

結核菌の呈色反応を利用した新迅速耐性検査法について

国立中野療養所（所長 春木秀次郎・指導 馬場 治賢）

河 合 潔

（受付 昭和 30 年 5 月 31 日）

緒 言

化学療法剤の適確な応用を望むには、治療前に、対称とする細菌の該薬剤に対する感受性を知ることが理想である。殊に Cummings and Livings⁽¹⁾ により SM 抵抗菌による感染の発生が報告された現在では、その必要性は増大した。ところが現実には必ずしも理想通りに行なわれていない。その原因は標準法では判定に 4 ないし 6 週を要し、しばしばその結果の判明まで治療を待つておれぬためである。このような情勢から迅速法の確立と普及は今後益々重大さを増すことと思われる。

これまで迅速法に関する報告は非常に多く Slide Culture の応用では河盛²⁾、藤村³⁾、末弘⁴⁾等の発表。Berry and Lowry⁵⁾ の Slide Culture の応用では小沢⁶⁾等の報告。遠心管内培養法の応用では植田⁷⁾、小川(政)⁸⁾、馬場⁹⁾等の報告があるが培地に血液ないし血清を必要とし、雑菌混入の危険が多く、操作も繁雑である等の点で、その普及性に若干難点があつた。もつとも小沢等は S.C 法を多数例に実施され好結果を得られている。しかし Hofmann und Nickel¹⁰⁾ の如く S.C 法は実用的でないとして述べている人もある。ところが最近に至り小川(辰)¹¹⁾等は血清を含まない新重層培地による迅速法を発表された。本法は判定に際し遠心、染色、鏡検操作が必要であるが培地に血清を必要とせず雑菌の混入もすくないという点で一歩理想に近づいたものであり、近藤¹²⁾も本法を推奨している。他方生結核菌塊の Tellurium および Selenium 塩に対する還元反応は、古くは Belfanti¹³⁾、Corper¹⁴⁾、最近では Sula¹⁵⁾等により報告されているが、これらの薬剤中亜テル酸カリ (K_2TeO_6) を最初に耐性検査に使用したのは Meyer et Galland¹⁶⁾ で彼は固型培地上の 10 日間培養の微小コロニーを、1% 亜テル酸カリを滴下して黒色に呈色せしめ、早期に耐性の判定を行つた。辰戸¹⁷⁾、小川(辰)¹⁸⁾等も本法を追試され亜テル酸カリの効果を一応認めている。しかしこの方法もコロニーの観察は試験管壁を通して行なわねばならぬし、ルーベヤ顕微鏡で観察する上にも不便があつた。したがつて私は上記の諸欠点を除くため、培養器具はシャーレに改めてコロニーの観察を容易にし、培地には小川氏重層培地を用いて培地の乾

燥に対抗せしめ、一定期間培養後 Tetrazolium 系薬剤 19, 20) も含めて最も優れた呈色剤を用うればよいという着想の下に昭和 29 年 8 月以来実験を重ねて来たが最近に至り具体的方法を確立したので以下その詳細を述べ御批判を仰ぎたいと思う。

検 査 方 法

説明の都合上具体的な検査法を先に述べ、その後に基づき実験を記載した。

1) 培養器具；本報告には中シャーレ内に 4 個宛納められる小シャーレを使用した。小シャーレは内径 27mm、深さ 15mm の円形ガラスシャーレで、内径 31mm、深さ 14mm 位の蓋を有し、注文製品である (図 1)。中シャーレの中身は内径 87mm 深さ 20mm で蓋付の既製品を使用した。上記の小シャーレを 4 個宛中シャーレに納め (この際中シャーレの蓋を下側にする) 乾熱滅菌器で 160°C、60 分間滅菌し使用した。

2) 培地の製法；その組成は小川氏重層培地の変法である。全卵液 2 に対し 3% KH_2PO_4 を 1 の割合に加え、マレヒットグリーンのみ 0.04% の割合に混じた原液を作る (味の素およびグリセリンは不要)。この原液を 1.5cc 宛小シャーレに分注し、中シャーレ内に納めたまま、血清凝固器内で 85°C 60 分間凝固せしめる。この際血清凝固器底面の傾斜により小シャーレ内の固型培地もまた軽い傾斜を呈している。その後次の組成の液体培地を作り 100°C、60 分コツホ釜で滅菌後その 2.5cc 宛を重層した。

