

原 著

抗 結 核 剤 の 耐 性 問 題

第 2 部 : 臨床耐性限界 その 2 . SM, INH, KM, EB

馬 場 治 賢

国立療養所中野病院

受付 平成 5 年 9 月 28 日

受理 平成 5 年 11 月 24 日

STUDIES ON THE PROBLEMS OF RESISTANCE TO ANTITUBERCULOUS DRUGS

II - 2 . Clinically Significant Critical Concentration of Streptomycin,
Isoniazid, Kanamycin and Ethambutol

Harukata BABA *

(Received 28 September 1993/Accepted 24 November 1993)

The proportion method demands an exact count of the colonies on the control and drug-containing media to calculate an exact percentage of resistant bacilli among bacilli-population. To realize this objective, the bacilli suspension must be fresh and homogeneous, susceptible and resistant bacilli must be equally distributed, each bacillus must be dispersed as a single cell when the bacilli suspension is diluted, colony count must be reduced at a rate parallel to the dilution.

The critical concentration of each drug should essentially be determined in a clinical manner, however as the multi-drug combination therapy in the rule for the treatment of tuberculosis, it is very difficult to make an exact determination of the resistance to each of drugs.

It may be better, as Canetti pointed out, to decide using the pure bacteriological method and later compare findings with clinical studies, making changes in the future if so required.

We choose to follow their criteria for nearly all of the drugs making only a few exceptions.

1) SM : DH-SM is not available in Japan as Japanese government prohibits its production. Growth on the medium containing SM (only concentration of less than 4 $\mu\text{g/ml}$) was more abundant than on DH-SM media.

Not knowing the fact that when an air-tight cap was used on the medium tube, the result of susceptible test shows 4-10 times higher resistance, we first used an air permeable cork cap. Futamura noticed the fact later and devised the M-type cap, which is air-tight originally, but allows air to flow into the tube automatically when needed. But such cap

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

seemed not necessarily to be expected when employed routinely in the case of a SM concentration of $4 \mu\text{g/ml}$.

Next for the clinical study, considering the combined triple-drug treatment and relapse rate of positive bacilli after six months and one year, we adopted an 1% SM solution ($10 \mu\text{g/ml}$) and the $0.2 \mu\text{g/ml}$ of INH as the clinically significant criteria.

2) RFP : Among previously untreated patients, 1,346 were tested using only the indirect method, revealing a critical concentration at $10 \mu\text{g/ml}$. Their critical proportions were 1-9% in 14 patients (1.0%) which might be technical mistakes, because retested 1/3 cases of them were found 0% to $10 \mu\text{g/ml}$ of RFP and the remaining 2/3 also must be 0%. For the detailed explanation, please see the literature (5).

There were also 3 patients whose critical proportion were 50% or more. They are the true primary drug resistance cases and they are 0.1% among total untreated 2,450 patients.

In the course of treatment including RFP, if resistant bacilli actually appeared in 1% of the total bacillary population at $10 \mu\text{g/ml}$ of RFP, its critical proportion always increased gradually and bacillary conversion was never attained. From these 2 reasons we adopted "1% growth on $10 \mu\text{g/ml}$ -RFP media" as clinically significant criteria.

The introduction of international standardization for resistance criteria is very problematic. Therefore in the meantime, it might be better to determine the most reliable, rapid and simple susceptibility test method, and present it for unanimous acceptance.

There are many weak points for egg medium : 1) loss of drug potency while making the media, (depending on the drugs, for example, RFP and KM decrease to 1/10 but there is no change in INH) : 2) difference between direct and indirect method, which also changes with the drugs and their concentrations, and 3) effect of the cap on SM resistance.

Potency reduction is nearly non-existent during the production of agar media and none of the weak points, described above for egg media have been found. Furthermore agar has a special characteristic ; its transparency.

Egg media or agar media, which will gain the winning votes ?

