

原 著

抗 結 核 剤 の 耐 性 問 題

第1部：検査法，「所謂」Proportion method 25年の
経験，その反省とよりよい方法の提言

馬 場 治 賢 ・ 斎 藤 千 別

国立療養所中野病院

受付 平成4年3月10日

ON THE PROBLEMS OF THE ANTITUBERCULOUS DRUG RESISTANCE

1st part. Technique of measurement. From our experience of proportion
method for 25 years. Reflection and proposal of better procedure.

Harukata BABA*, Chiwaki SAITO

(Received for publication March 10, 1992)

In this part, we will discuss exclusively about the technique of measurement.

It is desirable especially for the proportion method that two inoculations with the same doses give the same number of colonies and when diluted, the colonies decrease exactly parallel to its degree of dilution. But this ideal is not necessarily realized and especially the difference between the dilution of 10^{-3} and 10^{-4} mg/ml on the drug free medium and that of 10^{-2} and 10^{-3} on the drug containing medium is fairly remarkable: the former is not so large but the latter sometimes varies tremendously with the drugs and their concentrations.

So it is necessary to use always two inoculations for all specimens and the resistance is calculated on the medium inoculated with the same doses, for that, colonies on the control must be countable and suitable number that is 50~300. Further too concentrated solution like 10^{-2} mg/ml must not be used for the proportion method.

The selection of the most suitable two dilutions is specially important for this method. Original one is 10^{-3} and 10^{-5} . Unfortunately we did not follow this formula and at first we adopted the combination of 10^{-3} and 10^{-4} , then 10^{-2} and 10^{-4} finally 10^{-2} and 10^{-3} which was the worst.

Now we searched for the dilution which gave the suitable number of colonies from our several thousand cases and found that 10^{-4} was the most excellent and gave this number in 63%, next 10^{-5} in 14%, and then 10^{-3} in 7.2%, 10^{-2} in only 1.0%.

With the combination of 2 solutions 10^{-3} and 10^{-5} — original one — was most excellent (94.8%) then 88.4% with 10^{-4} and 10^{-5} . The combination of 10^{-2} and 10^{-3} was worst, it gave only 8.9%.

*From the National Nakano Chest Hospital, 14-20, 3-chome, Egota, Nakano-ku, Tokyo 165 Japan.

As the proportion method demands the most strict procedures for all cases, it is necessary as simplify as possible, thus in every day practice, only the drugs most frequently used (3 or 4 drugs) and one concentration for each drug could be examiend.

Further we discussed on the difference between DH-SM and SM, direct and indirect method and problem of plug.

Key words : Drug resistance, Proportion method, Direct and indirect method, Plug

キーワードズ : 薬剤耐性, プロポーションメソッド, 直接間接法, 栓

はじめに

いかなる抗結核剤も、多数の菌群の中には必ず耐性菌が含まれている。その割合がどの濃度にどのくらい増加したら臨床的に意義があるかを知ることが、本論文の主目的である。その第一歩として、検査法自体、特に proportion method¹⁾²⁾ の問題点を検討する。proportion method は2種の異なる稀釈菌液を対照並びに耐性培地に接種し、両者の集落数を数え、その割合を算出する方法である。もし対照の集落数を100~200個にする稀釈菌液が作れるなら2稀釈菌液の必要はない。

ここに「所謂」としたのは、われわれが原法に従わなかったためである。原法の簡易法³⁾ (原著発表6年後改正) とわれわれの方法 (本法開始より12年目変更) の相違を Table 1 に示した。

最も主な相違点は、1) 組合せ32稀釈液濃度の相違、

2) 被検薬剤の濃度数、3) 被検薬培地数である。

われわれも初めの頃は 10^{-3} と 10^{-4} 、次に 10^{-2} と 10^{-4} の稀釈液を用い、各被検薬とも2本ずつであったが、被検剤の種類が増すにしたがい何らかの制限が必要となった。その対策として、1) 耐性値を1薬剤1濃度で代表させる、2) 各被検体培地を1本とする。われわれは臨床研究の意義を重視し後者を選んだ。しかも一部のものは 10^{-2} 液のみしか使用しないという間違いまで犯した。

そのほか原法との相違は、培地の種類およびその凝固温度、SMについてはDH-SMの使用いかん、培養始めの栓の仕方等である。

以下、われわれの方法を述べる。

1. 培地

小川の卵培地、薬剤添加後90°C 60分1回 (BCG研究所に依頼)、4°C 保存では1カ月は安定していたが、

Table 1

a. Original Formula (Simplified Variant)

bacillary suspension	control	S 4 μ g	H 0.2	R 40	E 2	K 20
10^{-3} mg/ml	2	2	2	2	2	2
10^{-5}	2	2	2	2	2	2

the rest is omitted

notice : figures on line of bacillary suspension are the number of tubes. 10^{-3} means the inoculation of 0.1 ml of 10^{-3} mg/ml suspension.

b. Our Formula

bacillary suspension	control	S 4 10 20 μ g	H 0.1 0.2 1	R 10 50	E 2 3	K 20 50	T 10 20	C 20 30	P 0.5 1
10^{-2} mg/ml	2	1 1 1	1 1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
10^{-3}	2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1		1
10^{-4}	2								
10^{-5}	1								

notice : figures on line of bacillary suspension are the number of tubes.