KH_2PO_4	1.0g
グルタミン酸ソーダ	0.2g
グリセリン	2.0cc
蒸溜水	100.0cc

3) 薬液の製法；所要濃度の 40 倍濃度の薬液を作る。SM は 1 瓦入りバイアルに滅菌蒸溜水 4cc を加えて、200mg/cc とし、さらに 50 倍希釈して 100r×40/cc を作り以下 10r×40/cc、1r×40/cc の濃度とする。INAH は 0.1g を 100cc に溶しザイツ濾過後 200 倍希釈で 5r×40/cc を作り以下 18×40/cc、0.1r×40/cc とする。PAS は 1g を 100cc に溶しザイツ濾過後その 4cc に滅菌蒸溜水 6cc を加え 100r×40/cc とし、さらに 10r×

4Ccc, 1r×40/cc を作る。これらの薬液をそれぞれメスピベットで 0.1cc 宛小シャーレ内に分注する。その分注後 3 時間以後に使用した。以上の薬液は英国化学療法委員会の規定(21) に基き 5°C に保存し SM は 6 カ月間、 KNAH は 3 カ月間、PAS は 1 カ月間、必要に応じ使用

した。

4) 培養法と判定法: 塗抹陽性の喀痰、膿胸、膿沈渣および硫酸亜鉛による胃液の沈渣等を 8% および 4% NaOH で 5×~20× に稀釈充分に混和する。この際、 NaOH の最終濃度は常に 4% とした。その後各小シャ

ーレに 0.1cc 宛加うる (通常は 1cc が 20 滴前後となる駒込ピベットで 2 滴宛滴下した)。間接法でも 4% NaOH で 1mg/cc の菌液を作り、0.1cc 宛培養した。培養は 38°C で 10 日間である。その後 0.5% 亜テルル酸ソーダまたはカリを各小シャーレに 2 滴宛 (約 0.1cc) 滴下し、再び孵卵器内に置き 18~24 時間後黒変した毛髪様の結核菌塊 (図 2) を肉眼およびルーペで観察し菌量を対照と比較判定した (判定の記載法は後述)。

表 1 上液中 KH_2PO_4 濃度と PH

KH_2PO_4 濃度		1% KH_2PO_4		2% KH_2PO_4		3% KH_2PO_4	
前 PH	B. T. B.	6.2>		6.2>		6.2>	
	B. C. P.	6.0		6.0		5.6	
	M. R.	6.0		6.0		5.8	
	C. P. R.	6.0		6.0		5.8	
4% NaOH 量		0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
2 時間後 PH	B. T. B.	6.6	7.0	6.4	6.5	6.2	6.6
	B. C. P.	6.8	7.0	6.4	6.6	6.2	6.6
	M. R.	6.8	7.0	6.4	6.6	6.2	6.6
	C. P. R.	6.6	6.6<	6.4	6.6	6.2	6.6
10 日後(2) PH	B. T. B.	6.6	7.0	6.4	6.6	6.2	6.4
	B. C. P.	6.6	7.0	6.4	6.8	6.2	6.6
	M. R.	6.8	7.0	6.4	6.8	6.2	6.4
	C. P. R.	6.6	6.6<	6.4	6.6	6.2	6.4
完全褪色時間 (1)		110分	180分	30分	60分	20分	45分

注 (1) 完全褪色時間とは 4% NaOH の注入により下の固形培地上に出来たマロヒットグリーンの変色が元に戻る時間である

(2) 4% NaOH を注入した後 10 日間室温に放置した場合の上液の PH である

基礎実験

1) 上液の KH_2PO_4 量と PH: 上液中の KH_2PO_4 量増した際の 4% NaOH に対する緩衝能力を PH の変化および一旦黄変した培地の黄色褪色時間により判定した (表 1)。表の如く緩衝能力は、PH と完全褪色時間の双方より見て KH_2PO_4 の増量とともに増す。1% KH_2PO_4 では NaOH 0.1cc の注入では略 PH 6.6 に保たれている。ただし測定は各 2 個宛の小シャーレにつき PH 試験紙により行つた。

