

結核菌の抗結核剤に対する抵抗性測定法の比較試験成績について

第1報 塗抹陽性喀痰について

神戸市衛生研究所 (所長 堀 道紀博士)
慶応義塾大学医学部細菌学教室 (指導 牛場大蔵教授)

小沢 敦・滝井 督三・川本 昭

(受付 昭和29年8月10日)

緒 言

結核菌の抗結核剤に対する抵抗性測定については現在種々なる方法が行われているが、抵抗性測定方法としてはなるべく迅速簡便且つ確実な方法が強く要望されている。現在かかる条件を満足する方法は少ないが、われわれは1)Berry and hourlyによつて始められたスライド・カルチュア法(S.C.法)と小川氏 3% KH_2PO_4 培地を用いる方法(以下小川法と略)とを SM, PAS, INAHの三種抗結核剤につき、塗抹陽性喀痰 500 例について比較検討したのでここにその成績を記載し、大方の御批判を仰ぎ度い。

A 実験方法

1) 小川法—供試培地は種々な濃度(1cc 当り 1Y, 10Y, 100Y)に各薬剤を混入した小川氏 3% KH_2PO_4 培地に、8% NaOH にて前処置した喀痰の 0.1cc を接種し、4週で成績を判定した。SM 加 3% KH_2PO_4 培地は Dehydrostreptomycin-Sulfate を予め所要濃度の 2.5 倍量加え、85°C 45分加熱滅菌した。INAH, PAS を加えた 3% KH_2PO_4 培地は最初から所要濃度に加え加熱滅菌した。

2) S.C.法—Berry and Lowry に従い、縦切スライドに喀痰の粘稠な部分を比較的広範囲に塗抹孵卵器内で充分乾燥、4% H_2SO_4 中に 20 分間孵卵器内で前処置した後、滅菌蒸溜水にて 2 回洗滌し、各薬剤を種々なる濃度 (1Y, 10Y, 100Y) に混入した 12 万倍マラカイト緑加キルヒナー培地 (10% の割りに牛血清を加えてある) に各濃度毎 2 枚宛縦切スライドを入れ、1 週間培養後取りだし、火焰固定後 ziehl-Neelsen 染色を施し、弱拡大 (10×20×) にて鏡検、成績を判定した。

3) 判定方法

小川法の場合は培地上に発育した菌集落数により次の 3 段階に区分記載した。

十…集落数 1 から 100 を迄

卅…集落数 100 から 300 を迄

卅卅…集落数 300 を以上で培地全面に発育を認めたもの

S.C 法の場合は菌の発育増殖程度に応じて次の 4 段階に区分記載した。

十…抗酸性菌は認められるが増殖形の認められないもの

十十…細状、塊状の増殖形が各視野に僅かながら認められるもの

卅…細状、塊状の増殖形が各視野に相当多数認められるもの

卅卅…更に増殖形が増加し細状、塊状の増殖形が各視野を満たしているもの

判定方法の基準は対照培地と同程度に発育した最高濃度を以つて耐性を判定した。対照培地に菌の発育が少ない場合は判定不能とした。

B 実験成績

1) 塗抹陽性喀痰 500 例について S.C 法と小川法とを併用した場合の菌の発育を示した最高濃度件数の比較

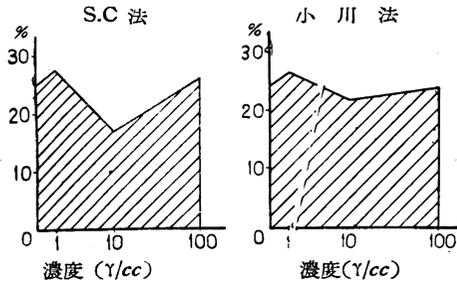
第1表 500 例の S.C 法と小川法との比較成績

(表中の数字は菌の発育を示した最高濃度における件数を示す)

方法	濃度(Y/cc)				計	%
	1	10	100			
S. C 法	144	87	129	360	72%	
小川法	141	112	117	370	74%	