Table 2 Numbers of Colony Contained in 0.1 ml of Bacillary Suspension of 10⁻² mg/ml

	cases by direct method %		cases by indirect method %		total	%
10 ²	504	18.1	137	4.5	641	11.0
10 ³	1385	80.3	1215	93.7	2600	87.3
10 ⁴	851		1646		2497	
10 ⁵	45	1.6	55	1.8	100	1.9
total	2785		3053		5838	

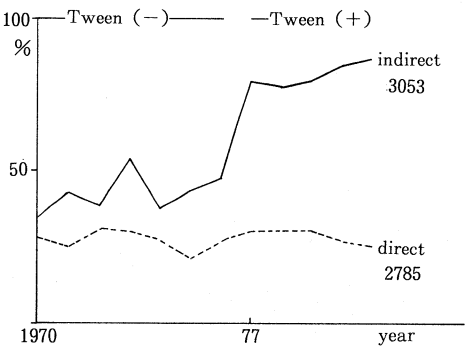


Fig. 1 Influence of Tween 80 on the Number of Colonies

多くは1～2週毎に新作した（原法は Löwenstein-Jensen 培地，85°C 50分）。各薬剤とも種々の濃度で検討したが，最終的に日常検査用として採用した8剤とその濃度は Table 1-b のとおりである。なお，他の薬剤については臨床例が少ないので省略する。

2. 接種法

a) 間接法

まず1977年2月以降の方法を記す。中試験管に滅菌 Tween 80 の10倍液1滴を滴下し，これに小川培地の全面からかきとった菌塊5～10mgを混入，駒込ピペットで管壁に1分間磨砕，浄水を加えて肉眼的に1mg/

mlのB.C.G.標準液（後にMcFarland標準液）と同一濁度にした。その1滴を5mlの1%NaOHに加え，10⁻²mg/ml（以下10⁻²と略記）とし，その0.5ml菌液を1%NaOH4.5mlの系列に次々に加え10⁻⁵液まで作った。

1977年以前はTweenを用いず，菌塊を試験管壁で磨砕後濾紙で濾過した菌液を用いていた。濾過菌は少なくともしばらくの間はバラバラになっていた。

b) 直接法

ガフキー7号以上の場合のみ行った。7号の場合は4%NaOHで均等化後1%NaOHで10倍に薄めて10⁻¹菌液とし，8号以上は10⁻²とした。すなわち痰1ml中それぞれ0.1mg，1mgの菌を含有するものと仮定した。ただ，現実には痰の濃さにより稀釈液を多少加減したので間接法ほど正確ではない。

判定は直接，間接とも通常4週としたが，時に6週またはそれ以上のこともあった。

上述の方法で判定した10⁻²0.1ml中の集落数は10²～10⁵の間にあったが，87%は10³～10⁴であり（間接93.7%，直接80.3%），10²が11%，10⁵が1.9%であった（Table 2）。

3. 菌の分散度 (Fig. 1)

年度別に全集落数中の10⁴+10⁵の占める割合を直接法，間接法に分けてみると，間接法では1977年度より急増している。菌液調製時 Tween 80 を用い始めた時

Table 3 Variation of Colonies Inoculated with the Same Dosis on the Drug Free Media

	same	2 ×	3 ×	4 ×	5-12×	total
a	8(21.6)	14 (37.8)	9 (24.3)	1 (2.7)	5 (13.5)	37
b	12(42.9)	12 (42.9)	3 (10.7)	0	1 (3.6)	28
c	418(93.3)	30 (6.7)	0	0	0	448
total	438	56	12	1	6	513

notice : considered only the cases measured by indirect method in 1979 (tween +)
a. one of two tubes has 1 to 4 colonies. b. 5 to 9. c. both 10 to 30.

と一致している。Tween 80 は菌の凝集を妨げる作用があるため菌を分散させより多くの集落を作ったためと思われる。直接法は Tween を用いていない。

4. 測定上の誤差

Proportion method には 2 つの重要な前提がある。
a) 同一濃度一定量の菌液は同数の集落を作る。b) 稀釈菌液は稀釈に比例した集落を作る。以下、われわれの成績を述べる。

- 1) 対照 2 本の差 (Table 3)
- 同一菌量を接種した 2 本の集落数が同じであったのは a, b, c の順に 22 %, 43 %, 93 % と c が最も優れており、また a は最大 12 倍の開きがあったが、b は 3 倍 (1 例の例外はあったが)、c は 2 倍であった。
- 2) -1 10 倍稀釈液の比較 (対照培地) (Table 4-1)
- 菌液を 10 倍に稀釈すれば集落数も 1/10 になるはずだ

が、われわれの例では 1/3~1/30 にも及び、正確に 1/10 は最良でも 26 % (c) で残りの大部分は 1/16~1/19 の間にあり、1/5 以下 4 %, 1/20 以上 7 % であった。