2) 培地の組成と発育菌量

a) 上液中の KH_2PO_4 濃度を増せば発育菌量もともに増すか否かを、前述の上液中 KH_2PO_4 のみを 2%, 3% と増した培地に同一喀痰の 10×~10,000× 稀釈混和液を 0.1cc および 0.2cc あて 10 日間培養し、判定した結果は表 2 の如くである。表の如く 0.1cc 培養では濃度の増加とともに菌量は増加しなかつた。3% KH_2PO_4 ではむしろ発育不良であつた。0.2cc 培養では 3% は 2% とほとんど

表 2 KH_2PO_4 濃度と発育および PH との関係

稀釈喀痰量		KH_2PO_4 濃度				
		10×	100×	1,000×	10,000×	
0.1cc	1%	発育	冊冊冊冊	冊冊冊冊	++++	(出) (出) (出) (出)
		PH	6.5	6.6	6.7	6.8
	2%	発育	冊冊冊冊	冊冊冊冊	++++	(出) (出) (出) (出)
		PH	6.4	6.4	6.4	6.4
	3%	発育	冊冊冊冊	++++	±±±±	(-) (-) (-) (-)
		PH	6.2	6.2	6.2	6.2
0.2cc	1%	発育	冊冊冊冊	(-) (-) (-) (-)	(-) (-) (-) (-)	(-) (-) (-) (-)
		PH	6.8	7.4	8.6	8.8
	2%	発育	冊冊冊冊	冊冊冊冊	++++	(-) (-) (-) (-)
		PH	6.6	6.8	6.9	7.1
	3%	発育	冊冊冊冊	冊冊冊冊	++++	(-) (-) (-) (-)
		PH	6.4	6.4	6.5	6.6

注 (1) 冊~+ は肉眼で菌塊が観察出来たもの
± は肉眼で判定出来ずルーペで菌塊と判るもの
(出) はルーペで判断出来ず顕微鏡 (28×) で観察したもの
(-) は鏡検 (28×) でも菌塊が発見出来なかつたもの

(2) PH は数種の PH 試験紙 (東洋濾紙製) を使用し決定した。又各 4 個の培地間には PH に差はなかつた

表3 原法培地と変法培地との比較

稀釈培養量		10×				100×				1,000×				10,000×				
		原法	發育	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	±	±	±	(出)	(出)	(出)
0.1cc	原法	PH	6.6				6.8				6.9				7.0			
	変法	發育	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	(出)	(出)	(出)	(出)
0.2cc	原法	PH	6.5				6.6				6.7				6.8			
	変法	發育	卅	卅	卅	卅	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
0.2cc	原法	PH	7.4				7.8				8.6				8.8			
	変法	PH	6.8				7.4				7.8				8.0			

表4 変法重層培地とアルブミン加培地との比較

患者名	日数	6日		8日		10日		12日		3週後		6週後	
		変	A	変	A	変	A	変	A	3%小川培地		3%小川培地	
IX		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅
VII		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	卅	卅
X		+	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
VI		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30''	59''

注 変：変法重層培地 A：アルブミン加重層培地
菌量の表示は表(12)の規定に従った

同じであり、1%では100×以上には菌の發育は見られなかつた。全般を通じて0.1cc培養の1%、2%の場合が發育良好であつた。PHの点では6.4~6.8の間にある培地が發育良好であつた。

b) 小川氏重層培地(12)と本報告の変法培地とを比較した結果は表3に示した。なお小川氏重層培地の下層は味の素を含む3%KH₂PO₄培地(22)を使用し、培地量は変法培地と同量とした。方法および菌量の表示法は前回と全く同様である。その結果両者間に大差はないが緩衝能力の点では変法培地がやや優れ、發育良好となる場合もあつた(0.1cc 1,000×, 0.2cc 10×の場合)。

c) アルブミン(Fraction V)加培地との比較；化学療法の奏効した場合、塗抹陽性なるも發育不良であり、とくに迅速法では菌陰性であつたが固型培地上では6週後に菌陽性となつた4株を選びアルブミン加培地と前述の1% KH₂PO₄を含む変法培地とを比較した。アルブミン加培地の下層は変法培地と同様であるが上液の処方

