

寒天平板による結核菌の迅速耐性検査法

第2報 迅速法と普通法の比較

齊 藤 直 蔵

北里研究所附属病院 (指導 小川辰次部長)

受付 昭和34年3月31日

I 結 言

さきに第1報¹⁾で種々基礎実験の結果、寒天平板に喀痰あるいは菌液を接種し1週間培養後、平板の裏から培地をとおして弱拡大で鏡検して、培地表面に發育してきた顕微鏡的集落(コード)が判定できることを報告したが、この方法を抗結核剤の迅速耐性検査法に応用して直接法および間接法について普通法と比較実験した結果、ほぼその目的を達したと思われるので報告する。

II 実験方法

1. 対象

イ) 喀痰

SM, PAS, INH, KM, PZA等の化学療法中の入院患者のものを用い、広口砲弾型の滅菌スピッツグラスに早朝採取した。抗結核剤の投与は検査1日前から中止した。検査総数193例でそのうち塗抹陰性は15例で、他はすべて塗抹陽性の材料を使用した。

ロ) 菌株

入院患者の喀痰あるいは胃液より3%小川培地あるいは変法Ⅲキルヒナー寒天培地に分離した57例の新鮮分離菌株を用いた。

2. 使用培地

イ) 変法Ⅲキルヒナー寒天培地(小川ら²⁾³⁾)

この培地は本来カナマイシンの直接耐性検査用に考案されたもので性能はほぼ3%小川培地に匹敵するものである。斜面として用いるときは寒天の混入濃度は2%であるが、迅速法に使う平板では1.5%とした。この変法Ⅲキルヒナー寒天培地(以下変法Ⅲ培地と略)は前処理した喀痰を接種する直接法に用いた。

処方および作り方

第一磷酸カリウム (KH_2PO_4)	1.0 g
第二磷酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.3 g
硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.06 g
クエン酸ナトリウム ($\text{Sod. citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
アスパラギン (l-Asparagin)	0.5 g
グリセリン	1.5 cc
0.1% マラカイト緑液	0.25 cc

Bacto-agar (Difco)	1.5 g
蒸溜水	100.0 cc

以上を溶解し、コック釜で2時間滅菌し、50~60°Cに冷えたところで馬血清を10%の割に加え2.5cc宛4分面シャーレ(Felsen Plate⁴⁾⁵⁾ 図1参照)の1区面に分注する。抗結核剤は無菌的に蒸溜水でとがしてあらかじめ調製しておき、原液滅菌後血清を加える前に所要量を加えた。4分面シャーレの3区画には、それぞれSM(10γ/ccあるいは2.5γ/cc), PAS(10γ/ccあるいは1γ/cc), INH(5γ/ccあるいは1γ/cc, 10γ/cc)の濃度のものを含ませ、他の1区画は薬を含まない対照とした。

ロ) キルヒナー寒天培地⁶⁾

これはイ)の変法Ⅲ培地の第一磷酸カリウムの量が0.4gと変るだけである。グリセリンが1.5cc、マラカイト緑が混入されていることは原法と異なる。この培地を4分面シャーレに分注してイ)と同様、1区画は対照とし他の3区画にはSM, PAS, INHを混入して菌液を接種する間接法に使った。

ハ) 1%⁷⁾および3%小川培地⁸⁾

かたのごとく作り、1%小川培地はキルヒナー寒天培地による迅速法の間接法、3%小川培地は変法Ⅲ培地による迅速法の直接法におけるそれぞれの普通法の対照培地として5cc宛分注して斜面として使用した。薬剤は平沢⁹⁾にしたがい、あらかじめ無菌的に所定量の50倍量のものを作っておき0.1cc流しこみ、SM(10γ/ccあるいは2.5γ/cc), PAS(10γ/ccあるいは1γ/cc), INH(5γ/ccあるいは1γ/cc, 10γ/cc)をそれぞれ混入し、一晚孵卵器にねかせて耐性検査用の培地とし、別に薬剤の混入しない培地を1本対照とし合計4本の培地を使用した。

