

血清中 INH 濃度の微生物学的定量における判定法についての一考案

— 沈渣判定法について —

山 本 善 信*
坂 本 保 雄**

* 兵庫県立病院柏原荘院長

** 兵庫県立病院柏原荘技術吏員

受付 昭和 35 年 10 月 22 日

緒 言

血清中 INH 濃度の微生物学的定量には Mandel ら¹⁾ が結核菌の抗酸性消失度を判定の指標として用い、河盛ら^{2) 3)} がこれをわが国の一般臨床に実用しようように改変を加えて紹介している。われわれは、かつて、この方法に準じて INH 内服患者の血清中 INH 濃度の定量を行なっていたが、この方法では、染色法に慎重を期していても、時に試供結核菌の抗酸性消失率が不安定で判定に困難をきたす事態に遭遇した。

ところが Dubos 培地に順化せしめた試供結核菌の旺盛な発育を観察していると、結核菌は培地より重く、一夜の静置によってことごとく管底に沈澱し、沈渣が結核菌発育の程度を表現していることを知ったので、これを結核菌に対する INH の発育阻止作用の指標となす可能性に想到したのである。爾来吟味を重ねた結果 Mandel ら¹⁾ の結核菌染色による判定法（以下染色判定法と称す）よりもこの沈渣による判定法（以下沈渣判定法と称す）のほうが、操作が簡単で客観性が高く判定が容易であることを実証しえたので、実施上の要点を付記しつつその方法を発表し、あわせて染色判定法との比較を行なつた。諸家の御批判を得られるならば幸いと考えている。

沈渣判定法の実施ならびにその評価

第 1 章 沈渣判定法の実施について

〔I〕 実験材料ならびに実験方法

(A) 菌に関するもの

① 使用培地：Dubos 培地（以下 D 培地と称す）これは市販品（榮研製）を用いた。② 使用結核菌：H₂₇Rv の Streptomycin 耐性株（以下 H 菌と称す）これは、はじめにわれわれが、河盛法²⁾ による血清中 INH 濃度測定に使用していた菌株を、そのまま使用した。③ H 菌の順化：はじめ固形培地に保存されていた H 菌の 1 白金耳をいわゆる 6 分の試験管に容れた 5 ml の D 培地に接種し、はじめの間は毎 2 週間に、後には毎週に、

この 0.05 ml 宛を新しい同量の D 培地に継代培養し、5 日後に肉眼で培地に旺盛な発育を認められる程度に順化したものを用いる。なお試供菌量を多く必要とする場合には、同様の試験管の本数を増加するべきで、三角コルベンを使用する等のように条件を異にする培養法を用いると、本試験に失敗することがあるゆえ注意を要する。④ 試供菌液の作成：上のごとくして、D 培地に十分順化せしめた H 菌液 0.05 ml を 6 分の試験管に容れた 5 ml の D 培地内に接種し、毎日 1 回宛振盪しながら 5 日間培養したものを用いる。これは引き続き INH 定量試験に使用できるようあらかじめ準備しておく。この培地を、本試験には、D 培地で 5 倍に稀釈して用いる。

(B) 被検血清の採取

INH 以外のどんな薬剤も被検者の血清中には含まれていないように準備せられている被検者より、凝固防止剤を使用せずして採血せられた静脈血約 4 ml を綿栓したスピッツグラスに移し、室温に約 2 時間直立静置せしめてのち、これを遠心沈澱し、この上清を用いる。操作のすべては、嚴重に無菌的であるよう注意を要する。

(C) INH 濃度定量手技

INH 濃度定量試験には、いわゆる 4 分の試験管（内径約 11 mm）を用いる。これには、管底に凹凸がなくかつ歪んでいないものを選択する必要がある。

さて、綿栓を施して滅菌した 4 分の試験管 6 本を 1 列に並べ向かつて左より第 1 番目と第 2 番目の試験管（以下 1 番管、2 番管……と称す）に、(B) の操作で得た試供血清 0.4 ml 宛をそれぞれ注入し、2 番管より 5 番管までは D 培地で順次倍数稀釈を行ない、6 番管には、D 培地 0.4 ml のみを入れておく。各試験管に (A) ④ で得た浮游 H 菌液 1.6 ml 宛を追加すると、血清稀釈倍数は、1 番管より 5 番管までそれぞれ、5, 10, 20, 40, 80 倍となる。これを毎日 1 回宛振盪しつつ、5 日ないし 7 日間 37°C で培養して、判定に供する。