KH ₂ PO ₄	1.0g	} これに榮研製アルブミン (Fraction V)を10%の 割合に加う。
Na ₂ HPO ₄	0.3g	
アスパラギン	0.5g	
グリセリン	2.0cc	
蒸留水	100.0cc	

上記二種の培地および3%小川培地に菌培養後、一定期日に取り出しそれぞれ判定した結果は次の表4の通りである。

表の如くアルブミン(Fraction V)の添加はこれら諸菌株の發育を促進しなかつた。

3) 上液中の蛋白質濃度；重層培地では固形培地上に液体培地を重層するが、その際上液中に下層の凝固卵蛋白がどの程度滲出移行するかを時間の経過とともに追求した。培地の組成は前述の変法重層培地である。測定法はEisen氏法(23)(24)の応用で、分光光度計(島津製ベックマン型)を使用し、波長280m μ における上液の吸光度を測り、他方標準系列として全卵液を0.4% NaOHで透明化したものの吸光度より検量直線を作成し、それよりcalibration constant すなわち単位E当りの卵液濃度(換言すれば比吸光度 Specific extinction の逆数)を求め卵液濃度を算出した。また同時にズルホサリチル酸による

定性試験も併せ行つた(表5)。

表の如く製作後3時間後の上液中には全卵液0.59%に相当する蛋白を含んでいることが判る。またズルホサリチル酸試験も卅(稀釈乳様濁)となつた。

4) 上液中のPAS, INAH, SM濃度の推移；上液に加えられた薬剤が固型培地内にも滲透し所要濃度に迄低下するか否かを検討した。方法は測定に適した濃度の各薬液(PAS 100r×40/cc, INAH 10r×40/cc, SM 50r×40/cc) 0.1cc宛を小シャーレ内のマラヒットグリーンを除いた変法重層培地に加え、一定時間毎に各2箇宛の小シャーレより上液を採取し、その濃度をPASはKlyne et Newhouse氏法(25), INAHはKelly et Poet氏法(25), SMは鳥居氏法(27)により測定した。その濃度算出に要した各吸光度および阻止帯の長さの平均値ならびに求めた各濃度は表6, 7, 8にそれぞれ表示した。三薬剤ともに3時間後には大約所要濃度に達することを知つた。

5) 呈色試薬に関する実験；

呈色試薬として望ましいことは、試薬自体が安定した物質であること、いかなる微小コロニーでも發育途上にある限り鮮明に呈色させることであり、さらに出来得れば結核菌への阻止力も低いことである。

表5 上液中全卵液濃度の推移

標準全卵液		被 検 上 液			
全卵液濃度	吸光度(Es)	経過時間	吸光度(Ev)	卵液濃度(Cv)	ズルホ試験
0.1%	0.144	10分後	0.216	0.14%	±
0.2	0.313	60分	0.517	0.35	+
0.4	0.606	3時間	0.849	0.59	≡
0.6	0.862	6時間	0.860	0.60	≡
0.8	1.125	24時間	1.080	0.76	≡

- 注 1) Ev は蒸留水を blank とし上液中の諸成分およびマラヒットグリーンによる吸光度(平均 0.16)を差引き補正したもの
 2) Es は 0.4% NaOH を blank とした。また蒸留水と 0.4% NaOH との間には吸光度に差なし
 3) 計算法 $Cv = Ev \times 0.7$ (K, calibration constant)

表6 上液中 PAS 濃度の推移

標準 PAS 液		被 検 上 液			
濃 度	吸光度(Es)	経過時間	吸光度(Ep)	濃 度(Cp)	
140γ/cc	0.985	10分後	0.965	135γ/cc	
120	0.850	1時間	0.847	118	
100	0.735	3時間	0.760	103	
80	0.562	24時間	0.702	101	

- 注 1) $\lambda = 440m\mu$, 所要原試料 0.5cc
 2) Es は蒸留水を同様に処理して得た reagent blank を差引いた補正值 Ep は上液を同様に処理して得た biologic blank を差引いた補正值
 3) 計算法; $Cp = Ep \times 140$ (calibration constant)

