

原 著

RFP の 耐 性

前編 1%小川培地における RFP の菌発育最低阻止濃度の検討

馬 場 治 賢・吾 妻 洋

国立療養所中野病院

受付 昭和50年9月4日

THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE CRITICAL DRUG CONCENTRATION OF RIFAMPICIN

Report 1. Studies on the MIC of Rifampicin to Tubercle Bacilli Isolated
from the Rifampicin Untreated Patients Using 1% Ogawa Medium

Harukata BABA* and Yo AZUMA

(Received for publication September 4, 1975)

1. The MIC of Rifampicin to tubercle bacilli isolated from 1,779 Rifampicin untreated patients who were admitted to our hospital from June 1970 to June 1975 was studied by using 1% Ogawa medium.

2. There were 4 cases resistant to 50 mcg of Rifampicin, but 3 of them had enough reason to be considered as they had been treated already by the drug, and the technical failure was suspected in the remaining one case.

3. By indirect method, there were 7 patients (0.7%), whose bacilli grew 1% to 10% on 10 mcg of Rifampicin medium among 1,065 patients and no bacilli grew over 11% on that medium. However, by direct method, there were 115 cases (16.1%) whose bacilli grew 1% to 10% on 10 mcg medium among 714 cases and 6 cases (0.8%) over 11%.

By the direct method, bacilli grew more easily than by the indirect method on the medium containing the critical drug concentration; in other words, the drug resistance was expressed higher by the direct method (Table 2). The growth of bacilli seems to be more active on the direct method.

4. The bacilli from the patients admitted after July 1974, showed apparently higher rate of resistance than those admitted before (Table 3~4). This can be explained by the change in the stopper from cork type to M type. The latter stopper was invented by Futamura of our laboratory, which is usually air tight but allows the air leak into a tube any time when necessary. Moreover it prevents the drying up of the medium often seen when the air enters too much. Thus, the improvement of the growing condition of bacilli was achieved.

5. MIC of Rifampicin was 10% for the indirect method and 50% for the direct method with a few exception both on the 10 mcg Rifampicin medium. However, for the clinical significance of Rifampicin resistance, the criteria seem to be more reasonable if we take 50% growth or more on the 10 mcg Rifampicin medium, and we may add 1% growth or more on the 50 mcg Rifampicin medium which will be discussed in the 2nd report.

* From the National Nakano Chest Hospital, Egota, Nakano-ku, Tokyo 165 Japan.

われわれは1969年4月以来RFPの臨床使用を開始し、1971年3月末までに経験した87例についてその臨床効果および菌の消長と耐性出現との関係、血中濃度、副作用を本誌⁷⁾にすでに報告した。

今回はその後の経験例を加えてRFPの耐性について検討を行った。本編ではRFP未使用例の最低菌発育阻止濃度からみた臨床耐性限界を記し、後編でRFP治療症例の耐性出現状況の特長ならびにRFP耐性出現例の感性への復帰について報告する。

検査方法

1%小川培地, Proportion methodによつた⁸⁾。すなわち対照培地の最高菌数が計算できるようにして、各薬剤濃度の菌数が対照培地の何%であるかがわかるようにした。

菌液は間接法では小川培地4~8週培養の菌約20mgをかきとり、中試験管の管壁で直径6mmの円筒ピペットで2~3分摩擦し、これに5mlの滅菌浄水を加えて均等化し直ちに濾紙で濾過してこれを1mg/mlの原液とした。直接法では塗抹でガフキー7号以上の痰を4%NaOHで10倍にとかし、7号菌の場合は1/100mg/ml、8号菌以上の痰は1/10mg/mlの原液として取扱つた。これらの原液を1%NaOHで 10^{-2} ~ 10^{-5} mg/mlにうすめてその0.1mlを各培地に接種した。

薬剤培地はRFP純末をメタノールに室温で溶解、1%小川培地に次の濃度になるように90°C1時間凝固させた。薬剤濃度は添加濃度で標示した。初めはRFP5, 10, 20, 50mcgとしたが、一時期2, 5, 50mcgをへて、2, 10, 50mcgにし、更に10, 50mcgにして現在に至っている。それぞれ菌濃度は 10^{-2} , 10^{-3} の2段階とし、対照培地の方は 10^{-2} ~ 10^{-5} の4段階で接種した。