(D) 対照試験

使用INHに対しては滅菌操作を行わず、他はすべて無菌操作によって、まず80 mg/10 mlの滅菌蒸留水溶液を作成し、これより8 γ /mlを含む溶液を作り、これより以後の稀釈にはD培地を使用して、0.8 γ /mlを含む溶液を作成する。このINHのD培地溶液0.4 mlをとり(C)の操作における血清の場合と全く同様に倍数稀釈その他の操作を行ない、(C)で作った試験管系列と同時に培養を行なう。

(E) 判定方法

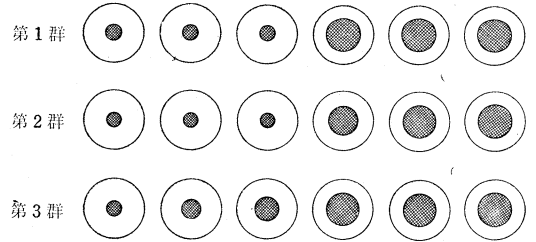
上記のような手技で培養した試験管系列を5日ないし7日間(H菌の発育の極度に旺盛なときには5日間でよい)培養してのちに、判定の日には培地を振盪しないままで沈渣の占める面積、その性状を相互に比較して判定する。すなわち、左より右へ移るにつれて試験管内のINH濃度が順次に半減していくか、INH有効濃度がH菌の発育を阻止する濃度以下になるや否やH菌の沈渣は急激に増加する。このように沈渣の急増する試験管の一本手前(倍の濃度のもの)試験管を標識試験管とよんで標識付ける。この標識試験管内のINH濃度がH菌の発育を阻止しうる最少有効濃度であるとみなしうる訳である。

さて、このように試験管を標識付けるべき対称となるところの、沈渣の状態の、試験管から試験管への移り変りを見ると、図で示すように原則的に、これを3つの群に分類できる。いずれの群でも標識試験管よりINH濃度の低い試験管は、いずれも、沈渣の発達は最大でほぼ同一の大きさをもっている。便宜上6本の系列試験管のうち、向かって左端より3番目の試験管(3番管)を標識試験管と判定されたものとし、沈渣がすべて、円盤状であるものとして、説明することにするが、第1群では1番管より3番管までは、沈渣がわずかであり、あまり増加を示さずして、4番管にいたって急激に最大の沈渣に発達しているもので、この群の判定はきわめて容易に行なえる。次に第2群に属するものには、3番管と4番管との間には著明な沈渣の増加があるが、4番管の沈渣は、5番管、6番管と比較して、やや小さいものである。すなわち、第2群では、沈渣の差のもつとも著明なところの試験管を標識付けることにした。第3群では、1番管より2番管、3番管へと向かうにつれて、少しずつではあるが、沈渣が発達してゆき、3番管と4番管との間の沈渣の差もとくに著明ではないが、4番管以後にいたって同様の最大の沈渣となつている場合である。この場合沈渣が最大となつてそれ以上の増大を認められない試験管の1本手前のものをもつて標識することに規定する。なお、このような例はきわめて少ない。

沈渣の移り変りは、以上でほぼ表わされるが沈渣の性

状は、INH濃度が、最少有効発育阻止濃度以上である場合には、必ずしも円盤状とはならず、不連続で輪状、点状、斑状の場合が珍しくない。したがって、沈渣を把握する場合、これが大きさ(直径)のみならず、その沈渣の性状をも同時に観察して総合判定をする必要があるが、この場合でも両属性を合して判断しつつ、上記の判定基準を使用すれば、標識付けに困ることはほとんどない。

図1 沈渣変遷の種類



(F) 人血清のH菌発育に及ぼす影響

INHを含有していない種々の人血清0.4 mlをD培地で5倍より80倍まで倍数稀釈し、これに(A)④で得た菌液1.6 mlを加えて培養し、人血清添加によるH菌発育への影響を検したところ、人血清を加えるとH菌の沈渣がわずかではあるが、増加することを約1/3の例において認め、また少数には人血清の濃度が高くなるほどわずかに沈渣の増大が認められるものがあった。

しかし(E)におけるように判定基準を設定しておけば、これらは本法の判定を阻害するほどの影響をもたらさないことを認めた。

表1 血清中INH濃度測定例

INHの濃度 γ /ml		例				
		0.16	0.08	0.04	0.02	0
1	直径	4.1	3.4	4.0	7.0	7.3
	性状	±	+	##	###	###
2	直径	4.3	4.2	4.2	7.9	7.9
	性状	±	±	±	##	###