Key words : Air-tight or non air-tight cap, Proportion method, Drug resistance decided by pure bacteriological method, MIC of wild strain, Egg media or agar media, Anti-tuberculous drugs

キーワード : 気密性か通気性栓か, プロポーション法, 純細菌学的方法による耐性値, ワイルドストレインの最低阻止濃度, 卵培地か寒天培地か, 抗結核剤

Primary drug resistance の問題が騒がれた頃, 他の国々との比較が望まれたが, 測定法, 判定法が各国まちまちで, おおよその見当づけに終わった。

IUAT では一次薬 3 者についての国際共同研究¹⁾を行った。その際, 各国からの患者の菌はすべてヨーロッパ一流の 5 研究所に集め分担して耐性検査を行った。検査方法, 判定方法等あらかじめ綿密な打合せが行われたにもかかわらず, 成績は必ずしも一致せず正しい判定は出来なかった。

第 2 回の国際共同化学療法²⁾は, いわゆる二次薬によるもので, 前回同様すべての菌は前記 5 研究所に集められ, あらかじめ検査法についての打合せとともに, 今回

は proportion method と ratio method^[註 1]は両者とも必ず行うこととした。この時の二次薬は Tb₁, TH, PZA, CS, VM, KM で, これに SM, INH, PAS の一次薬の耐性検査も行った。

共通の耐性値はだれしも望んでいるにもかかわらず, 何故これが出来ないのであろうか。

[註 1] ratio method は H37Rv と被検菌の MIC を比較して耐性値を決定する方法で, もっぱら英国で行われている。

私は現在最も広く用いられている Canetti らの proportion method³⁾を 1965 年より routine の検査として実施し, 耐性値も極く一部を除いて同じ値を採用した。