培地は初め当院で作製していたが厳密な比較対照検査が一致したのでBCG研究所から購入している。培地は作製後すぐに当院に持参4°Cに保存した。初めは作製後1週間以上の培地は使用しなかつたが、1972年以後成績に差がないことを確かめたので4°C保存で培地作製後1カ月前後までは使用に供することにした。また初めは各薬剤濃度各菌濃度共に培地2本宛に接種し、成績は2本の平均をとつたが、その差がほとんどなかつたので

1972年2月以後は薬剤濃度菌濃度共に各1本とし50mcg/ml培地は 10^{-2} の1段階だけとした。しかし対照培地は 10^{-5} を培地1本にしたが他は各菌濃度共に培地2本のままで実施した。

培養は初めはコルク栓⁵⁾⁶⁾を使用した、1974年5月以来M型栓⁷⁾に変更した。

判定は通常4週とし、対照の集落が微細で判定不能の場合のみ6週とした。また対照の最高菌数が100以下の場合は再検査した。

1%小川培地におけるRFPの菌発育最低阻止濃度からみた臨床耐性限界

1970年1月~1975年6月末までに当院に入院、病歴上RFP未使用の肺結核(非定型抗酸菌は除外した)1,779例を対象とした。ただし1975年以後の検査で成績未判明の86例は除外した。検査成績は当院での第1回目の成績をとり、2回目以後の検査成績は参考とした。

表1は前記症例の1%小川培地におけるRFPの菌発育最低阻止濃度の分布を示した。RFP以外の化学療剤の未使用(14日以内使用242例を含む)と既使用を分けたのはRFPの使用の有無を確かめるのに当院入院以前の病歴上での誤差を考慮してのことである。他の化療剤も未使用ならRFPも確実に未使用と信用できるからである。他の化療剤未使用群では10mcg1%以上菌出現は89例8.4%に対し、既使用群では39例5.4%とむしろ既使用群の方が低率であるから、これらの症例は一応RFP未使用例と考えてもよいと思われる。50mcgに菌出現した4例は共に他の化療剤既使用例であつた。

全例1,779例中RFP10mcg培地に対照の1~10%の菌繁殖を認めたのは122例6.9%であり、11~100%の菌出現は6例0.3%である。50mcg培地では菌繁殖を認めたのは4例0.2%である。すなわち表1で示す通りRFP未使用例で10mcgに11%以上の菌が出現するのはごく少数の例外例にすぎない、したがって1%小川培地におけるRFPの菌発育最低阻止濃度は10mcg11%と考えてもよいと思われるが、以下更にこの限界濃度の症例について検討を行った。

1) 10mcgに1%以上菌出現例

10mcg培地に1%以上の菌出現をみたのは128例で

Table 1. MIC of Rifampicin among Strains Isolated from RFP Untreated Cases Using 1% Ogawa Medium by Proportion Method

Other TB drugs	10 mcg					50 mcg		Total
	0%	~0.9	1~10	11~50	51%~	1~10%	11~100%	
Previously not used	805	166	86(8.1%)	3(0.3%)				1,060
Previously used	574	102	36(5.0%)	2(0.3%)	1(0.1%)		4	719
Total	1,379	268	122(6.9%)	5(0.3%)	1(0.06%)		4(0.2%)	1,779

Table 2. MIC of Rifampicin by Indirect and Direct Methods Using 1% Ogawa Medium by Proportion Method

	10 mcg					50 mcg		Total
	0%	~0.9	1~10	11~50	51%~	1~10%	11~100%	
Indirect	953	103	7(0.7%)				2(0.2%)	1,065
Direct	426	165	115*(16.1%)	5**(0.7%)	1(0.1%)		2(0.3%)	714
Total	1,379	268	122(6.9%)	5(0.3%)	1(0.06%)		4*** (0.2%)	1,779

Notes: 1) * 40 cases were tested 2 or more times. The second test of 39 cases was indirect and the results were all 0% on 10 mcg Rifampicin medium, but the second test of one remaining case was direct and it showed over 1% growth on the medium.