両法の比較成績は第1表に示す如くその測定値は概ね近接した成績を示したが、500 例を通じ 1Y 以上に菌の発育を認めたもの S.C 法では 360 例、小川法では 370 例であり、小川法は S.C 法に比し 10Y の濃度における場合やや高値を示す傾向にあつた。なお 500 例中対照に菌の発育を認めなかつたもの S.C 法では 17 例、小川法では 5 例であつた。第1表を図示すると第1図の如くで、両法における山の形及びその高さが類似した様相を示したことは、両測定値の近似性を示すものであろう。なお両法において 1Y 迄菌の発育を認めたものが最も多く、ついで 100Y, 10Y の順であつた。S.C 法において

第1図 菌の発育を示した最高濃度における件数の比較成績(500例について)



は低濃度 1Y迄菌の発育を認めたものの件数及び高濃度 100Y迄発育を認めたものの件数は小川法に比し、優位にあつたのに反し、10Y迄菌の発育を認めたものの件数は低位にあつた。

2) ガフキー号数別に見た S.C 法と小川法との比較成績

塗抹陽性喀痰 500 例をガフキー 1 号～2 号迄、ガフキー 3 号～5 号迄ガフキー 6 号以上の 3 段階に分ち S.C 法と小川法とを菌の発育を示した最高濃度における件数を以つて比較した成績は第 2 表より第 4 表に示す如くである。

第 2 表 ガフキー 1 号～2 号 (149 例について)

S.C 法と小川法との比較成績
(表中の数字は菌の発育を示した最高濃度における件数)

濃度(Y/cc)	1	10	100	計	%
方法					
S. C 法	42	15	13	70	46.9%
小川法	44	21	25	90	60.4%

第 3 表 ガフキー 3 号～5 号 (266 例について)

S.C 法と小川法との比較成績
(表中数字は菌の発育を示した最高濃度における件数)

濃度(Y/cc)	1	10	100	計	%
方法					
S. C 法	82	60	80	222	83.4%
小川法	79	71	60	210	78.9%

第 2 表においてガフキー 1 号～2 号迄の 149 例について 1Y 以上に菌の発育を認めたものは、S.C 法においては 70 例 (46.9%)、小川法においては 90 例 (60.4%) であり、小川法は S.C 法に比し高値を示した (この差は χ^2 による検定により有意の差を示した)。これに反しガフキー 3 号～5 号迄の 266 例において 1Y 以上に菌の発育を示したもの S.C 法は 222 例 (83.4%)、小川法においては 210 例 (78.9%) であり、又ガフキー 6 号以上の 85 例において 1Y 以上に菌の発育を認めたも

第 4 表 ガフキー 6 号以上 (85 件について)

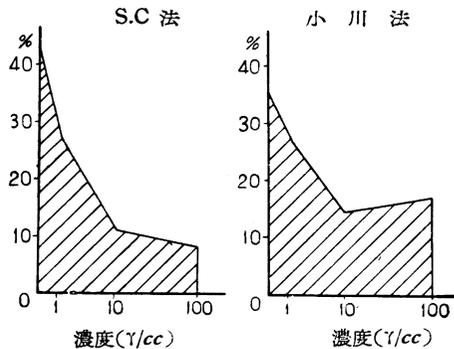
S.C 法と小川法との比較成績
(表中の数字は菌の発育を示した最高濃度における件数)

濃度(Y/cc)	1	10	100	計	%
方法					
S. C 法	20	20	36	76	89.4%
小川法	18	20	32	70	82.3%

のは S.C 法において 76 例 (89.4%)、小川法においては 70 例 (82.3%) であつた。すなわちガフキー号数 3 号以上のものにおいては S.C 法は小川法と殆んど同値を示した。第 2 表、第 3 表、第 4 表の成績を図示すると