(2) 稀釈血清による試験

稀釈倍数		例					
		5×	10×	20×	40×	80×	対照
1	直径	5.0	5.1	7.3	8.2	8.1	8.4
	性状	±	+	+	##	##	###
2	直径	4.0	4.1	3.3	5.4	7.8	6.6
	性状	±	±	±	+	##	###

表 2 沈渣判定法と染色判定法との比較 (a)

番号	判定法	INH の濃度 γ/ml				
		0.16	0.08	0.04	0.02	0
1	沈渣の大きさ, 性状	4.0 (+)	5.0 (+)	6.1 (卅)	7.1 (卅)	7.5 (卅)
	抗酸性消失率	90	70	30	5	0
2	〃	4.1 (±)	3.4 (±)	4.0 (卅)	7.0 (卅)	7.3 (卅)
	〃	90	80	60	5	0
3	〃	雑菌	6.1 (±)	7.0 (+)	7.0 (卅)	7.2 (卅)
	〃	〃	90	50	5	0
4	〃	4.3 (±)	4.2 (±)	4.3 (±)	7.9 (卅)	7.9 (卅)
	〃	90	60	50	10	0
5	〃	3.4 (±)	3.4 (±)	3.7 (±)	7.0 (卅)	7.5 (卅)
	〃	80	60	50	3	0

表 2 (b)

番号	判定法	稀釈倍数					対照
		5×	10×	20×	40×	80×	
2	沈渣の大きさ, 性状	5.9 (卅)	6.4 (卅)	6.7 (卅)	7.0 (卅)	7.0 (卅)	7.0 (卅)
	抗酸性消失率	80	60	0	0	0	0
3	〃	6.7 (卅)	8.1 (卅)	8.0 (卅)	8.4 (卅)	9.0 (卅)	8.2 (卅)
	〃	60	0	0	0	0	0
5	〃	5.2 (±)	5.3 (±)	5.5 (+)	7.9 (卅)	7.0 (卅)	7.9 (卅)
	〃	80	90	90	5	0	0
7	〃	6.3 (±)	6.4 (±)	4.0 (±)	5.8 (卅)	6.0 (卅)	6.0 (卅)
	〃	60	60	60	30	5	0
8	〃	4.0 (±)	4.0 (±)	6.5 (卅)	8.0 (卅)	8.0 (卅)	8.0 (卅)
	〃	60	60	10	0	0	0
9	〃	4.5 (±)	4.0 (±)	4.0 (±)	4.0 (±)	6.0 (卅)	6.0 (卅)
	〃	60	60	90	60	5	0
10	〃	6.5 (±)	6.0 (卅)	7.8 (卅)	7.8 (卅)	8.1 (卅)	7.2 (卅)
	〃	60	50	0	0	0	0
11	〃	4.9 (±)	5.0 (+)	6.8 (卅)	7.0 (卅)	7.0 (卅)	6.5 (卅)
	〃	60	50	5	0	0	0
12	〃	4.8 (±)	7.0 (±)	6.9 (卅)	7.0 (卅)	6.0 (卅)	6.0 (卅)
	〃	60	50	0	0	0	0
17	〃	7.5 (±)	5.3 (+)	6.0 (+)	6.1 (卅)	7.2 (卅)	6.4 (卅)
	〃	80	80	60	10	3	0
18	〃	7.5 (+)	5.6 (+)	7.0 (±)	6.6 (+)	5.6 (卅)	6.4 (卅)
	〃	90	90	90	60	10	0

〔Ⅱ〕 実験成績

上来述べた方法に基づいて、われわれは、血清中に含まれている有効 INH 濃度を測定し、次のごとくにし

て容易に判定できたのである。すなわち、対照試験として行なった既知濃度の INH を含有した培養試験管系列 2 例の沈渣の性状、大きさを表 1 (1) で示し、未知

表 2 (c)