- 菌液の稀釈はたとえ正確であり、菌の分散度がいかに均等であっても、各集落数を作る菌数を一定にすることは出来ないであろう。
- われわれの場合、耐性培地への菌接種は 10^{-3} が最低で、この稀釈度では対照は大部分 300 以上の集落数であったため耐性値は 10^{-4} または 10^{-5} の集落数をもととして計算されている。すなわち 10^{-3} の数が 10^{-4} の正確に 10 倍になっている場合以外は実際の耐性値より異なった値、すなわち 1/20 以上は半分以下、1/5 以下は 2 倍以上の耐性値で示されている。
- 2) -2 10 倍稀釈液の比較 (耐性培地) (Table 4-2)
- 耐性培地での 10^{-2} と 10^{-3} の比較では対照培地高度稀

Table 4-1 10-fold Dilution and it's Effect on the Numbers of Colony (Drug Free Media)

result of 10-fold dilution	$\frac{1}{3} - \frac{1}{5}$	$\frac{1}{6} - \frac{1}{9}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{11} - \frac{1}{19}$	$\frac{1}{20} - \frac{1}{50}$	total
a	10	24	9	54	30	127
b	4	37	16	52	7	116
c	5	105	74	97	1	282
total	19(3.6)	166(31.6)	99(18.9)	203(38.7)	38(7.2)	525

notice : all cases were examined by indirect method (tween +) in 1979.

a. one of the two has 1-4 colonies. b. 5-9.

c. both 10-30.

theses differences were found between 10^{-3} and 10^{-4} or 10^{-4} and 10^{-5} .

Table 4-2 10 fold Dilution and it's Effect on the Numbers of Colony (Drug Containing Media).

numbers of colony	S 4 10		H 0.1 0.2		K 20 50		E 2 3		R 10 50	
less than 9 fold	3 4 (0.5)(0.6)		2 7 (0.3)(1.1)		1 0 (0.2)		5 1 (0.8)(0.2)		21 1 (3.4)(0.2)	
more than 10 fold	11 8		3 6		11 2		21 2		67 1	
more than 100 fold	26 6		0 0		10 0		12 1		9 0	
more than 1000 fold	2 0		0 0		0 0		1 0		0 0	
total	39 14 (6.2)(2.2)		3 6 (0.5)(1.0)		21 2 (3.4)(0.3)		34 3 (5.4)(0.5)		76 1 (12.5)(0.2)	

notice : numbers in the parenthesis is the ratio to all 626 cases examined by indirect method in 1981.

theses differences were found between 10^2 and 10^3 .

积液の場合とかなり趣を異にしている。 10^{-3} で集落0なら 10^{-2} では9個以下のはずなのにしばしば10個以上稀に数千個にも及んでいた。

そこで、1981年度の全例中同一例で 10^{-2} および 10^{-3} の集落数がともに明らかなものを集めてみた。 10^{-3} が0は1個として計算した。極微集落や多数で数えられぬものは除いた。

成績はTable 4-2に示すとおり、 10^{-2} 、 10^{-3} とも集落数が記載されていたものは極めてわずかではあったが、薬剤の種類により影響されかたが異なり、同一薬剤では濃度が低いものほどその差が大きかった。

このような大差の原因は明らかでないが、2つのことが考えられる。1) 10^{-3} が0で 10^{-2} が10以上の場合には 10^{-3} に菌液接種を忘れた。2) 10^{-2} のような濃厚菌液を低濃度の薬液を含む培地に接種すると菌と薬との接触が不十分となり菌が繁殖する。

1) に対しては菌液接種は4本ずつ行い、終わったら直ちに栓をして斜面にする。つづいて次の4本というようにしているので、菌液の接種されない培地はありえない。

2) の考え方からすれば接種する菌液が薄ければこのような大差はなくなるのではなかろうか。初期のころ、

われわれの所でも 10^{-3} と 10^{-4} の組合せが行われたがわずかに352例で中止された。しかし、そのうちSM 4 μ gでは 10^{-3} 、 10^{-4} とも集落数が明らかなものは33例、うち21例(64%)は10倍以下、11例(33%)は40倍以下、1例(3%)のみ200倍であった。

3) 微細集落 (Table 5)

微細集落は対照培地自体にもみられるもの、耐性培地のみにみられる場合がある。Table 5は1970年より81年の12年間に全例中にみられた微細集落の頻度である。初回、既使用あるいは直接間接法によるものに分けたが頻度の割合に大差なかった。ただ、薬剤の種類により、また同じ薬剤では濃度が低いほど微細集落は多かった。特にS 4 μ g, K 20 μ g, E 2 μ g等で目立った。

5. DH-SM と SM

はじめはSM耐性はすべてDH-SMによった。しかしDH-SMの製造が禁止されたので、1972年2月からはSMに変更された。そこで両種SMの耐性値を検討した。症例は20例(H37RV 1例、未使用19例)、間接法、コルク栓対照、耐性培地ともに2本ずつ、4週判定。

成績 (Table 6)

耐性値を1%以上、10%以上、50%以上に分けると

Table 5 Frequency of Micro-colonies during 12 Years from 1970 to 81

drug μ g	all cases	microcolonies	%	drug μ g	all cases	microcolonies	%
S 4	6093	692	11.4	H 0.1	6095	15	0.3
S 10	6095	97	1.6	H 0.2		22	0.4
S 20		3	0.1	H 1.0		3	0.1
P 0.5		91	1.5	P 1.0		12	0.2
K 20	6093	571	9.4	K 50	6094	32	0.5
T 10	5838	8	0.1	T 20	5838	3	0.1
C 20	4998	118	2.4	C 30	4998	1	0.1
E 2	6090	277	4.6	E 3	6090	23	0.4
R 10	5098	17	0.3	R 50	5098	2	0.1

notice : thick figures show the microcolonies which exceed 1 %.