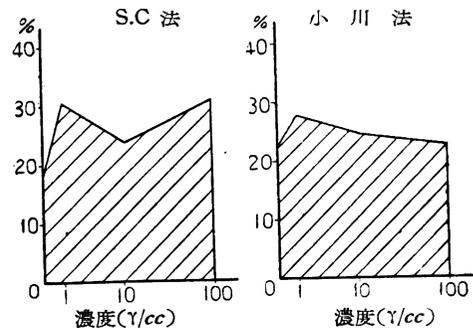
第 2 図 ガフキー 1 号～2 号迄 (149 例について)

菌の発育を示した最高濃度における件数の比較成績



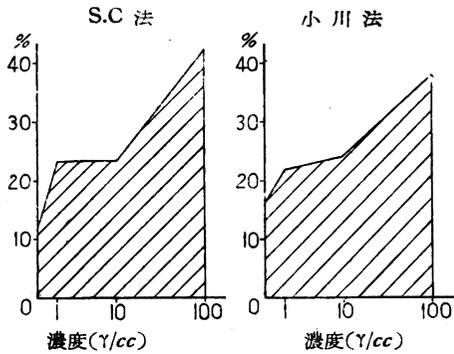
第 3 図 ガフキー 3 号～5 号迄 (266 例)

菌の発育を示した最高濃度における件数の比較成績



第 2 図、第 3 図、第 4 図の如くであるが、いずれの場合も S.C 法と小川法における山の高さ及び形は大体近似した様相を示した。そしてこの傾向はガフキー号数が増加するにつれて著明であつた。換言すれば含菌量が多くなればなる程、S.C 法と小川法とは益々近接した値を示す傾向を現わしたとえよう。特にガフキー 6 号以上において両法の測定値が殆んど一致していることを第 4 図にて観ることができる。

第4図 ガフキ-6号以上(85例)
菌の発育を示した最高濃度における件数の比較成績



すなわち前に述べた如く 500 例を通じ小川法が S.C 法に比しやや高値を示すようであるが、この傾向は含菌量が少ない場合で(第2表)、含菌量が増加するに従い S.C 法の値は小川法の測定値に近接し、却つて S.C 法は小川法よりも高値の傾向さえ示した(第3表、第4表)。

3) 薬剤別に見た S.C 法と小川法との比較

塗抹陽性喀痰 500 例を以て薬剤別に S.C 法と小川法とを菌の発育を示した最高濃度における件数で比較した成績は第5表、第6表及び第7表の如くである。第5表 SM においては 239 例中 1Y 以上に発育を認めたもの S.C 法 177 例(74.1%)、小川法においては 195 例(81.5%)で、小川法が S.C 法に比し 10Y 以上においてやや高値の傾向を示した。PAS においては 192 例中 1Y 以上に菌の発育を認めたもの S.C 法においては 122 例(63.5%)、小川法においては 119 例(61.9%)で両法殆んど同値を示したが、10Y の濃度では小川法が高値であるに反し、1Y, 100Y の濃度においては S.C 法が高値を示す傾向にあつた。INAH においては 69 例中 1Y 以上に菌の発育を認めたもの S.C 法では 42 例(60.8%)、小川法では 47 例(68.1%)で、両者とも殆んど同値といえよう。

第5表 SM (239例)

(表中の数字は菌の発育を示した最高濃度における件数)

濃度(Y/cc)	1	10	100	計	%
方法					
S. C 法	68	36	73	177	74.1%
小川法	66	48	81	195	81.5%

なお第5, 6, 7表を図示すると第5, 6, 7図に示す如くであるが、SM, PAS, INAH いずれにおいても S.C 法と小川法とは山の高さ及び形がほぼ類似した様相を呈している。また薬剤の種類別に見ると、SM の場合は PAS, INAH の場合とはこの形から見た耐性菌分布はやや趣を異にし、PAS, INAH はともに類似した

第6表 PAS (192例)
(表中の数字は菌の発育を示した最高濃度における件数)