3. 接種法

イ) 直接法

a) 迅速法(変法Ⅲ培地)

塗抹陽性の喀痰では4%NaOHを約5~10倍量加え、塗抹陰性の場合には8%NaOHを喀痰と等量加え、試験管を振盪して十分に均等化する。次にこの処理液1ccに滅菌蒸溜水3ccを加え(すなわち4倍に稀

積される), その 0.2 cc 宛を 4 分画シャーレの 1 区面に接種する。シャーレを手で動かして, 平板全面にうるおようにしたのち, そのまま水平におき孵卵器に放置, 1~2 日後培地表面が乾いたらポリエチレンの袋¹⁰⁾ 11) に数枚 1 組にして入れゴムバンドで入口を閉じ, シャーレを逆さにおき培養を続ける。7 日後袋より出し, コードを鏡検判定, その後はまた袋に入れゴムバンドで閉じ 5 週まで培養を続け肉眼的に集落を数えた。孵卵器中の培地保存は, シャーレを標本瓶中に入れる方法も試みたが, ポリエチレンの袋を主として用いた。

b) 普通法 (3% 小川培地)

迅速法で用いた 4% NaOH 処理の喀痰の 0.1 cc 宛を 1 本の培地に接種し, 一晚孵卵器にねかせ翌日ゴム帽にかえ立てて 5 週まで観察した。

ロ) 間接法

a) 迅速法 (キルヒナー寒天培地)

菌液は水冷下磨砕コルベンによる手振り法により, 蒸溜水で 0.1 mg/cc のものを作り, その 0.2 cc 宛を 4 分画シャーレの 1 区面に接種する。その後は直接法と同様であるが, この実験ではシャーレは 7 日までそのまま孵卵器に放置, 迅速判定後ポリエチレンの袋に入れ 5 週まで培養を続けた。

b) 普通法 (1% 小川培地)

迅速法で用いた菌液を 10 倍に稀釈し, 厚生省の検査指

針¹²⁾ とおり 0.01 mg の菌液を 0.1 cc 宛接種した。接種後, 一晚孵卵器にねかせ, 翌日ゴム帽にかえ立てて 5 週まで培養を続けた。

4. 判定法

イ) 迅速法

7 日目に寒天平板を裏がえしに置き平板をとおして弱拡大 (50 倍) 乾燥系で鏡検し, 培地表面に发育してきた顕微鏡的集落 (コード, 図 2 参照) をみて判定し, コード数の表示は +~≡ と第 1 報に示したようであるが, 10 視野以上みて平均して, 抗結核剤の混入した培地に対照と同一程度に发育したときは完全耐性とし, 1 段階以上の差のあるときは不完全耐性とした。また抗結核剤の混入した培地に发育せず対照培地だけにのみ发育したときは感受性とした。なお対照の集落が全視野を合計して 10 コ以下の少数のときは, 抗結核剤の混入された培地にもほぼ同数以上の集落が認められるときは完全耐性としたが, 抗結核剤の混入された培地の方に陰性のときは判定不能として一応除去した。

ロ) 普通法

寒天平板および小川培地とも 4~5 週で判定し, +~≡ の集落数の表示は第 1 報に示したとおりであるが抗結核剤の混入した培地に対照と同一程度に集落の发育を示したときは完全耐性とし, 1 段階以上の差があるときは不完全耐性とした。また対照培地だけにのみ发育したときは感受性とした。

III 実験成績

A. 迅速法と小川培地による普通法との比較

1. 直接法

193 例の喀痰で, 前述した方法で変法Ⅲ培地の寒天平板と 3% 小川培地に接種し, 寒天平板 7 日目の耐性値と 3% 小川培地 5 週の耐性値を比較した。薬剤の組合せは SM 10 γ, PAS 10 γ, INH 5 γ のものが 143 例, SM 10 γ, PAS 10 γ, INH 10 γ の組合せが 22 例, SM 2.5 γ, PAS 1 γ, INH 1 γ の組合せで検査したものが 28 例である。総数 193 例中, 迅速法で陰性だったもの 21 例と, コード数少なく耐性値の判定困難のもの 19 例, その他雑菌混入のものを除去して比較した。