** 2 cases were tested 2 or more times by indirect method and they were all less than 1% on 10 mcg medium.

*** 3 cases were suspected to be treated already by Rifampicin and the remaining one could be a technical failure.

2) There was a significant difference in the proportion of cases showing growth of bacilli on the 10 mcg medium. between direct and indirect methods (0.001 > p).

Table 3. MIC of Rifampicin According to the Calendar Year Using 1% Ogawa Medium by Proportion Method

	10 mcg					50 mcg		Total	Principle change in the technique
	0%	~0.9	1~10	11~50	51%~	% 1~10	% 11~100		
1970	20	3						23	1972 Extension of preserving time of Rifampicin medium. Decrease of number of test tube. May 1974 Change in stopper from cork type to M type.
1971	83	3	2					88	
1972	395	82	28				2	507	
1973	419	58	29				1	507	
Jan. to June 1974	224	42	7				1	274	
July to Dec. 1974	149	49	25	1				224	
Jan. to June 1975	89	31	31	4	1			156	
Total	1,379	268	122	5	1		4	1,779	

あるが、このうち121例94.5%が直接法で、間接法はわずかに7例にすぎなかった。表2は全例を間接法、直接法に分けたものであるが、間接法では1,065例中10mcgに1%以上7例0.7%に対し、直接法では714例中121例16.9%を占めていた(統計的に危険率0.1%以下で有意差)。しかも間接法の7例は10mcg 1, 2, 3%各2例、5% 1例で11%以上にはないが、直接法には11%以上にも14% 2例、25, 27, 38, 55%各1例の6例認められている。直接法で10mcgに1~10%の菌出現を認めた115例中40例ならびに11%以上の6例中2例は2回以上検査を行っているが、直接法のみを2回の1例は2回共1%以上であったが、残りの41例は間接法では39例が菌(-)であり2例が1%以下であった。すなわち直接法は間接法よりも高い所で菌の発育を阻止することを示した。

次に表3のように各検査年度別にみるとわれわれの症例では1974年7月以後に10mcgに11%以上の菌出現を認め、しかも増加の傾向がみられた。これを間接法、直接法別に分けると、間接法では11%以上はないが1%以上は1974年7月以後増加の傾向を示し統計的にも有

意差(0.005 > p > 0.001)であった(表4A)。直接法でも同様明らかに1974年7月以後に1%以上の菌出現は増加を示した(0.001 > p)(表4B)。

なぜ検査年度によつて菌の阻止濃度限界が高い方に移動したのか。まず検査手技によるものではないかと考え、これまでの検査手技の変更を調査した。主な変更は1972年初め培地作製後1週間以内に使用する制限をはずしたことおよび1972年2月以後薬剤培地の各濃度各段階を1本宛の培養にしたこと、次に1974年5月に今までのコルク栓をM型栓に変えたことがあげられるが、1974年7月以後の症例に10mcg 1%以上が増加していることから、M型栓に変えたことが最大の原因と思われる。

2) 50 mcg に菌出現例

50 mcg に菌出現の4例は全例他の化療剤既使用例で間接法2例、直接法2例である。

第1例は入院時直接法でRFP 10 mcg 10%、50 mcg 15%であったが、その3ヵ月後および9ヵ月後の2回いずれも間接法で10, 50 mcg 共に感性を示した。この例は第3回目の検査後RFP・SM(耐性剤)併用で治療開

Table 4. Rate of the Cases Showing Growth of Bacilli on 10 mcg Rifampicin Medium According to the Test Methods and Calendar Year

A) Indirect method

	10 mcg				Total
	0~0.9%	1~10	11~50	51%~	
Jan. 1970 to July 1974	862	2(0.2%)			864
July to Dec. 1974	132	3(2.2%)			135
Jan. to June 1975	62	2(3.1%)			64
Total	1,056	7(0.7%)			1,063

(0.005>p>0.001)