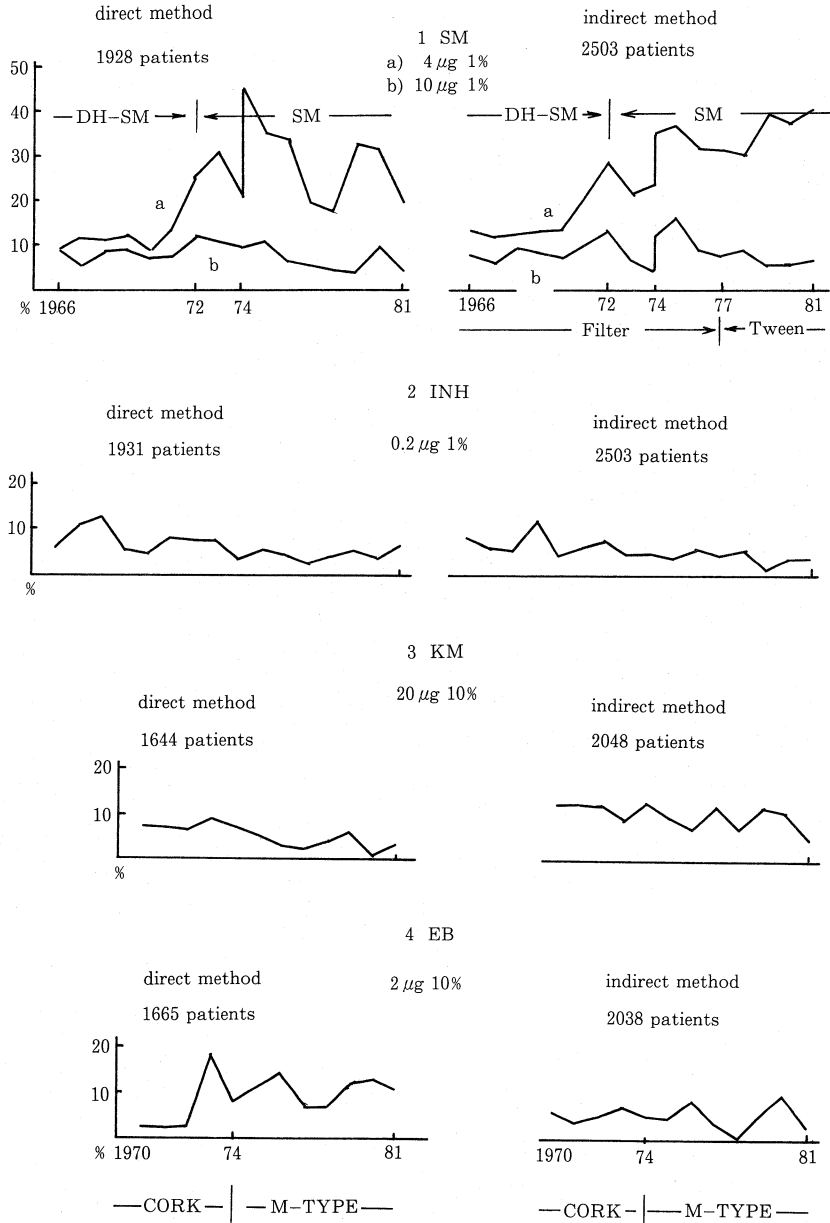


Fig. 1 Yearly Change of Resistance Rate in the previously untreated Patients with pulmonary Tuberculosis.

その結果は第一報⁴⁾で報告した通り種々の問題のため原法通りにはゆかなかった。

第2部の1⁵⁾で、現在わが国で最も広く用いられている5剤中RFPの問題を報告した。この回は残りの4剤について特に重要と思われる点のみを報告する。PZAの検査を行わなかったことは最も残念であった。

SM

1) DH-SM と SM

初回例（以下特に断っているもの以外は14日以内の使用例も含むものとする）についてDH-SM 1293例（1966年1月初めより72年2月7日までの例）とSM 773例（72年2月8日より74年6月7日までの例）の

Table 1 Bacteriological Investigation on SM

1) DH-SM and SM.

		4 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/ml}$
	no of patient	1 %	10%	1 %
DH-SM	1293	177 (15.7%)	163 (12.6%)	107 (8.3%)
SM	773	202 (26.1%)	175 (22.6%)	79 (10.2%)
		χ^2 33.69 P=0.0000	χ^2 33.69 P=0.0000	χ^2 1.85 n. s

2) Direct- and indirect method.

		4 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/ml}$
	no of patient	1 %	10%	1 %
direct	1644	414 (25.2%)	350 (21.3%)	132 (8.0%)
indirect	2048	630 (30.8%)	534 (26.1%)	187 (9.1%)
		χ^2 7.86 P<0.01	χ^2 7.06 P<0.01	χ^2 1.16 n. s

notice : In this 2) all the primary cases, tested by indirect method were considered, during the first 2 years DH-SM and during the following 10 years SM were used.

3) a : Influence of the cap at the early stage of changing.

		direct method		indirect method	
	no of patient	4 $\mu\text{g/ml}$	1 %	no of patient	4 $\mu\text{g/ml}$ 1 %
cork	54	11 (20.4%)		65	16 (24.6%)
M-type	62	29 (46.7%)		154	55 (35.7%)
		χ^2 4.44 P<0.01		χ^2 1.36 n. s	

3) b : Comparison of the result of long term observation with M-type cap.

		direct method		indirect method	
M-type	no of patient	4 $\mu\text{g/ml}$	1 %	no of patient	4 $\mu\text{g/ml}$ 1 %
before	289	78 (27.0%)		484	124 (25.6%)
after	1088	306 (28.6%)		1277	456 (35.7%)
		χ^2 0.08 n. s		χ^2 8.45 P<0.005	

notice : 1) before..... before 2 years patients, after..... after 6.5 years patients. 2) Clinical significant criteria on SM 4 $\mu\text{g/ml}$ 1 % which Canetti et al strongly insisted, is confirmed by innumerable clinical facts and were widely accepted. But our data on SM were caused by different resistant test method (SM instead of DH-SM, permeable- instead of air tight cap) and we were obliged to adopt 10 $\mu\text{g/ml}$ 1 % as criteria tentatively.

4) Microcolony

all cases	4 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
3692	471 (12.8%)	48 (1.3%)

Table 2 Clinical Investigation

1) Bacilli positive cases after 6-months combined treatment with SM-INH-PAS

		all cases bac.(+)				all cases bac.(+)	
original cases	a	538	2	retreat case	a	264	4
	b	34	1		b	39	2
	χ^2 3.17		χ^2 2.14				
	n. s		n. s				
a+b	572	3	a+b	303	6		
c	20	1	c	37	6		
χ^2 5.47		χ^2 16.54					
p 0.025		p 0.003					

