γ/cc	M C	M C	M C	M C	M C	M C	M C	M C
0	卅 卅	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
1	— —	卍 卍	卍 卍	— —	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
10	— —	卍 卍	— —	— —	卍 卍	卍 卍	卍 卍	÷ —
100	— —	— —	— —	— —	卍 卍	卍 卍	÷ —	— —

第 2 表

PAS の 例

	1	2	3	4	5	6	7	8
培養方法 γ/cc	M C	M C	M C	M C	M C	M C	M C	M C
0	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
1	— —	卍 卍	— —	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍	卍 卍
10	— —	卍 卍	— —	卍 卍	— —	卍 卍	卍 卍	÷ 卍
100	— —	÷ —	— —	÷ —	— —	卍 卍	卍 卍	— —

第 3 表

INH の例

γ/cc	培養方法	1	2	3	4	5	6	7	8
		M C	M C	M C	M C	M C	M C	M C	M C
0		≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡
1		— —	— —	+ ÷	+ ÷	≡ +	≡ ≡	— —	— —
10		— —	— —	÷ —	— —	— —	≡ +	— —	— —
100		— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —

第 4 表

SM の例

γ/cc	培養方法	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E
0		≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡
1		— —	≡ ≡	— —	— ÷	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	— +	— —
10		— —	≡ ≡	— —	— —	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	— —	— —
100		— —	≡ ≡	— —	— —	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	— —	— —

第 5 表

SM の例

γ/cc	培養方法	10	11	12	13	14	15	16	17	18
		M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E
0		≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡
1		≡ —	≡ ≡	≡ ≡	— +	≡ ≡	≡ ≡	+ —	≡ —	≡ —
10		— —	+ ≡	÷ ≡	— —	— —	÷ +	— —	+ —	— —
100		— —	— +	— —	— —	— —	— +	— —	— —	— —

第 6 表

PAS の例

γ/cc	培養方法	1	2	3	4	5	6	7	8
		M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E
0		≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡
1		— —	≡ ≡	÷ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡	≡ ≡
10		— —	≡ ≡	— ÷	≡ ≡	+ ≡	÷ ≡	≡ ≡	≡ ≡
100		— —	÷ ≡	— —	÷ ≡	÷ +	— +	— +	+ +

第 7 表

PAS の例

	9	10	11	12	13	14	15	16
培養方法 γ/cc	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E	M E
0	+++ ++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
1	++ +	++ ++	+ +	++ -	- -	+ -	++ ++	++ ++
10	- ÷	+ ++	- -	+ -	- -	- -	+ ++	+ ++
100	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	÷ ++

第 8 表

INH の例

	1	2	3	4	5
培養方法 γ/cc	M E	M E	M E	M E	M E
0	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
1	- ÷	- -	+ +	+ -	++ ++
10	- -	- -	- -	- -	++ -
100	- -	- -	- -	- -	++ -

第 9 表

INH の例

	6	7	8	9	10
培養方法 γ/cc	M E	M E	M E	M E	M E
0	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
1	++ ++	++ +	++ ++	- +	+ ++
10	- +	- -	- ÷	- ++	- ÷
100	- -	- -	- -	- -	- -

第 10 表

薬 剤	総 数	一 致	不 一 致	
			M>E	M>E
SM	18	10(55%)	3(17%)	5(28%)
PAS	16	10(63%)	2(12%)	4(25%)
INH	10	5(50%)	2(20%)	3(30%)
計	44	25(57%)	7(16%)	12(27%)

総括及び考按

現在行われている S.C.M 法は操作如何では可成り培養成績に影響があり、又操作は決して容

易ではない。S.C.C 法は S.C.M 法に比して手技は更に複雑であり、両者とも成績判定は必ずしも容易でない。山田、岡田氏の遠心管内培養法を応用した方法は馬場、二村^{2,3)}氏、小川（政敏）⁴⁾氏の方法及びび著者の考案した方法があるが、これ等は培養後沈澱を取出して、スライドグラスに固定する操作が手数を要し、且つ取出す場合に集落を管底に残したり、ピペットに附着させたりする場合が多い。菌量の多い喀痰では成績に影響は少いが、比較的菌量の少ないものでは成績に変動を来すおそれがある。小川（辰）^{5,6)}氏の変法重層培地を応用した方法でも培養後遠沈して取出すのであるから同様のおそれがある。又培養基製作に難点があるようである。

著者の湿室内培養法を応用した迅速法では培養後そのまま固定するのであるから上記のようなおそれもなく、従来の上述の迅速法に比し手技も更に一段と簡単であり、極めて少量の培養基で実施出来る。

私案の湿室法を応用した迅速法と卵培養基を用いた直接法とを比較した成績は総数44例の中57%に一致を示し、湿室法が高い値を示したものが16%、直接法が高い値を示したものが27%であつた。現在のところでは小沢、滝井、川本^{7,8)}氏等が S.C.M 法と小川（辰）氏の直接法との比較成績で小川氏法が高い値を示す傾向がある点を指摘しているのを除いては、第1編において考察したように、殆んどの研究者において種々の迅速法は卵培養基による直接法とその成績はよく一致していると報告されている。併乍ら著者の成績は第1編の遠心管内培養法を応用し

た迅速法における成績と同様に卵培養基による直接法が湿室内培養法を応用した迅速法よりも高い値を示す傾向がある。この点については第1編に於いて考察したように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った菌体が多量とも耐性を獲得して発育するのではないかと云う事が疑われる。尚直接法では結果の判定に長い日数を必要とするのみならず、培養基中の薬剤濃度が加熱凝固に際して、又長期間の培養経過中に動揺する等の不利不便がある。且つ卵培養基上に発育した集落全体に十分に薬剤が滲透しているかどうか問題である。これ等の問題を十分満足させ薬剤の一次的な影響の結果をみ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と考えらる。

結 言

山田、岡田氏の湿室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の迅速法を考案し、これと遠心管内培養法による迅速法及び卵培養基による方法を行つて、その成績を比較検討し次の如き結論を得た。

(1) 本法と遠心管内培養法による迅速法とは成績は殆んど全例において一致し、差異はな

く、かへつて正確である。

(2) 本法と卵培養基による方法とは44例のうち25例57%において一致し、本法の方が高い値を示したものは7例16%、卵培養基による方法の方が耐性が高く出たものが12例27%であつて、不一致例では卵培養基による方法の方が耐性が高く出る傾向を示した。

(3) 本法は卵培養基を用いる方法における不利不便はなく、従来の迅速法に比し手技も更に一段と簡単であり、使用培養基も極めて少量で実施出来る。且つその成績も確実であるので実地上推奨出来るものと考えらる。

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博士に感謝する。

文 献

- 1) 山田・岡田：結核 27巻 169頁 昭和27年
- 2) 馬場・二村：臨床病盟 1巻 82頁 昭和28年
- 3) 馬場・二村：最近医学 9巻 191頁 昭和29年
- 4) 小川(政敏)：日結 12巻 81頁 昭和28年
- 5) 小川(辰次)：日結 13巻 119頁 昭和29年
- 6) 小川(辰次)：結核 31巻 302頁 昭和31年
- 7) 小沢・滝井・川本：結核 30巻 14頁 昭和30年
- 8) 小沢・滝井・川本：結核 30巻 86頁 昭和30年