Table 6 DH-SM and SM (Preparatory Experiment)

concentration of drug mg/ml	DH- or SM	all cases	resistant grade		
			more than 1 %	more than 10 %	more than 50 %
2	DH- SM	20	15 20 } n. s.	11 17 } n. s.	0 7 } P=0.014
4	DH- SM	20	5 14 } n. s.	0 9 } P=0.0049	

Table 7 DH-SM and SM (Clinical Cases)

		all cases	resistant more than 1 % to 4 μ g		all cases	resistant more than 1 % to 10 μ g
treated	DH	562	70 (12.5)	P<0.05	562	45 (8.0)
	SM	745	129 (17.3)		745	63 (8.5)
untreated	DH	545	238 (43.2)	n.s.	545	174 (31.4)
	SM	522	247 (47.5)		522	176 (33.7)

2 μ g では 50 % 以上の時 20 例中 0 : 7 と SM が有意に高く (P=0.014), また 4 μ g では 10 % 以上の時 20 例中 0 : 9 と SM が有意に高値を示した (P=0.0049), しかし 10 μ g 以上では有意差はなかった。

次に 1970 年 1 月より 72 年 2 月 (DH-SM 使用) およびそれ以後 74 年 6 月 (SM 使用) までの全例 (両群ともコルク栓使用) について比較した。濃度は各 4 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 耐性度は 1 % 以上, 10 % 以上, 50 % 以上に分けたが, Table には 20 μ g は省略, 耐性度は 1 % 以上のみを示した。(Table 6, 7)

成績未使用群 4 μ g で 1 % 以上を耐性とした場合のみ SM が有意に高値を示した (P<0.05) 既使用群では有意差はなかった。また未使用群で 1966 年までさかのぼって DH-SM 例を増すと 1303 例となり, これと SM の 745 例を比較すると, 1 % 以上では 158 例 (12.1 %) と 129 例 (17.3 %) と有意差を増し (P<0.005), 10 μ g では直接法と間接法に分けた場合, 直接法の場合のみ SM が有意に高値を示した。

すなわち SM は DH-SM より高い耐性値を示すが, 主として 4 μ g においてであり, 10 μ g では直接法の場合のみ有意差があり, 20 μ g では有意差はまったくなかった。

6. 直接法と間接法

S・H・P・K・T・C・R・E の 8 剤, 18 濃度についてはじめに直接法で検査し, その対照菌で間接法を行ったものが最少 28 例 (C) から最多 69 例 (H) あった。その大部分は未使用例である。以上の例について耐性度を 1 % 以上, 10 % 以上, 50 % 以上に分けて検討したところ R 10 μ g 1 % 以上の場合のみ直接法が有意に高かった。30 例中 6 : 0 (P<0.025)。K 20 μ g は 65 例中 11 : 24 と間接法が高かったが有意差はなかった。その他の薬剤では低濃度でも高濃度でも有意差のあるものはなかった。

次に 1970~81 年の 12 年間の症例を未使用群 (14 日内の使用例を含む) 既使用群および両者合計の全例に分け, 耐性度を 1 % 以上, 10 % 以上, 50 % 以上に分けた。

Table 8 は全例, 1 % 以上の耐性度の例のみを示した。Table では R・E・H・P・T は低濃度・高濃度とも直接法が高かった。S・K・C は低濃度では間接法が高く, 高濃度では直接法が高かった。ただ, K 20 μ g のみは, 50 % 以上の耐性度でもわずかではあるが間接法が高かった。

未使用と既使用間で特に目立つ点は, 前者では有意差のあるものが著明に少なかった点である。すなわち 8 剤 18 濃度, さらに各々を 3 段階の耐性度に分けた全検査 54 回中既使用例では 45 回 (83.3 %) 有意差例があったのに, 未使用例では 16 回 (29.6 %) のみであった。また低濃度では有意差があるのに, 濃度が高いもの, 耐性度が高いものは有意差がなくなるものが多かった。例えば R 10 μ g では未使用例で耐性 1 % 以上では χ^2 は 218.2 もあったのに 50 % 以上だと 0.66 となり, また 50 μ g では 1 % 以上でも 0.66 であった。そのほか E 2 μ g, T 10 μ g, C 20 μ g でもほぼ同様の所見がみられた。