表7 上液中 INAH 濃度の推移

標準 INAH 液		被 検 上 液			
濃 度	吸 光 度 (Es)	経過時間	吸 光 度 (Ei)	濃 度 (Ci)	
14γ/cc	0.536	10分後	0.489	13.2γ/cc	
12	0.443	1時間	0.439	11.8	
10	0.360	3時間	0.385	10.4	
8	0.291	24時間	0.362	9.8	

- 注 1) $\lambda = 450m\mu$, 所要原試料は共に 1.0cc
 2) 標準液は被検上液と同成分の上液中に INAH を加えて作った
 3) Es, Ei は加えた INAH 液によるそれぞれの稀釈度に応じた biologic blank を差引いた補正值である
 4) $Ci = Ei \times 27.1$ (calibration constant)

a) 試用した呈色試薬の性状と結核菌塊の呈色は表(9)に示した。本表は同一患者喀痰の NaOH 10 倍処理液の 0.1cc 宛を小シヤール 14 箇に 10 日間培養し、その後

各小シヤール 2 箇宛に各試薬を駒込ピペットで 2 滴宛加えた実験を中心とした。

これらの中溶液の安定度も高く著明な呈色を示すのは亜テルル酸カリおよびソーダであった。

b) $H_{37}RV$ 菌液の $10^{-2}mg/cc$, $10^{-4}mg/cc$, $10^{-6}mg/cc$ を 0.1cc 宛各 6 本の 3%, 小川培地斜面上に 10 日間培養し、肉眼にてまず発育コロニーを算え、その後 0.5% 亜テルル酸ソーダ 0.3 cc, 0.2% T.T.C. (塩化トリフェニールテトラゾリウムの略称) 0.3 cc 宛を各培地上に滴下

し $37^{\circ}C$ にて 24 時間斜面台上に放置した後、再び肉眼にて発見出来るコロニー数を計算し微小コロニーに対する呈色力の強さ、したがって呈色操作によるコロニー発見数の増加を両薬剤について比較検討した(表10)。

表の如く亜テルル酸ソーダが T.T.C. に優ることを認めた。

C) 0.1% 寒天加小川氏重層培地により呈色試薬の結核菌の阻止力を検討した結果は表 11 の如くである。菌量は $H_{37}RV$ の $0.1 mg/cc$ の 0.1cc を培養、期間は 3 週間、対称とした薬剤は加熱の影響を除くため、すべてザイツ濾過滅菌によつた。

表の如く Neo Tetrazolium が最も阻止力低く亜テルル酸ソーダと T.T.C. との間には大差はない。

検査成績

(1)成績の記載法; 前述の変法培地は上液中に寒天を含ませたため、コロニーは僅かな震動によつても自由に移動し集合して綿毛状の菌塊を作つて来る(図2)。故に対照に発育した菌量の表示には次の基準を定めた。すなわち発育菌塊の大きさが合計はば $1mm$ 以内を+, $1 \sim 3mm^2$ を≡, $3mm^2$ 以上 $5mm^2$ 以内を≡, $5mm^2$ 以上を≡とした。

抵抗性の表現には対照をその実際上の発育菌量にはかわりなく常に≡で表わし、抗結核剤含有培地の発育菌量の表現には常に対照と比較的に表示する。すなわち対照と同程度に発育した場合が≡, $1/4$ 程度を≡, $1/2$ 程度を≡, $3/4$ 程度およびそれ以下を+とするのである。例えば図3, 4, の場合は次の如くなる。したがつて SM は SM: 100r/cc ≡, 10r/cc ≡, 1r/cc ≡, 対照 ≡ INAH: 5r/cc(+), 1r/cc ≡, 0.1r/cc ≡(対照菌量≡)

表8 上液中 SM 濃度の推移

標準 SM 液		被 検 上 液		
濃 度	阻 止 帯	経過時間	阻 止 帯	濃 度
70Y/cc	5.57mm	10分後	5.45	65.5Y/cc
60	5.27	1時間	5.27	60
50	5.10	3時間	5.16	54
40	4.87	24時間	4.88	40