濃度(Y/cc)	1	10	100	計	%
方法					
S. C 法	54	32	36	122	63.5%
小川法	51	47	21	119	61.9%

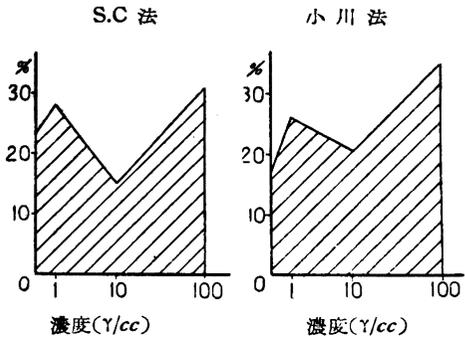
第7表 INAH (69例)

(表中の数字は菌の発育を示した最高濃度における件数)

濃度(Y/cc)	1	10	100	計	%
方法					
S. C 法	20	16	6	42	60.8%
小川法	22	18	7	47	68.1%

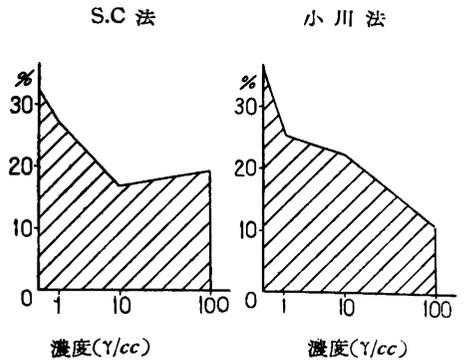
第5図 SM (239例)

菌の発育を示した最高濃度における件数の比較成績



第6図 PAS (192例)

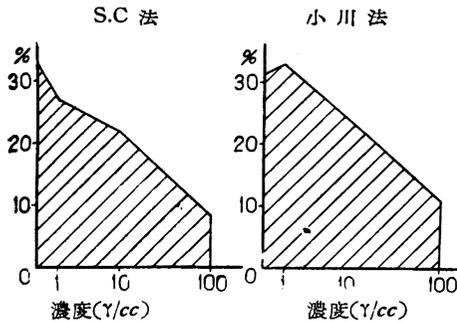
菌の発育を示した最高濃度における件数の比較成績



山の形を示して(第6, 7図)高濃度に行くに従いその発育する菌が減少して行く傾向にあるのに反し、SM においては第5図の如く 100Y 迄発育する菌が最も多く次いで 1Y, 10Y の順であつた。以上の事実は現在 SM 耐性

第7図 INAH (69例)

菌の發育を示した最高濃度における件数成績



菌分布度が高く、PAS, INAH は SM に比してその耐性菌分布が低いような感をいだかせる。さらに臆測を許されるならば、SM においては中等度耐性株が減少し、高度耐性株出現の傾向が増大しつつあるようにも思われる。このことは一般臨床医家が化学療法実施に当り、SM 耐性菌防止策を中心として抗結核剤の正しい投与方法を再検討する必要を痛感せしめる。

以上塗抹陽性喀痰 500 例につき、S.C 法と小川法とを併用して耐性試験を行い、耐性測定値を比較した結果を一括すると次のようであった。

- (1) 両側測定値が完全に一致したもの——345例
 - (2) 両側測定値が殆んど一致したもの——147例
 - (3) 両側測定値に著明な差が生じたもの——8例——1.6%
- 著明な差が生じた 8 例中、小川法が高値を示したものの 6 例、S.C 法が高値を示したものの 2 例であった。