以上は主として 4 週判定によるもので, 6 週判定では差がなくなるかの検討は行っていない。

7. 栓の影響

以前は固型培地に菌接種後, まず綿栓, 培地を半水平にしてフランキに 2~3 日静置, 培地表面乾燥後封蠟していたが, 二村はその簡素化のためコルク栓を用いたところ, 集落の発現は 2~3 日遅れるが完成した集落は著明に大きく数もはるかに多いことに気付いた。そこで菌接種後毎日培地内の圧を水銀マンオメーターで測定したところ, 菌の発育がルーペで見え始めるとともに管内が陰圧となり水銀は管内に吸引された。そこで酸素が必要な時は空気が容易に管内に吸引されるが, その他の時は気密になる栓を考案し M 型と名付けた。

ただ, 残念ながらこの 3 つの栓の耐性値に対する影響についての比較検討は行っていない。綿栓の時代は proportion method は行っていなかったもので, せめてコルク栓と M 型栓の差を, コルク栓を用いた最後の 1 年間と M 型栓になってからの最初の 1 年間の成績を比較す

Table 8 Direct and Indirect Method (all cases)

	cases	more than 1% to each Drugs							
		low—	X ²		middle—	X ²		high—	X ²
R direct	2325	502 (21.6)	306.01					141 (6.1)	31.82
R indirect	2787	102 (3.7)						7.6 (2.7)	
E direct	2833	523 (18.5)	42.35					182 (0.4)	23.19
E indirect	3267	378 (11.6)						118 (3.6)	
H direct	2838	759 (26.7)	17.92		659 (23.2)	34.12		469 (16.5)	32.09
H indirect	3268	682 (20.9)			523 (16.0)			354 (16.8)	
S direct	2838	1003 (35.3)	0.25		515 (18.1)	8.13		414 (14.6)	7.12
S indirect	3264	1183 (36.2)			482 (14.9)			390 (11.9)	
K direct	2837	376 (13.3)	13.45					163 (5.7)	12.53
K indirect	3265	562 (17.2)						122 (3.7)	
T direct	2729	284 (10.4)	49.02					284 (10.3)	36.98
T indirect	3118	179 (5.7)						179 (1.7)	
C direct	2292	497 (21.7)	5.91					61 (21.7)	2.73
C indirect	2723	692 (25.4)						53 (1.9)	
P direct	2838	414 (14.6)	6.61					382 (13.5)	8.29
P indirect	3266	393 (12.0)						351 (10.7)	

notice :

low concentration (mg/ml) R 10 E 2 H 0.1 S 4 K 20 T 10 C 20 P 0.5

middle conc. (mg/ml) 0.2 10

high cone. (mg/ml) 50 3 1 20 50 20 30 1

Table 9 Comparison between Cork- and M-type Plug

		Control 1			Cork vs M-type			Control 2		
		Cork ('72)			(1972) (1975)			M- ('75)		
	criteria	all	resistant	X ²	all	resistant	X ²	all	resistant	X ²
		cases	cases		cases	cases		cases	cases	
1. R 10 μ g treated	more than 1 %	826	20 (8.8)	1.71	237	13 (5.5)	23.2	179	48 (26.8)	1.57
		237	13 (5.5)		179	48 (26.8)		202	36 (17.8)	
2. S 4 treated	more than 50%	343	57 (16.6)	0.85	316	43 (13.6)	10.4	326	85 (26.1)	1.53
		316	43 (13.6)		326	184 (56.4)		335	70 (20.9)	
3. T 10 untreated	more than 1 %	225	64 (28.4)	0.09	316	95 (30.0)	8.11	326	184 (56.4)	1.45
		316	95 (30.0)		326	184 (56.4)		335	220 (65.7)	
4. E 3 treated	more than 1 %	228	20 (8.4)	0.01	237	20 (8.4)	4.70	199	32 (16.1)	0.62
		237	20 (8.4)		199	32 (16.1)		202	26 (12.9)	
5. P 0.5 untreated	more than 1 %	344	21 (6.1)	0.01	316	20 (6.3)	4.32	326	12 (3.7)	2.65
		316	20 (6.3)		326	9 (2.8)		335	18 (5.4)	
6. H 0.1 untreated	more than 50%	344	23 (6.7)	0.17	316	24 (7.6)	4.15	326	12 (3.7)	0.99
		316	24 (7.6)		326	12 (3.7)		335	18 (5.4)	

notice : this table shows only the groups who showed the significant different resistance between the two different plugs.

cork plug was changed to M-type on june 1974, so the one year's cases of 1973 were chosen as the representaves of cork plug and the cases of 1975 were that of M-type.

ることによって知ろうと考えた。対照はひき続いた1年間ずつ、コルク栓どうし、M型栓どうしの比較である。未使用群、既使用群に分け8剤18濃度、3耐性度（1%以上、10%以上、50%以上）について検討した。

成績 対照1、2には有意差なくコルク栓とM型栓間のみに有意差が認められたのは6剤であった。R・E・S・Tの4剤はM型が、P・Hの2剤は逆にコルク栓が高かった。

検査回数は、未使用群、既使用群、各濃度、3耐性度に分けたのでS・Hは18回、他は12回である。両対照間には有意差がなくコルク：M型栓間のみに有意差があった6剤中、Rは12回中8回、Sは18回中3回、Tは12回中2回、他は1回ずつで残りのものは有意差がないか対照も同時に有意差のあるものであった。なお対照のみに有意差があったのはコルク栓どうし3回（K1回S2回）M型栓どうしで3回（S・K・T各1回）、Mどうしおよびコルク栓とM型栓両方とも有意差のあったものの2回（S・C）であった。