- 注 1) 標準 SM 液は被検上液と同成分の上液中に SM を加え作製した
 2) 阻止帯の長さは各検体につき 3 本宛行つた場合の平均値である

表9 各呈色試薬の性状

種 類	蒸留水への溶解性	熱光への安定性	使用濃度	呈色迄の時間	色調
亜テレル酸ソーダ	易 溶	安 定	0.5%	12~24	黒
亜テレル酸カリ	易 溶	安 定	0.5	12~24	黒
亜セレン酸ソーダ	易 溶	安 定	0.5	12~24	赤
テレル酸カリ	難 溶	安 定	0.5	呈色せず	呈色せず
塩化トリフェニールテトラゾリウム	易 溶	不安定	0.2	2~4	紅
ネオテトラゾリウム	難 溶	稍不安定	0.075	24~48	紫

- 注 テレル酸カリは 0.5% には溶解せず、用に臨み振盪して用いた。

表10 呈色によるコロニー発見数の増加

mg/cc	前コロニー数						
	60	29	50	27	22	44	
10 ⁻³	後	亜テレル	131	132	241		
	T. T. C.				75	54	96
10 ⁻⁴	前コロニー数	1	1	(-)	1	1	1
	後	亜テレル	8	7	7		
	T. T. C.				1	2	2
10 ⁻⁵	前コロニー数	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	後	亜テレル	(-)	(-)	(-)		
	T. T. C.				(-)	(-)	(-)

100r/cc まで完全耐性, INAH は 1r/cc まで完全耐性であり, 実際の対照発育菌量は 冊であることが一目で判る。

2) 培養成績殊に 3% 小川培地による標準法との比較
 現在迄に 53 例につき比較実験を行った。その内喀痰 44 例, 胃液 2 例, 膿胸膿 3 例, 間接法としての菌液 3 例であった。これらの中迅速法で判定出来たのは 37 例, 迅速法で菌陰性, 標準法で菌陽性であったのは 10 例,

表11 呈色試薬の阻止力

	50Y/cc	40	30	20	10	K
Neo Tetrazolium	冊	冊	冊	冊	冊	冊
T. T. C.	(←)	(←)	(←)	冊	冊	冊
亜テレル酸ソーダ	(←)	(←)	(←)	冊	冊	冊

注 対照培地の発育菌量を 冊とし他を比較表示した
 両方共に菌陰性であったのは 4 例であった。雑菌による判定不能例は 2 例で, その中 1 例は小川斜面にも雑菌が生じた。標準法にのみ陽性例は発育不良菌株および菌量 50 コロニー以下の場合に見られた。迅速法で判定し得た 37 例につきその成績を標準法 (標準法の耐性表現法も迅速法に準じた) と比較したのが表 12 である。表の如く SM, PAS, INAH 各例数の総計は 71 件で, 最高発育濃度については 50 件 (70%) にて一致し, 完全耐性度については 67 件 (94.4%) にて一致した。耐性不一致例では PAS, SM の場合には迅速法の方が耐性が低く出ている。

考 察

本法は肉眼判定を主目的とし, 一応その目的を達した故, 在来の方法に比し一つの進歩を示したものと思う。本法は上液に血清, 寒天等を加えないため雑菌の混入がすくないが, さらに菌塊が粘稠度の低い上液内にて自由に移動出来るので各微小コロニーが集合してさらに大きな菌塊を形成して来る。この点が特に肉眼判定上便利である。本法でアスパラギンの代りにグルタミン酸ソーダを使用したのは Middlebrook(28)等の説と表 3 の結果からである。迅速法の最大の障害は化学療法の奏効により発育が遅延し, しかもガフキー号数に比し発育菌量の極めてすくない喀痰であり, このような菌株に対し確実な発育促進法がないのは残念である。ただし小川(辰)(19)氏の焦性葡萄糖については経験がない。アルブミン(Fraktion V) も表 4 の如く促進作用は明らかでない。上液内の KH₂PO₄ 量を 3% とした場合に 0.1cc 培養ではかえつて発育が阻害されたことは Frouin(29)等の言う K 量の過剰に実験培地も違うので考え難く, 0.2cc 培養では他と差がないので, むしろ PH の低きに過ぎるためと思われる。また表 2, 3, の結果から PH は 6.4~6.8 の間が好適であり, 培地中のアミノ酸量のみならず NaOH 処理液中の喀痰蛋白質質量までが培養後の培地の PH に深く関係しているらしいことを知った。