2) relaps rate

		all cases relapse				all cases relapse	
original cases	a	538	8	retreat case	a	264	2
	b	34	1		b	39	4
	χ^2 0.41		χ^2 14.21				
	n. s		p 0.003				
a+b	572	9	a+b	303	6		
c	21	1	c	37	8		
χ^2 1.16		χ^2 25.93					
n. s		p = 0.0000					

3) Resistant grade of the cases who were bacilli positive after one year treatment with SM, INH and PAS

	SM	INH	PAS
a)	76%	88%	63%
b)	61%	85%	60.2%
c)	28.5%	39.5%	43.0%

比較である。ともにコルク栓使用。Table 1の1に示す通り 4 μ g 1%以上も 10%以上もともに SM が極めて高値 (P = 0.0000), 50%以上でも同様 (P < 0.0003) で直接, 間接に分けても常に SM が有意に高かった。しかし 10 μ g では有意差は全くなかった。Canetti らの原法は 4 μ g 1%を耐性値としていたが 1969年には 4 μ g 10%⁶⁾に変更された。

2) 直接と間接 (Table 1~2)

同一症例で直接と間接を行った症例は少数なので, ここでは 1970 年以後 12 年間に行った初回例についてのみ検討する。したがって初めの 2 年余は DH-SM, 以後は SM, また初めの 5 年半はコルク栓, 以後は M 型栓によっている。また菌液調製に初めの 7 年半は口過菌液, 後の 4 年半は Tween 80 によるもので, 直接と間接の比較はこれらの因子が絡みあったものである。入院時痰の菌がガフキー 7 号以上は直接法, 以下は間接法によった。表の通り 4 μ g では 1%以上でも 10%以上でも間接法

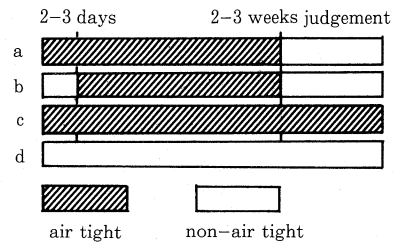


Fig. 2 Air-tight or not during cultivation of tubercle bacilli (Futamura)

が有意に高かった。50%以上では有意差はなかった。また 10 μ g では有意差は全くなかった。

3) コルク栓と M 型栓

M 型栓は二村⁷⁾の考案によるもので密閉式であるが, 酸素が必要な時のみ空気が流入するよう工夫されたゴム栓である。二村はこの栓を作るに当たって次のような実

験を行っている。塗抹陽性の喀痰 20 例を用い、コロニー数が 50~100 個になるよう稀釈、20 本の培地に接種、これを 5 本ずつに分け abcd 4 つの通気の方で培養した (Fig. 2)。

その成績は a が最も菌数多く集落も大きい。b は菌数は a に匹敵するが集落は小さい。c は菌数も少なく集落も小さい。d は集落は大きいが菌数が少ない。a は M 型、b は pasteur 研、d はコルク栓である。

Meissner⁸⁾ は密栓は通気栓より耐性値が数倍高く出ることを証明している。

Fig. 1 の 1 および Table 1 の 3a で直接法 4 μ g 1 % でコルク栓を M 型に替えた年 (1974 年) の前半、コルク栓による 54 例では、同年の後半 M 型栓に替えた 62 例の方が有意に高耐性値 ($P < 0.01$) を示したが、間接法では同じく M 型栓がより高い耐性値を示した有意差には至らなかった (Table 1-3a)。また、直接法 4 μ g 1 % の経過をみると (Fig. 1 および Table 1-3b)、同じ M 型栓を使っているにもかかわらず耐性値は次第に低くなり、4 年後にはコルク栓の最高値 (1973 年) よりはるかに低耐性値となり、一時またある程度上昇したがまた低くなった。

Fig. 1 の直接法で 1972 年から 74 年前半までの約 2 年半の 289 例 (コルク栓) では 4 μ g 1 % 以上の耐性例は 78 例 (27 %) であったが、74 年後半から 81 年までの 1,088 例 (M 型栓) では 306 例 (28.1 %) で全く有意差はなかった。間接法で同じ両期間を比較したところ、前期 (コルク栓) では 484 例中 4 μ g 1 % 以上の例は 124 例 (25.6 %) で、後期 (M 型栓) では 1277 例中 456 例 (35.7 %) で χ^2 は 8.45 ($P < 0.005$) で M 型栓がはるかに高い耐性値を示した。この原因は明らかでない^(註 2)。M 型栓を再試用したためとも考えたが、直接法では使用開始の直後には M 型栓が高度に耐性値が高かったのに長い期間でみると差がない。逆に間接法では初期には有意差以下の差で長い経過をみると M 型が有意に高い。以上は 4 μ g についてであって、日本では全く考慮されていない値である。10 μ g 以上では両者間に全く差がなかった。