B) Direct method

	10 mcg				Total
	0~0.9%	1~10	11~50	51%~	
Jan. 1970 to June 1974	467	64 (12.1%)			531
July to Dec. 1974	66	22 (24.7%)	1 (1.1%)		89
Jan. to June 1975	58	29 (31.5%)	4 (4.3%)	1 (1.1%)	92
Total	591	115 (16.2%)	5 (0.7%)	1 (0.1%)	712

(0.001>p)

始, その6週後 50 mcg 100%となり, 以後9回検査したが常に 50 mcg 100%であった。

第2例は1968年6月発病, 1972年5月当院に入院するまでに4年間3つの病院で入院を繰返し, その間 SM, KM, PAS, INH を使用したという。当院入院時直接法で RFP 10 mcg 100%, 50 mcg 50%であったため, 同一菌を継代培養して間接法で再検査したが成績は同様であった。3ヵ月後 EB (感性), INH (耐性) で治療開始し, その1ヵ月後の検査 (間接法) では RFP 10mcg にも感性になっていた。この例はこの直後事故退院したため以後の追求はできなかつた。

第3例は1969年8月発病, 9月まで約1ヵ月当院に入院後転医したが, 4年後の1973年10月再入院して来た症例である。病歴では SM, PAS, INH 使用となっているが, 再入院時前回入院とは INH が耐性に変つただけで SM, PAS は感性のままであった。しかし未使用の RFP, EB は再入院時共に耐性であった (第1回入院時は RFP, EB の耐性は不検)。すなわち RFP は3回検査し共に 50 mcg 100%であり, EB も3回共に耐性であった。

第4例は1964年発病の右肺結核左結核性膿胸例であ

る。1967年2月当院入院までの治療は SM, KM, VM, PAS, INH, EB をそれぞれかなりの長期間使用しており, ことに EB は1970年から1974年2月まで不規則であるが3年以上内服している。入院時の耐性検査では未使用の RFP は直接法で 50 mcg 100%であった。同日の痰を間接法で再検査した成績は同様であった。しかし3年以上内服した EB は2回の検査共に 2 mcg にも感性であった。

この4例のうち第2例と第4例の発病時期は日本に RFP が輸入される以前ゆえ耐性菌感染とは考えられない。また第2, 3, 4例は病歴では RFP 未使用となっているが既使用の疑いが濃厚である。第1例は入院時 50 mcg に15%とあつたが直接法であったことも併せてむしろ検査誤差が疑われるし, 第2例で INH・EB で治療開始後 RFP 10 mcg にも感性となつたことは検査の誤りか耐性の感性復帰か説明不能であった。とにかく 50 mcg に菌出現した4例は, 1例が検査誤差が疑われるし, 3例は RFP 未使用例としてはかなり疑わしい症例であった。

この他に入院時胃液培養 (間接法) で 10 mcg 0.6%, 50 mcg (-) であつた1例が3ヵ月後気管支洗浄液よりの培養菌に 10 mcg 30%, 50 mcg 28%となつた1例があるが, これは気管支鏡の汚染によると判断されているため別の機会にゆずつてここでは詳しくふれないことにする。

総括ならびに考案

前報告²⁾でわれわれは RFP 未使用患者9例からの分離菌株による濃厚菌液の実験で「10 mcg では自然耐性菌は, 最も数の多いものをつつても 10^7 コ中 10^4 コ, すなわち 0.1% であつたから耐性限界は 10 mcg 1% 以上としてもよからうと思われるが, Canetti ら⁵⁾は 66 例で 10^6 コ中 3.3%, Grumbach ら⁶⁾は 13 例で 0.15% と報告しているから少し幅をもたせて 10 mcg 10% とすればなお安全と思われる」と記載したが, 今回は RFP 未使用患者菌株 1,779 例の検査で 10 mcg に 1~10% の菌出現は間接法で 7 例 0.7% であり, 11% 以上にはなく, 直接法では 10 mcg 1~10% が 115 例 16.1%, 11~55% が 6 例 0.8% であつた。また直接法で 10 mcg に 1% 以上であつた症例中 42 例は 2 回以上検査しており, うち 41 例は間接法で検査しているが間接法ではいずれも菌(-)か 1% 以下であつた。すなわち直接法では 10 mcg のような限界濃度の所では明らかに間接法よりも菌の発育が良好であつた。換言すればよりわずかに耐性度が高く現れた。したがつて 1% 小川培地における RFP の菌発育最低阻止濃度は間接法で 10 mcg 10%, 少数の例外があるが直接法では 10 mcg 50% であつた。このことから臨床耐性限界は全体として 10 mcg 50% 以上としてよいと思われる (ただし後編で示すようにわれわれはこれにもう