総括並びに考按

結核菌の抗結核剤に対する抵抗性測定法は本邦において多数の諸先学によつて報告されているが、われわれはなるべく簡便に迅速且つ適確に耐性測定を行う實際の見地から Berry and Lowry によつて始められた S.C 法を取りあげ、これと小川法とを塗抹陽性喀痰 500 例について比較検討した。その成績は前述した如く、500 例を通じ S.C 法と小川法とは殆んど一致した耐性値を示したが、500 例中 8 例すなわち 1.6% に両耐性値に著明な差を生じた。500 例を通じ小川法が S.C 法に比しやや高値を示す傾向にあるが、喀痰の含菌量の少ない場合程この傾向は著しく、含菌量の増加するに従い小川法と S.C 法では殆んど近接した値を示し、ガフキー 3 号以上の喀痰においては却つて S.C 法が小川法に比しやや高値を示す傾向を示した。最近³⁾ 水溜は S.C 法と薬剤含有岡・片倉培地塗抹培養法とを比較し、S.C 法は岡・片倉培地塗抹培養法より抵抗性が高く評価されるといつていることは、われわれの行なつた S.C 法と小川法との比較成績とやや趣を異にしている。薬剤別に見た場合は SM の

耐性菌分布状態は PAS, INAH に比しやや趣を異にし、PAS, INAH はほぼ類似した分布状況を示した。SM, PAS, INAH それぞれの場合において S.C 法と小川法とは殆んど一致した測定値を示したが、SM の場合には小川法が S.C 法に比しやや高値を示したのに対し、PAS, INAH の場合には全体として S.C 法が小川法とほぼ同値を示した。S.C 法に関しては諸先学が既に報告しているところであるが、4) 内田等は S.C 法には 5% H₂ SO₄ 処理後アルカリ Youmans 培地を用いるのが最も優れており、又一程度以上の含菌量が必要であるとし、又⁵⁾ 佐藤は S.C 法は迅速という点では最も優れているが、含菌量が少ない時は殆んど判定不能であり、少なくともガフキー 3 号以上のものでなければ測定し難いようであるといつている。しかし今迄の報告はいずれも少数の例数を以つて S.C 法の欠点を云々している傾きがないでもない。われわれは塗抹陽性喀痰 500 例につき S.C 法と小川法とを併用し、両測定値を比較検討し 1.6% において著明な測定値の差を認めたと、概ね一致した成績を得たことは、S.C 法の実際利用に曙光を見出したものといえよう。しかし含菌量が少ない場合 S.C 法と小川法とはややその測定値に懸隔があり、小川法が高値を示す傾向があるのはわれわれの実験成績からも否定できない。塗抹陰性喀痰について S.C 法小川法の比較実験成績は統報において考察検討を加え、ここでは云々することを差し控えたいが、S.C 法そのものが喀痰粘稠部をとりスライドになるべく広範囲に塗抹固定し、一定の術者が一定の術式について行なえば、少なくとも塗抹陽性喀痰については固形培地法に比し遜色ない結果を期待できることは、われわれの実験成績から見ても推察できると思う。

結 論

われわれは塗抹陽性喀痰 500 例につき S.C 法と小川法とを併用して抗結核薬剤に対する耐性検査を行なつて、次の如き結論を得た。

- 1) 500 例を通じ両法の耐性値は殆んど一致(98.4%)したが、内 8 例(1.6%)において著明な差を生じた。
- 2) 500 例を通じ小川法は S.C 法に比し SM の場合その抵抗性測定値がやや高く現われる結果を得た。
- 3) ガフキー 1 号～3 号迄の含菌量の比較的少ない喀痰においては、小川法は S.C 法に比し高値を示し、ややその測定値に懸隔があるように思われるが、ガフキー 3 号以上のものにおいては S.C 法は小川法に比しやや高値の傾向すら示し、その測定値は殆んど近接した値を示した。

擧げに當り御指導、御校閲を賜りたる牛場教授並びに堀所長に深謝し御協力の勞を惜しまれなかつた同僚

各位に感謝する。

文 献

- 1) J. W Berry and Hope Lowry: Am. Review of Tuberculosis, 60: 51, 1949.
- 2) 佐藤良一郎: 数理統計学概説, p. 225~235, 昭和 25 年 11 月.

- 3) 水溜: 慶応医学, 31: 93, 昭和 29 年 3 月.
- 4) 内田・吉川・木村: 最新医学, 9: 29, 昭和 29 年 2 月.
- 5) 佐藤: 慶応医学, 29: 69, 昭和 27 年 2 月.