完全耐性, 不完全耐性, 感受性に分けた場合は表 1 のように, SM 149 例中 104 例 (70%), PAS 143 例中 114 例 (80%), INH 141 例中 107 例 (76%) で一致し, 完全, 不完全耐性を一つにして耐性と感受性に分けた場合は SM 122 例 (82%), PAS 127 例 (89%), INH 117 例 (83%) において一致した。

次に耐性値の相関関係をみると, 表 2 のように SM では迅速法の方が普通法の 3% 小川培地に比べて低い耐性を示す傾向がみられた。PAS, INH では一見

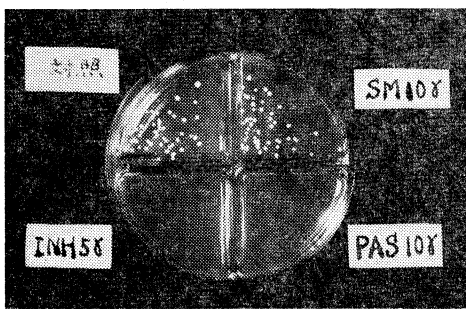


図 1 4 週の内眼的集落を示す (Gaffky II 号の喀痰)。この例では菌数少ないため迅速法では陰性であった。

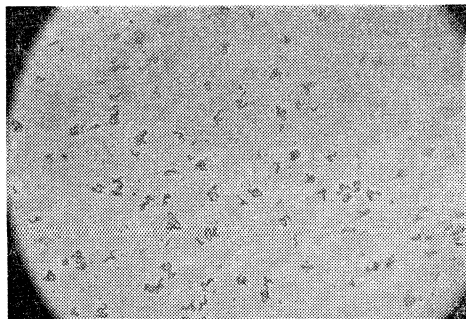


図 2 50 倍 7 日で鏡検した INH 5 γ/cc 含有寒天平板上の顕微鏡的集落 (Gaffky VII 号の喀痰)

表 1 迅速法と普通法（小川培地）との耐性値の一致率

方法	抗結核剤の種類とその混入量		検査例数	一致した例数（一致率）	
				完全，不完全耐性および感受性に分けたとき	耐性と感受性に分けたとき
直接法	S M	2.5 γ, 10 γ	149	104 (70%)	122 (82%)
	P A S	1 γ, 10 γ	143	114 (80%)	127 (89%)
	I N H	1 γ, 5 γ, 10 γ	141	107 (76%)	117 (83%)
間接法	S M	10 γ	57	43 (75%)	47 (83%)
	P A S	10 γ	57	43 (75%)	51 (90%)
	I N H	5 γ	57	44 (77%)	44 (77%)

表 2 迅速法と普通法の耐性値の相関関係（直接法）

	迅速法 普通法	迅速法			計
		完全耐性	不完全耐性	感受性	
S M 2.5γ 21例 10γ 128例	完全耐性	82	17	6	105
	不完全耐性	1	12	21	34
	感受性			10	10
	計	83	29	37	149
P A S 1γ 18例 10γ 125例	完全耐性	21	3	1	25
	不完全耐性	10	69	14	93
	感受性		1	24	25
	計	31	73	39	143
I N H 1γ 20例 5γ 101例 10γ 20例	完全耐性	27	4		31
	不完全耐性	6	37	21	64
	感受性		3	43	46
	計	33	44	64	141