8. 成績判定についての考察

Canettiらは耐性値を表すのに薬剤の濃度（concentration critique）とその濃度に耐性の菌の割合（proportion critique）の2つの示標を用いているが耐性値はできるだけ低濃度でしかも感性菌とは確実に区別される濃度でなければならない。またその濃度に含まれる耐性菌の割合は1%以上、とか10%以上等としている。1%とか10%等の低い耐性菌の割合は、それが低いほど測定は厳格でなければならない。

このためには対照の集落数が確実に数えられる必要がある（耐性培地の集落数は対照と同数か以下のはずである）。対照の集落数が多過ぎる例はより稀釈した第2の菌液または第1の菌液との組合せで測定する。また菌液の稀釈は1回限りとする。Canettiらの選んだ菌稀釈液は 10^{-3} と 10^{-5} 液を0.1ml接種する方法であった。この2稀釈液で測定できぬ場合は再検査する。

対照の集落数は100~200が理想であるが、厳格にし過ぎると1菌液で測定しうる人数がわずかとなる。われわれはこの数を50~300と仮定したところ、 10^{-3} 液ではわずか7%しかなかった。

ただ耐性培地の集落が0の場合は対照は100以上ならいくらあってもよい。最近の初回例はこのような例が極めて多いので、初回例を主に取り扱う施設では再検査例はまれであろう。

耐性培地の集落が0の場合は対照は100が望ましいが、耐性培地に集落があれば、対照の集落は50以下でもよからう。

ところでわれわれは、1967年以来 10^{-2} と 10^{-3} のような高濃度の組合せを用いているが、これでは数えられる

Table 10 One Example of Our Judging (case 54-83)

bacillary suspension	control	S 4 μ g	E 2	R 10
10^{-2}	++++ ++	5000	4000	220
10^{-3}	++++ ++	+ π	0	0
10^{-4}	140 140			

notice : π microcolony.

数はわずか9%に過ぎなかった。残りの耐性値は 10^{-4} または 10^{-5} の集落数をもととして算出されている。 10^{-3} の耐性培地の集落数が多過ぎるものは普通法そのもので proportion method とは言われない。

検査室からの報告では 10^{-3} の成績を無視し 10^{-2} の成績を採用している場合もあったが、本論文ではこれをいちいち原簿と照らし合わせ、 10^{-2} の対照が50~300の場合（1%しかない）以外は 10^{-3} の成績に統一した。例えばTable 10では 10^{-3} の対照は 10^{-4} の数の10倍、すなわち1,400個に対しS 4 μ gでは微細菌1個、E・Rはともに0ゆえ耐性値はいずれも0%とした。

S 20, H 1, C 20, 30等のように 10^{-2} にのみ菌接種したものは proportion method としては採用すべきでなかったが、参考までに記載したに過ぎない。

微細菌集落で数の記載のないものは1個とし、他は記載の数字にしたがった。また 10^{-3} の耐性培地上の集落が多過ぎ++等の符号で記載してあるものは本論文に限って耐性度を+は10%、 π は30%、 π 以上は50%以上と多少割引きして算定した。

普通法（absolute concentration method）では便宜上この符号を用いているが、対照の菌数が増すにしたがい曖昧さが増し、+はしばしば1%以下のものも含まれており、また対照菌数が 10^5 にもなると1%以下のものも50%以上に判定される可能性がある。

以上のように工夫はしてみたが、唯一の解決法は最良の2稀釈液の組合せ方である。

9. 2稀釈菌液の組合せ方と測定法の良否

前述のとおりわれわれも初めの頃は 10^{-3} と 10^{-4} の組合せであった。当時最初の80日間は、Hは0.1と1 μ gのみで次の28日間に0.2 μ gが追加され今日に至っている。つづいて 10^{-2} 、 10^{-4} となったが、1年2カ月後には、その後ずっと 10^{-2} 、 10^{-3} となってしまった。

ところで耐性の有無は薬剤の種類とその濃度で異なるので、ここではH 0.2 μ gを示標とすると感性例は1966年には28%に過ぎなかったものが、最近では85%にもなっている（Table 11）。

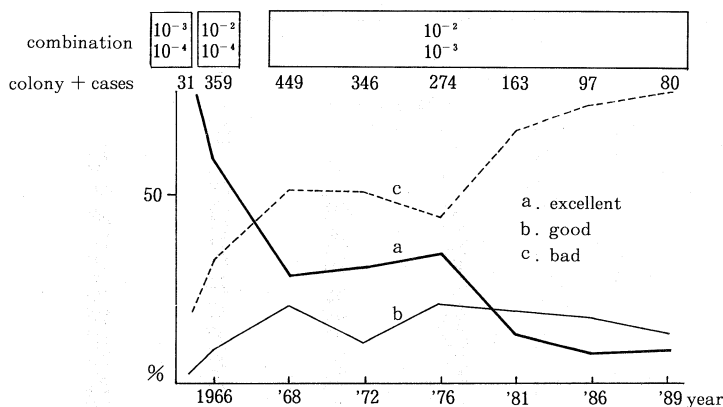
ところで最大稀釈液（第2稀釈液）を接種した耐性培地に集落があった場合、その耐性測定法は（Fig. 2）