本法の欠点は発色に使う亜テレル酸ソーダおよびカリ

表12 標準法と迅速法との成績比較

例	G	対菌 照量	対照	S M			PAS			INAH		
				1	10	100	1	10	100	0.1	1	5
■	VI	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VI	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	II	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	X	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	-	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VIII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	V	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	120°	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VI	F	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	51°	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	II	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VI	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VIII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	II	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	IX	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VI	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	問	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■	問	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VII	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
■	VI	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
H ₁₇ RV	問	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

注 F: 迅速法 問: 間接法(菌液)
S: 標準法(SMはDihydro SMを所要量の2倍加えた)

の結核菌への阻止力が強いので、それを滴下した後は菌がもはやほとんど発育しない点である。もつともこの点は他の迅速法も一旦染色すればそれまでとなるので同じだとも云える。ネオテトラゾリウムは表11の如く阻止力のすくない点は好いが発色が遅くしかも淡い。この点亜テル酸塩は滴下量が1滴でもあるいは2滴でも呈色力に大差なく常に安定した発色を示す点が実用である。しかし今後テトラゾリウム系薬剤がさらに改良され呈色力が強くなり、予め培地内に加えられるようになることを希望している。

検査成績では本法は普通法より耐性が低く出る傾向があり(ことにPAS, SMの場合)、この点従来の迅速法と逆の関係にある。すなわち本法では肉眼ならびにルーペにより判定しているためである。しかし完全耐性域に関しては標準法と非常に好く一致している。本法は重層培地を使用するので下の固形層中の1~2割は固形分の管であり薬剤が完全に滲透するとは考えられないが事実はかなり好く滲透し(表6, 7, 8)3時間ではほぼ所要濃度に迄低下している。また培養時少し高い濃度を有していたとしても4% NaOH 0.1ccによりさらに稀釈せられるから差支えない。

本報告では小シャーレを4つ中シャーレ内に組合せて培養器具としたが小シャーレのやや高価な点が欠点である。

本法では10日間培養で判定しているが、これはMeyer et Galland(17)の報告を参考にし経験的に定めたに過ぎないので今後さらに検討したいと思う。

結 語

次のような特徴を有し臨床的に応用し得る迅速耐性検査法を考案した。

- 1) 培養器具はシャーレを用うる。
- 2) 培地は小川氏重層培地の変法である。
- 3) 培養10日後に亜テル酸ソーダまたはカリを滴下して菌塊を黒変させる。
- 4) 判定は肉眼およびルーペで行う。

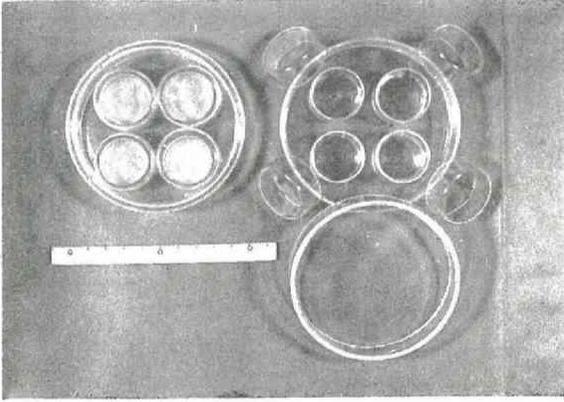
本報告の一部は昭和 30 年 2 月関東地方学会で発表した。また附図の写真は当所研究室二村久技官の撮影による。