注： 1) 普通法は 3% 小川培地 5 週の成績である
 2) 二重欄中の数字は完全に一致した例数を示す

表 3 迅速法と普通法の耐性値の相関関係（間接法）

	迅速法 普通法	迅速法			計
		完全耐性	不完全耐性	感受性	
S M 10 γ	完全耐性	17	3	1	21
	不完全耐性	1	10	8	19
	感受性		1	16	17
	計	18	14	25	57
P A S 10 γ	完全耐性	3			3
	不完全耐性	8	24	3	35
	感受性		3	16	19
	計	11	27	19	57
I N H 5 γ	完全耐性	0			0
	不完全耐性		8	10	18
	感受性		3	36	39
	計	0	11	46	57

注： 1) 普通法は 1% 小川培地 5 週の成績である
 2) 二重欄中の数字は完全に一致した例数を示す

一定の傾向はないようにみえるが，完全，不完全耐性を一つにすると迅速法の方がやはり耐性値が低くなる傾向がある。

2. 間接法

前述した方法により 57 例の菌株を用い迅速法 7 日目の耐性値と普通法の 1% 小川培地 4~5 週の耐性値を比較した。抗結核剤の組合せは S M 10 γ, P A S 10 γ, I N H 5 γ で検査した。成績は表 1 のように、

表4 同一寒天平板の迅速法と普通法の耐性値の一致率

方法	抗結核剤の種類とその混入量		検査例数	一致した例数(一致率)	
				完全, 不完全耐性および感受性に分けたとき	耐性と感受性に分けたとき
直接法	S M	10 γ	84	72 (86%)	78 (93%)
	P A S	10 γ	82	70 (85%)	74 (90%)
	I N H	5 γ	89	70 (79%)	76 (85%)
間接法	S M	10 γ	57	44 (77%)	47 (83%)
	P A S	10 γ	57	50 (87%)	53 (93%)
	I N H	5 γ	57	38 (67%)	39 (68%)

表5 同一寒天平板の迅速法と普通法の耐性値の相関関係(直接法)

	迅速法 普通法	迅速法			計
		完全耐性	不完全耐性	感受性	
S M 10 γ	完全耐性	47	5		52
	不完全耐性	1	9	5	15
	感受性		1	16	17
	計	48	15	21	84
P A S 10 γ	完全耐性	18	4		22
	不完全耐性		36	5	41
	感受性		3	16	19
	計	18	43	21	82
I N H 5 γ	完全耐性	13	4		17
	不完全耐性	2	25	13	40
	感受性			32	32
	計	15	29	45	89

注: 二重欄中の数字は完全に一致した例数を示す

完全耐性, 不完全耐性, 感受性に分けると S M 43 例 (75%), P A S 43 例 (75%), I N H 44 例 (77%) で一致し, 完全, 不完全耐性をつにして耐性と感受性とに分けると S M 47 例 (83%), P A S 51 例

表6 同一寒天平板の迅速法と普通法の耐性値の相関関係(間接法)

	迅速法 普通法	迅速法			計
		完全耐性	不完全耐性	感受性	
S M 10 γ	完全耐性	19	3		22
	不完全耐性		9	9	18
	感受性		1	16	17
	計	19	13	25	57
P A S 10 γ	完全耐性	10	2		12
	不完全耐性	1	24	3	28
	感受性		1	16	17
	計	11	27	19	57
I N H 5 γ	完全耐性	0	1		1
	不完全耐性		6	14	20
	感受性		4	32	36
	計	0	11	46	57

注: 二重欄中の数字は完全に一致した例数を示す

(90%), I N H 44 例 (77%) において一致した。次に耐性値の相関関係をみると表3のように, S M では迅速法の方が耐性値が低くなる傾向がみられたが, P A S では迅速法が高く, I N H では迅速法が低くて

のような傾向を認めた。

B. 同一寒天平板の迅速法の耐性値と普通法の耐性値の一致率

同じ寒天平板で迅速法 7 日目の耐性値と、5 週後普通法で肉眼的集落を判定したときの耐性値を比較してみると、成績は次のようである。

1. 直接法

表 4 のように完全耐性、不完全耐性、感受性と分けて一致率を調べてみると SM 84 例中 72 例 (86 %), PAS 82 例中 70 例 (85 %), INH 89 例中 70 例 (79 %) に一致し、また完全、不完全耐性を一つにして耐性と感受性とに分けて一致率を調べてみると、SM 84 例中 78 例 (93 %), PAS 82 例中 74 例 (90%), INH では 89 例中 76 例 (85 %) において一致した。次にこの場合の迅速法と普通法の耐性値の相関関係を調べてみると表 5 のようであり、SM, PAS, INH とも迅速法の方が普通法に比べて耐性値が低くなる傾向がみられた。