番号	判定法	稀釈倍数						対 照
		5×	10×	20×	40×	80×		
1	沈渣の大きさ, 性状	5.6 (+)	5.1 (±)	7.8 (+)	8.2 (卅)	8.1 (卅)	8.4 (卅)	
	抗酸性消失率	40	20	5	0	0	0	
4	"	雑菌	4.1 (±)	3.3 (±)	5.4 (+)	7.8 (卅)	6.6 (卅)	
	"	"	50	30	30	0	0	
6	"	6.5 (±)	8.0 (±)	8.0 (±)	6.0 (+)	6.9 (卅)	5.7 (卅)	
	"	60	60	60	30	5	0	
13	"	6.0 (±)	5.6 (±)	5.5 (±)	5.0 (±)	6.5 (卅)	6.4 (卅)	
	"	60	60	80	30	0	0	
14	"	7.0 (±)	4.0 (±)	4.4 (+)	5.7 (卅)	5.8 (卅)	6.5 (卅)	
	"	60	60	30	3	0	0	
15	"	5.2 (±)	4.1 (±)	3.8 (+)	7.2 (±)	5.7 (卅)	6.5 (卅)	
	"	60	60	60	10	0	0	
16	"	6.1 (±)	5.7 (±)	5.6 (+)	6.2 (卅)	6.0 (卅)	6.0 (卅)	
	"	60	50	10	0	0	0	
19	"	(±)	(±)	8.0 (±)	8.5 (±)	7.1 (卅)	7.0 (卅)	
	"	60	70	70	20	2	0	
20	"	(±)	雑菌	雑菌	7.2 (±)	7.3 (卅)	7.3 (卅)	
	"	60	"	"	3	0	0	
21	"	(±)	7.5 (±)	6.5 (±)	8.0 (+)	8.0 (卅)	7.1 (卅)	
	"	60	60	60	30	2	0	
22	"	(±)	6.3 (±)	6.8 (+)	7.8 (卅)	7.8 (卅)	7.1 (卅)	
	"	60	60	5	2	0	0	

INH を含有する人血清 2 例の培養試験管系列の沈渣を表 1 (2) で示した。

なお、この表では、沈渣の直径を mm で表わし、沈渣の性状は卅, 卅, 卅, 卅として表わした。卅~卅までは沈渣は円盤状でその厚みの程度を示し、±とは沈渣が不連続分散性のものを表わすこととした。また、標識試験管の位置を分かりやすく表現するため、その区画の右上角を欠いて黒く塗った。この表で分かるように、表 1 (1) における標識試験管中の INH 濃度は、ともに 0.04 γ/ml であることが判然としている。また (2) においては、第 1 例では 20 倍、第 2 例では 40 倍の血清稀釈度のところが容易に標識付けられる。したがって、被検血清中 INH 濃度はそれぞれ 0.8 γ/ml , 1.6 γ/ml と推定せられる。

第 2 章 沈渣判定法と染色判定法との比較

〔1〕 実験材料ならびに実験方法

結核菌培養を用いる血清中 INH 濃度の定量法において、沈渣判定法を用いるほうが、染色判定法を用いるよ

りも、チールネルセン染色法という複雑な操作の介入がないだけに、判定にも混乱をきたす度合が少ないように思われるが、実際には、この考えが妥当であろうか。

これを実験するために、われわれは、第 1 章で述べた方法によつて血清中 INH 濃度の微生物学的定量を行なうにさいして、定量用試験管系列を孵卵器に入れてから 3 日間後に、まず系列中の各試験管より 1 滴の H 菌浮遊液をプレパラートに採り、これに型のごとく、チールネルセン染色法を行なつて、個々試験管の抗酸性消失率を記録しておき、同一の培地をさらに引き続いて、はじめより 5 日ないし 7 日間培養し、沈渣判定法により沈渣の状態を記録して両判定法を比較した。なお、染色判定法では H 菌の抗酸性消失率を % で表示したのであるが、このさいに気付いたことは、含有する人血清濃度によつて H 菌の染り方が異なること、一般に非抗酸性菌の染色され方が不安定であることであつた。それで染色には細心の注意を払つた心算である。なお、沈渣判定法における沈渣の大きさ、性状の記載方法は表 1 に準

じた。

〔II〕 実験成績

I NH 濃度を測定するための各系列試験管における H 菌の沈渣の状態と、H 菌の抗酸性消失率とを併記して比較を行なったのが表 2 である。表 2 (a) は既知の I NH 濃度を有する対照試験におけるものであるが、標識試験管の抗酸性消失率を 50% でおさえることによつて、染色判定法の標識試験管は沈渣判定法によるそれとよく一致し、1 例はこれを 30% とすることによつて一致した。次に血清中の I NH 濃度測定試験におけるものであるが、染色判定法での標識試験管の抗酸性消失率の下界を 50% と定めることにして、両判定法の標識試験管の位置を比較し、両者が一致した例を集めると、表 2 (b) のごとく 11 例あつた。次に両者の一致しなかつたものがやはり同じく 11 例あり、これを表 2 (c) で示した。表 2 (c) をみると、染色判定法において、抗酸性消失率が表 2 (b) に比較して、一般に低いようにみえるが、この場合、何パーセントのところを下界の基準にして試験管を標識付ければよいかの決定は困難なことが分かる。表 2 (c) で、強いて 50% 前後で標識の基準を決めるとすると、大きい誤差を生ずるべきことが、染色判定法と比較して明らかにされたのである。