[註 2] この原因の一つは 1977 年より間接法では接種菌の均等化のためそれまで口過菌を用いていた代わりに Tween 80 を用い始めたこととも関係があることは確か⁹⁾ であるが真の原因は分からない。

4) 微細コロニー

Canetti は、微細コロニーはしばしばみられるところであるがどんなに小さくても確実に数えることは絶対必要と言っている。4 週判定が出来ねば 6 週判定する。アメリカの Guide-book⁹⁾ では顕微鏡でみることを推めている。私どもの経験では微細コロニーはコロニー数が 50 以下のものに、またより低い耐性値、例えば SM は

4 μ g, EB 2 μ g, KM 20 μ g に頻発、より高い濃度では大部分菌そのものが生えていなかった。また INH は 0.1 μ g でも微細コロニーは極めて稀であった。

5) 臨床面より (Table 2)

私ども¹⁰⁾ は臨床耐性規準として 3 規準を仮定した。

	SM	INH	PAS
a (規準 1)	4 μ g 1 % >	0.1 μ g 1 % >	0.5 μ g 1 % >
b (規準 2)	" 1 % \leq	" 1 % \leq	" 1 % \leq
c (規準 3)	10 μ g 1 % <	0.2 μ g 1 % <	1.0 μ g 1 % <

症例は moderate advanced と far advanced のみで合併症のない例、治療開始時は全例規準 1 のものを選んだ。初回例 592 例、既使用例 340 例である。

SM-INH-PAS の 3 者併用を行い、6 カ月目なお菌陽性例を検討した。Table 2 の 1 の通り初回例では a と b の間には有意差なく、a + b と c の間には有意に c が劣っていた ($P < 0.025$)。既使用例でも同様に a と b の間には有意差なく、a + b と c の間では c が高度に劣っていた ($P < 0.003$)。

次に再発率を検討した (Table 2-2)。ここで再発とは 3 カ月以上陰性がつづいた後再排菌したものをいう (観察期間は治療開始から 1 年以内の例に限った)。Table 2-2 の通り初回例では a と b の間、a + b と c の間ともに有意差はなかったが、既使用例では a と b の間にも高度の有意差がみられた ($P < 0.003$)。

なお 1 年以上治療して無効例を 3 つの判定規準でみると、c の規準を耐性とすると 1 年治療しても無効なのに耐性例は約 1/3 に過ぎないことになる (Table 2-3)。

初回耐性の文献で中野病の例と比較するため Proportion method で行った発表のみを探した。第 1 は Thibier ら¹¹⁾ のもので 1958~60 年の 3 年間 Lycée の学生の初回耐性についてである。耐性規準は INH 0.1 μ g, SM 4 μ g, PAS 0.5 μ g 全例 100 % であった。中野病の例は 1966~69 年 4 年間の例である。Thibier らの例は Pasteur 研, proportion method で菌培養は接種後 2~3 日は綿栓次いで封蠟する方法で DH-SM である。中野病の例は約 7~8 年後のもので同じく DH-SM。ただし栓は始めから通気性のコルク栓であった。

例数	INH		SM		PAS	
	0.1 μ g (100%)	4 μ g (100%)	4 μ g (100%)	0.5 μ g (100%)	0.5 μ g (100%)	0.5 μ g (100%)
Thibier 等 182	14 (8 %)	17 (4.0 %)	17 (4.0 %)	2 (1.0 %)	2 (1.0 %)	2 (1.0 %)
中野病 741	59 (8 %)	64 (8.7 %)	64 (8.7 %)	50 (6.8 %)	50 (6.8 %)	50 (6.8 %)