2. 間接法

直接法の場合と同様にして 57 例で比較してみると、表 4 のように完全耐性、不完全耐性、感受性に分けた場合は SM 44 例 (77 %), PAS 50 例 (87 %), INH 38 例 (67 %) において一致し、また完全、不完全耐性を一つにして耐性と感受性に分けた場合は SM 47 例 (83 %), PAS 53 例 (93 %), INH 39 例 (68 %) において一致した。

次に耐性値の相関関係をみると表 6 のように SM, PAS, INH とも迅速法の方が低い傾向がみられる。

IV 総括および考案

この迅速法は結核菌が抗結核剤に対して耐性になっているかどうかを 1 週間前後で判定し、的確な抗結核剤の使用をしようというのであるが、SM, PAS, INH についてこの迅速法と小川培地による普通法の耐性値を比較したところ、抗結核剤の如何にかかわらず、また直接法、間接法の如何にかかわらず、完全、不完全耐性および感受性と分けたときは 70~80 %、耐性と感受性に分けてみると 80~90 % 前後一致するのを見た。また寒天平板を迅速法でみて、さらに普通法でみた場合は、間接法の INH 以外ではさらにその一致率がよかつた。

したがってその目的はほぼ達したといえることができる。これは従来の種々の迅速法^{15)~20)}に比べても一致率は遜色を認めない。

不一致の例をみると、まず小川培地による普通法との比較では、直接法たると間接法たるとを問わず SM では迅速法が低くなる傾向がある。PAS, INH では SM ほどはつきりした傾向はないが、直接法では感受性と耐性とだけに分けてみると迅速法の方が低い傾向を

認める。間接法では PAS は全く同じであるが、INH ではやはり迅速法の方が低い。この不一致は、迅速法に用いた寒天培地と普通法に用いた鶏卵培地との違いや、1 週間で認める耐性結核菌の顕微鏡的集落と 4~5 週後に認める肉眼的集落の発育が必ずしも平行しないことや、その他の技術的の誤差の総和と思われる。次に同一平板を迅速法で判定しさらに普通法で判定した場合の不一致は、直接法でも間接法でも SM, PAS, INH ともに迅速法は低い耐性値を示す傾向にある。この場合は培地による差はないのであるが、その他は前者の場合と同様に考えてよいであろう。

なお全体を通じてみると普通法で完全あるいは不完全の耐性と判定されたものの一部が、迅速法では感受性と判定されるものがある。このことは前述の理由で説明されるが、さらにほり下げて考えてみると耐性結核菌の顕微鏡的集落の発育が感性菌に比べておくれることを意味するのであるが、この現象は本迅速法の一つの欠点と思われる。またその反対に迅速法で不完全耐性と判定されたものの中に、普通法で感受性と判定されるものがある。これは前者に比べてその数は少ないが、この事実は一部見落としによるものもあると思われるが、肉眼的集落にならないで顕微鏡的集落だけで消失するものがあるためでなかろうか。

この迅速法は、前報の基礎実験で述べたように、菌数の少ないときは検出できないので直接法では塗抹陽性のものか、あるいは塗抹陰性であっても培養で集落が多く迅速法で検出できると推定されるものに限定した方がよいが、普通法に切りかえることができるから、この点からいえば無選択に実施することができる。