1976年1月

一つの示標として50 mcg 1%以上を追加したい)。

なお今回のわれわれの症例では1974年7月以後に濃度の高い所で阻止する症例が増加しているが、これはM型栓に変更したことによる可能性が大きい。コルク栓⁹⁾、M型栓⁷⁾は共に当院検査科の二村によつて考案されたものであるが、コルク栓は在来の密栓よりも菌の発育が良好でコロニーが大きくかつ数も多いが、菌発育までの日数がおくれる欠点があつた。それを改良したのがM型栓である。M型栓は試験管内が陽圧のときは密閉し、陰圧になると自動的に空気が必要量だけ流入して酸素が補給される構造をもつたゴム栓である。またコルク栓では時に培地が乾燥することがあるが、M型栓では適当な湿度が数カ月以上保たれている。したがつてM型栓に変更したことは菌の発育の条件がよりよい状態になつていくことになる。Meissner¹⁰⁾はSMについての実験で通気性の栓は、密栓よりも耐性検査では4~16倍高い濃度の所で阻止する、言いかえればより高い耐性として現れると報告しているが、われわれの同様の実験では、Meissnerの報告ほどにはならなかつたが、もともと耐性検査は薬剤と菌の繁殖力との競争であるから菌の繁殖がより旺盛であれば薬の阻止する濃度は高い所に移ることは理解にかたくない。したがつてわれわれの症例が1974年7月以後に高い濃度の方に移行している事実もこれで説明されえたと考える。また直接法が間接法よりも高い濃度の方に多いのも継代培養菌よりも直接培養菌の方が繁殖力が旺盛であることで当然の成績と思われた。

結 語

(1) 1970年1月~1975年6月に当院入院のRFP未使用肺結核患者菌株1,779例の1%小川培地における

RFPの菌発育最低阻止濃度の分布について検討した。

(2) 間接法でRFP 10 mcgに1~10%の菌繁殖は1,065例中7例(0.7%)、11%以上に菌出現はなかつた。直接法では10 mcgに1~10%は714例中115例(16.1%)、11%以上は6例(0.8%)であつた。直接法は明らかに間接法よりも高い濃度のところで菌の発育を阻止した。これは直接法の場合が菌の発育力が旺盛であるためと思われる。

(3) 1974年7月以後検査の分に高い濃度の方に多く菌出現を認めた。これはコルク栓からM型栓に変えたため菌の発育条件がよりよくなつたのよると判断した。

(4) RFP未使用例の菌発育最低阻止濃度は少数の例外があるが、間接法で10 mcg 10%、直接法で10 mcg 50%であつた。この成績から臨床耐性限界は全体として10 mcg 50%以上または50 mcg 1%以上(後編)とした方がよいと思われる。

稿を終るに当り、面倒な耐性検査を一手に引受けていただいた斎藤千別技官に深く感謝する。

文 献

- 1) 馬場治賢他: 結核, 46: 429, 1971.
- 2) 馬場治賢他: 結核, 46: 481, 1971.
- 3) Canetti, G. et al.: Rev. de la Tub. et Pneumol., 27: 217, 1963.
- 4) 馬場治賢他: 結核, 50: 191, 1975.
- 5) 二村 久: 衛生検査, 7: 126, 1958.
- 6) 二村 久: 衛生検査, 7: 163, 1958.
- 7) 二村 久: 医療, 27: 1045, 1973.
- 8) Canetti, G. et al.: Tubercle, 49: 367, 1968.
- 9) Grumbach, F. et al.: Rev. de la Tub. et Pneumol., 31: 749, 1967.
- 10) Meissner, G.: Bull. I. U. A. T., 34: 187, 1964.