Table 11 Yearly Change of the Sensitive Cases to 0.2 μ g of INH

combination mg/ml	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}					
	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}					
year	1966		68	72	76	81	86	89
sensitive %	12	215	320	446	508	464	465	456
	27.9	37.5	41.6	56.2	65.0	74.0	82.7	85.1
resistant %	31	359	449	348	274	163	97	80
	72.1	62.5	58.4	43.8	35.0	26.0	17.3	14.7
total	43	574	769	794	782	627	562	536

notice : cases were examined during 27 days and 8 month and 10 days in 1966, afterwards they were all cases of each year.

these cases include only those examined by indirect method.

**Fig. 2** Combination of 2- Dilutions and the Quality of the Resistance Test Method

notice : only the colony positive cases on the drug containing media were analysed when there were 50 or more on the control.

10^{-3} , 10^{-4} の組合せでは a が 77 % もあったが 10^{-2} , 10^{-4} では 57 %, 10^{-2} 10^{-3} では 30 % となり, 最近では 8 % までになってしまった。

また 10^{-3} 10^{-4} の組合せでは c は 20 % に過ぎなかったが, 10^{-2} 10^{-4} では 33 %, 10^{-2} 10^{-3} では 50 %, 最近では 77 % になった。

a は同一稀釈度で耐性値を計ったもので, proportion method としては最も望ましい測定法である。b は耐性培地上の集落数は数えられるが, その対照の集落が多過ぎ 1/10 また 1/100 の集落数をもととして算出されたもので, それだけ歪められた値になっている。c は耐性培地上の集落も多過ぎ対照と目分量で比較せざるをえない場合, すなわち普通法そのもので proportion method によるとはいえないものである。

10. 望まれる 2 稀釈菌液の組合せ

もし同一菌液一定量の集落数は常に同一であり, 稀釈

に応じた集落数を示すものなら, このような問題の提起はまったく必要がないであろう。

しかし, 上述の理由から何よりも同一稀釈液で耐性の割合を検出することが望まれる。さらに誤差をできるだけ少なくするため, 対照, 耐性培地とも 2 本ずつはぜひ必要である。

対照の集落数を, 理想は別としてわれわれは 50~300 までなら数えられる数と考え, 各稀釈液でこの数を含む割合を検討した。

Tween 使用前の 3,200 例では平均 10^{-4} 46.7 %, 10^{-3} 23.2 %, 10^{-5} 5.6 %, 10^{-2} 3.7 % であったが, かなり不安定であった。Tween を用いるようになってからはかなり安定して, 10^{-4} に集中するようになった。すなわち 1977~81 年の 5 年間に検査した 3850 例について年度別にみると 50~300 の集落数が得られた稀釈度は 10^{-4} が最も多く (60.3~66.7 平均 63.0 %) で, 次は 10^{-5} 14.0 %, 10^{-3} 7.2 %, 10^{-2} 1.1 % の順で 1 位と 2 位の差

Table 12 Distribution of Colonies to Each Classification
 on Drug Free Media (1977-81)

Classification by the Numbers of Colony	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
0	0	0	9	139
1 - 3	0	1	55	337
4 - 6	0	8	23	429
7 -30	0	32	285	1969
31 -49	1	24	156	421
50-300	41(1.1)	276(7.2)	2426(63.0)	555(14.0)
300<	3808	3508	896	0
total	3850	3849	3850	3850

notice : only the cases examined by indirect method were considered.

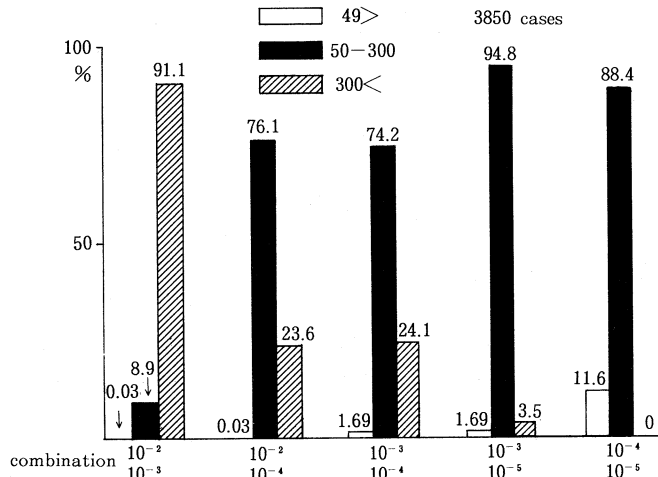


Fig. 3 Combination of 2 bacillary Solutions
 and Distribution of Numbers of Colony