なお一応 7 日で判定したが、集落の発育のよいものは 5 日でもよいであろうし、発育のおくれるものは 10 日で判定してもよい。この方法はさらに Pyrazinamide および Kanamycin について実験したが、Pyrazinamide は予想通り不成功に終わったが、Kanamycin においてはこの方法が使用できることを認めた。なお、その他の抗結核剤についてもこの迅速法は使用できそうと思われる。このようにしてみると、この迅速法は多少の欠点を含んでいるがこの欠点は将来さらに改良することとして従来の方法に比べて普通法との一致率においては遜色がない。手技の点でも塗抹、染色のような面倒さを省けるし雑菌の侵入も少ない。また迅速法で不成功であったとしても普通法に切りかえることができる (図 1 参照)。したがって従来の方法に比べてさらに一步を進めたものといえるだろう。なおこの方法と他の迅速法との比較を実施したがその成績は次報で発表する積りである。

V 結 論

1) 1 枚の Felsen の 4 分面シャーレに変法 III キルヒ

ナー寒天培地を 2.5 cc 宛分注し、1 区画は薬を含まない対照、他の 3 区画は SM 10 γ /cc, PAS 10 γ /cc, INH 5 γ /cc を含ませ、前処理した喀痰を接種、培地表面のほぼ乾いた 1~2 日後に、ポリエチレンの袋に逆さに入れ培養を続け、7 日後袋よりとり出し平板の裏から 50 倍の弱拡大で培地表面に発育した顕微鏡的集落(コード)をみて迅速に耐性が判定できる。迅速判定後もまた袋に戻し培養を継続すれば 4~5 週後普通法でも判定できる。菌液の場合はキルヒナー寒天培地を用い同様に迅速判定できる。

2) 直接法および間接法で、この寒天平板による迅速法と小川培地による普通法との耐性値を比較してみると、完全耐性、不完全耐性、感受性に分けたときは S M, P A S, I N H とも 70~80% に一致した。また完全、不完全耐性を一つにして、耐性と感受性に分けると 80~90% において一致した。

3) 同一寒天平板の迅速法の耐性値と普通法の耐性値を比較すると、直接法および間接法で、完全耐性、不完全耐性、感受性に分けたときは約 80%, 完全、不完全耐性を一つにして耐性と感受性に分けると約 85~90% において一致した。なお間接法 I N H の場合はやや低く 70% の一致率であった。

終りに臨み、御指導、御校閲を賜わった慶大石田二郎教授および終始御指導、御教示を賜わった小川辰次部長に深甚の謝意を表します。

なお本論文の要旨の一部は昭和 34 年 4 月、第 34 回

日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 齊藤：結核, 34: 574, 昭34.
- 2) 小川・沢井・島田：結核, 33: 749, 昭33.
- 3) 小川・沢井・島田：結核, 33: 807, 昭33.
- 4) Felsen: Amer. J. Clini. Patho., 19: 289, 1949.
- 5) Felsen: Arch. Int. Med., 88: 406, 1951.
- 6) 小川：結核菌検索の基礎と応用, 71, 昭26より引用.
- 7) 小川・佐波：結核, 24: 45, 昭24.
- 8) 小川・佐波・鈴木：結核, 25: 403, 昭25.
- 9) 平沢：結核, 30: 199, 昭30.
- 10) Middlebrook et al.: Amer. Rev. Tuberc., 70: 852, 1954.
- 11) 小川(政)：臨床病理, 4: 341, 昭31.
- 12) 厚生省：衛生検査指針, 細菌血清学的検査指針(IV) 改訂, 20, 昭31.
- 13) 河盛・堀本・弘末：臨床, 4: 395, 昭26.
- 14) Pierce et al.: Amer. Rev. Tuberc., 75: 331, 1957.
- 15) 山本：京大結研紀要, 3: 57, 昭29.
- 16) 小川(政)：日結, 12: 81, 昭28.
- 17) 馬場・二村・齊藤：最新医学, 9: 190, 昭29.
- 18) 小川・長田・小関：結核, 31: 302, 昭31.
- 19) 河合：結核, 30: 621, 昭30.
- 20) 高橋：日本細菌学雑誌, 12: 669, 昭32.