文 献

- 1) Cummings, M.M. and Livings D. G.: Am. Rev. Tbc. 70, 637 (1954)
- 2) 河盛勇造他: 結核, 25, 438 (昭 25)
- 3) 藤村義男: 日結, 10, 17 (昭 26)
- 4) 弘末元勇: 結核, 26, 480 (昭 26)
- 5) Berry, J. W. and Lowry, H.: Am. Rev. Tbc., 60, 51 (1949)
- 6) 小沢 敦他: 結核, 30, 14 (昭 30)
- 7) 植田三郎他: 日結, 11, 122 (昭 27)
- 8) 小川政敏他: 日結, 12, 81 (昭 28)
- 9) 馬場治賢他: 最新医学, 9, 44 (昭 29)
- 10) Hoffmann, P. und Nickel, L.: Beitr. Kl. Tbk., 112, 191 (1954)
- 11) 小川辰次他: 日結, 13, 119 (昭 29)
- 12) 近藤享他: 結核の臨床, I, 61 (昭 29)
- 13) Belfanti Drea and Andrejew, The Metabolism of the Tubercle Bacillus(1954 版)
- 14) Corper } p. 224より引用
- 15) Šula, L.: Am. Rev. Tbc., 56, 241 (1947)
- 16) Meyer, A. et galland, R.: Presse Méd. 60, 841 (1952)
- 17) 辰戸昌夫他: 結核の臨床 I, 58 (昭 29)
- 18) 小川辰次: 臨床病理, 2, 363 (昭 29)
- 19) Mudd, S., et al: J. Bact. 62, 459 (1951)
- 20) Winterscheid, C. L. et al: Am. Rev. Tbc., 68, 625 (1953)
- 21) The laboratory subcommittee of the tuberculosis chemotherapy trials committee, medical research council, Lancet, 265, 213 (1953)
- 22) 小川辰次著: 結核菌検査の基礎と応用 (昭 26) P. 123
- 23) Haurowitz 著: 生物物理化学の領域における蛋白(1950) P.14 (日本版)
- 24) Eisen, E. J. Immunol. 60, 77(1948)
- 25) Klyne, W. and Newhouse, D.J.: Lancet, No. 6529, 611 (1948)
- 26) Kelly, J.M. and Poet, R.B.: Am. Rev. Tbc., 65, 484 (1952)
- 27) 鳥居敏雄: 臨牀, 2, 562 (昭 24)
- 28) Middlebrook, G, et al: Am. Rev. Tbc. 70, 852 (1954)
- 29) Frouin, A., et Guillaumie, M.: Ann. Inst. Past., 42, 667 (1928)

附 図

第1図



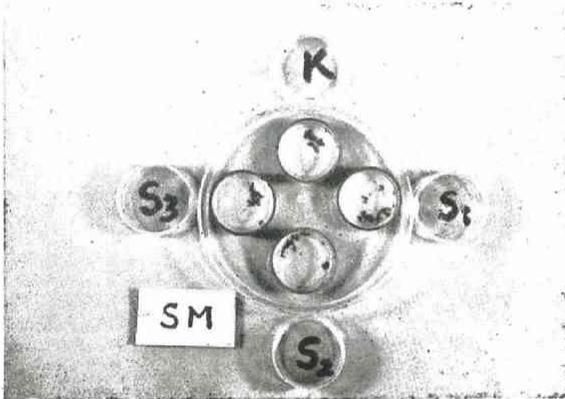
培養器具；右は全部の蓋を開いた処，左は培地を入れ
出来上つた状態（単位 cm）

第2図



培養 10 日後亜テール酸ソーダで呈色させた菌塊の弱
拡大顕微鏡写真（28×）

第3図



培養 10 日後，呈色後の所見，

K：対照 S₃：SM 1γ/cc, S₂：SM 10γ/cc
S₁：SM 100γ/cc

第4図

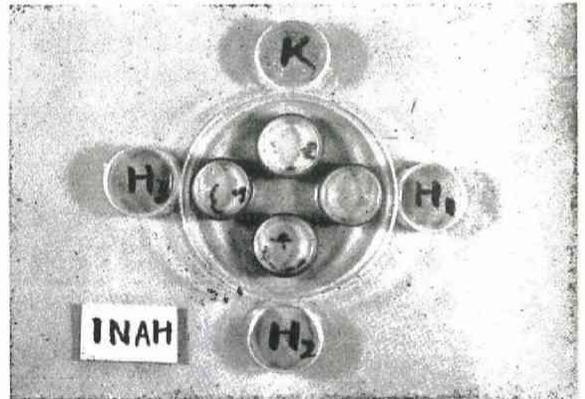


図3と同じ例

K：対照 H₃：INAH 0.1γ/cc, H₂：INAH 1γ/cc,
H₁：INAH 5γ/cc