が極めて大きかった。
次にこの数を最も多く含む 2 稀釈液の組合せを求めた。
50~300 を不足なくまた確実に数えられる数とし、2 稀釈液を 10 倍間隔にすれば、50~3,000 まで確実に数えられることになる。第 2 液の 31~49 は第 1 液に換算すると 310~490 となり、しかも確実に数えられた数である。第 1 液の耐性培地に 490 の集落があったにしても、その半分の 250 まで数えれば 50 %耐性といえる。proportion mothod では 50 %以上を完全耐性としている。
同様に 100 倍稀釈液の組合せでは 50~3 万個まで確実に数えられる。この際第 2 液の 4~49 個は耐性測定には少な過ぎるが、うち 4~6 個は第 1 液で 400~600 で、その際の耐性培地上の集落は 300 までは確実に数えられるので、完全耐性およびそれ以下の耐性値は全部確実に数えられることになる。

第 2 液の 31~49 は耐性培地に集落があれば第 2 液で

算定する。集落が 0 なら第 1 液を参考にする。
残り 7~30 は、第 1 液では 700~3,000 である。最高 3,000 に対し耐性培地の集落は 300 までは確実に数えられるので、10 %以下は正確に数えられる。proportion method では 10 %とか 1 %の値が感性か耐性の分かれ目になっている。
以上は 2 菌液が 10 倍または 100 倍になっていて、同量菌液の接種では常に同一集落が得られるという条件の場合の想定である。
100 倍稀釈液の組合せの場合耐性値を 50 %にとると第 2 液の 7~30 個の 10 %以上の耐性値はやや不確実となる。その実数は 3850 例中 457 例であるが現在 80 %が感性なので (365 例)、その差 92 例、全例の 2.4 %が 10 %以上の耐性値がやや不確実な例数である (Table 12 参照)。

このようにして測定した成績は Fig. 3 に示した。す

なわち原法の 10^{-3} と 10^{-5} の組合せは最も優れ (94.8 %), 次は 10^{-4} 10^{-5} の 88.4 % で, 10^{-2} と 10^{-3} の組合せは他の 4 組合せに比し余りに劣っていた (8.9 %)。また再検必要例は 10^{-3} 10^{-5} の組合せでは 49 以下が 1.7 %, 300 以上が 3.5 % 計 5.2 %, 10^{-4} 10^{-5} は 11.6 %, 10^{-2} 10^{-3} は実に 91 % であった。

11. 結 論

耐性検査の技術上の問題点を, proportion method を中心に検討した。

同一量の菌液を接種すれば常に同一数の集落数が得られ, 菌液を稀釈すればこれに比例して正確に集落数も減少するということが正しいとの仮定の下に, 2 稀釈液の組合せ方を比較すると, 原法 (10^{-3} と 10^{-5} の組合せ) が最も優れ, 94.8 % が正確に測定でき, また 1 %, 10 % の耐性値も確実に測定できる。ただし耐性値を 50 % に制定した際は, 2.4 % のものが 10 % から 50 % の間の耐性値を正確に測定することができなかった。また再検査の必要例は 49 以下 1.7 %, 300 以上 3.5 % 計 5.2 % であった。

10^{-4} 10^{-5} の組合せでは 88.4 % が確実に測定でき, 耐性値も 1 ~ 50 % の範囲は全例正確に測定できた。再検査の必要例は 11 % である。

10^{-2} 10^{-3} の組合せでは正確に数えられる数は 8.9 % のみで, 残り 91 % は再検査なしには普通法によるものと同じであった。

以上は, あくまで初めに述べた 2 つの前提が満たされた場合である。換言すればこの 2 つの前提がどこまで満たされるかが proportion method の最重要課題といえる。

測定誤差で特に目立つ点は, 耐性培地 (薬剤を含む) では 10^{-2} と 10^{-3} の差が極めて不安定で, 薬剤による差, ことにその低濃度による差ははなはだしいものがあった。

そのほか DH-SM と SM, 直接法と間接法, 栓の問題等にもふれたが, われわれの症例の耐性値が歪められたものが少なかったので, 他日改められねばならぬ点も少なくなろう。

proportion method は普通法に比しはるかに時間を要し培地も 2 倍以上を要するので, 単に日常検査だけでなく最も頻繁に使用する薬剤だけに限定し, 1 剤 1 濃度にすることも可能であろう。

謝辞は第 2 部が終わった後述べる。

文 献

- 1) Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du Bacille tuberculeux aux Drogues antibacillaires par la Méthode des Proportions. Rev tuberc Pneumol. 1963 ; T. 27 : 217-272.
- 2) Borrs Kreis. Résistance et Survivance du Bacille tuberculeux aux Médications antibacillaires. Masson et Cie Editeurs. 1966.
- 3) Canetti G, Wallace Fox, Khomenko A, et al. Advance in Techniques of testing mycobacterial Drug sensitivity and the use of Sensitivity Tests in Tuberculosis Control Programmes. Bull WHO. 1969 ; 41 : 21-43.
- 4) Canetti G. Present Aspects of bacterial Resistance in Tuberculosis. Amer Rev Resp Dis. 1965 ; 92, 687-701.
- 5) Meissner G. Some bacteriological Observations arising out of the international unions Chemotherapy Investigation. Bull IUAT. 1964, 34 : 187-190.
- 6) 二村 久 : 結核菌培養時における一新型ゴム栓 M 型の開発について, 医療. 1973 ; 27 : 33-37.