一方沈渣判定法の記録を通覧するとの例をみても、標識試験管の判断に困難と思われるものはほとんどないのである。また本判定法で雑菌混入により汚染されたのは、本表の全例を通じて 4 本の試験管のみであつて、表 2 (c) No. 20 においてこれが標識試験管の近傍に起こつたが、いずれも判定を不可能としたものはなかつた。

総括ならびに考案

われわれは I NH 感受性結核菌を培養し、沈渣判定法によつて血清中 I NH 濃度を測定する方法を述べたが、本法を可能ならしめるためには、少なくとも次の要約が必要なことが分かる。すなわち、(1) 使用結核菌の比重が培養液の比重よりも大であること、(2) 結核菌が培地内で密着せずして発育し、分散沈澱すること、(3) 結核菌の発育が十分に旺盛であること等である。以上 3 要約のいずれを欠いても本法は成功しない。本法において (1)、(2) の条件は、H₃₇Rv 株を Dubos 培地に培養することによつて、解決せられたものであるが、(3) の要約を満足せしめるために、われわれは工夫をしなければならなかつた。まず、培地にペニシリンの使用は、さげざるをえなかつた。また Streptomycin, PABA の使用も避けた。継代培養には常に 6 分の試験管に 5 ml の Dubos 培地を容れたものを用いて、0.05 ml 宛毎週 1 回植え継ぎを行なうことにし、もし、多量の菌液が必

要なときにも、その本数を増加し、決して条件の異なつた大量培養法を行なつてはならないことを経験している。また、採血時には、いかなる凝固防止剤をも使用しないよう工夫した。さらに、血清中には I NH 以外の薬剤を含んでいないよう留意する必要があつた。

したがつて、本判定法は Mandel ら¹⁾の方法のように血清中に Streptomycin, PAS をあわせ含有している場合には、実施しにくい。この点、染色判定法より不利である。しかし、第 2 章で吟味したように、I NH だけ含有する血清においては、沈渣判定法によるほうが、操作がはるかに簡単であり判定が容易であり、結果が安定している。

なお、Schmiedel⁴⁾、小川⁵⁾、岡本ら⁶⁾は、固形培地に I NH 溶液が浸透拡散するのを利用して、これに培養した結核菌の発育阻止の幅を測り、対照と比較して血清中 I NH 濃度を定量しているが、これらの方法では、培地の作成に少なからざる労力と時間を要する模様である。また培地の凝固条件が難しく、結核菌の接種手技にも相当熟練を要すると考えられる。

われわれの行なつた方法では、市販の Dubos 培地を使用して満足な結果が得られるので、培地の調製にはほとんど苦勞がない。血清の倍数稀釈や菌液添加の操作にしても特別の熟練を要しないし、I NH の滅菌操作を省略し、Penicillin, Streptomycin, PABA 等の添加をも行なわなかつたので、操作はさらに簡易化されている点も強調してよいであろう。

I NH の滅菌については、これの 8 γ /ml の蒸溜水溶液 (pH 6.0) を 100°C、20 分間ならびに 40 分間滅菌し、しからざるものとともに本法で力価を比較したが、両者ともに明らかに力価の低下 (後者ではほとんど半減する) するのが認められた。

なお、本法は他の化学療法剤の結核菌に対するスクリーニングとしても便利に使用されるものであると考える。

結 語

われわれは、河盛の改変した Mandel 法に準じて血清中有効 I NH 濃度の微生物学的定量を行なうにあたり、培地に順化して旺盛な発育をなす I NH 感性結核菌の一定量を、判定用試験管に接種して 7 日間培養後に管底の結核菌沈渣の状態を観察し、これを培地に含まれている I NH の結核菌発育阻止作用の指標として用いて、血清中 I NH 濃度の測定を行なつた。そして、この方法を実施上の要点にふれつつ記述した。さらに、本法は Mandel らの染色による結核菌抗酸性消失率を指標とする判定法に比して、操作においてははるかに簡易であるとともに、判定が容易であり、確実な結果が得られることを実証しえた。

文 献

- 1) W. Mandel et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. :
91 : 409, 1956.
- 2) 河盛勇造 : 日本医事新報, 1790 : 25, 昭33.
- 3) 河盛勇造 : 結進, 24 : 51, 昭34.
- 4) Albert Schmiedel : Z. tbk., 112 : 48, 1958.
- 5) 小川政敏 : 日結, 16 : 417, 昭32.
- 6) 岡本亨吉 : 結核, 35 : 543, 昭35.