INH の初回耐性は共に 8 % であったが、SM は中野病が 2 倍近く高かった。中野病でも密栓にしていたらこの差はさらに大きくなったと思われる。PAS が中野病ではるかに高い理由はよく分からない。

第 2 の発表は Canetti ら¹²⁾ のフランス全国の初回耐性である。1962 年 11 月 1 日より 64 年 7 月末日までの

フランス在住の外国人を含めての調査であるが、ここではフランス人のみについての成績を前述の中野病の例と比較した。

耐性値は Canetti らはさらに幅広くした。すなわち

SM	1) 4 μ g	1% <	2) 2 μ g	50% <	3) 両者
INH	1) 0.2 μ g	1% <	2) 0.1 μ g	10% <	3) 両者
PAS	1) 0.5 μ g	1% <	2) 0.25 μ g	10% <	3) 両者

中野病の耐性値は上記1)のみである。ともに DH-SM 栓は前回と同じ。

	INH		SM		PAS	
	例数	0.2 μ g 1% <	4 μ g 1% <	0.5 μ g 1% <		
Canetti 等	1802	74(4.1%)	128(7.1%)	36(2%)		
中野病	741	60(8.1%)	90(12.1%)	65(8.8%)		

今回は INH の耐性が中野病が 2 倍高くなったが、SM, PAS では前回よりかえって幅が少なくなった。

INH

INH は現在知られている抗結核剤のうち最も安定し、直接間接の差もほとんどなく、栓の影響も受けていない (Table 3, Fig. 1)。また卵培地と寒天培地の差もない。にもかかわらず世界中の耐性判定はまちまちである。Canetti¹²⁾ は中等度の耐性ある 113 例を当時実際に行われていた 8 つの規準で判定したところ、BMRC の規準では 99% が耐性、Veteran Administration の規準では 24% が耐性であった。日本の規準 (1 μ g 完全耐性) では 63% が耐性ということになる。このように検査が明らかにされているにもかかわらず判定が一致しないのは、純細菌学的あるいは純臨床的以外の考慮が含まれているためではなかろうか。実地においては各施設の検査法も

Table 3 INH (bacteriological investigation)

1) Direct- and indirect method.

	all cases	0.2 μ g/ml 1%	
direct method	1664	83 (5.0%)	0.02
indirect method	2051	101 (9.9%)	

2) Influence of the cap.

	all cases	0.2 μ g/ml 1%	
cork	660	41 (6.2%)	1.05
M-type	660	32 (4.8%)	

3) microcolony

	all cases	2 μ g/ml	3 μ g/ml
	3695	4 (0.1%)	4 (0.1%)

異なり、検査値そのものも異なっている。

Rist¹³⁾ は、INH 0.1 μ g に完全耐性で 0.2 μ g, 0.5 μ g に感性的な例で無効な例を多数経験していると述べている。私は 0.2 μ g に 0% の 4,166 例について検討したところ 97.9% は 0.1 μ g にも 0% であったが、1% 以上は 87 例 (2.1%) であった。後者のうち 10% 以上は 54 例 (1.3%), 50% 以上は 32 例 (0.8%) であった。

なお中野病での 1966 年 1 月より 16 年間の初回耐性の (0.2 μ g 1% 以上) 推移は Fig. 2 の通りである。

Table 4 KM (bacteriological investigation)

1) Direct- and indirect method.

	all cases	20 μ g/ml 10%	
direct method	1644	65 (4.0%)	40.82
indirect method	2048	201 (9.8%)	

P = 0.0000

2) Influence of the cap.

	all cases	20 μ g/ml 10%	
cork	659	57 (8.6%)	3.19
M-type	661	39 (5.9%)	

n. s

3) Microcolony

	all cases	20 μ g/ml	50 μ g/ml
	3692	371 (10.0%)	14 (0.4%)

Table 5 EB (bacteriological investigation).

1) DH-SM and SM.

	all cases	2 μ g/ml 10%	
direct method	1665	148 (8.4%)	15.42
indirect method	2038	109 (5.3%)	

P = 0.0003

2) Influence of the cap.

	all cases	2 μ g/ml 10%	
cork	660	46 (7.0%)	1.92
M-type	661	61 (9.2%)	

n. s

3) microcolony

	all cases	2 μ g	3 μ g
	3673	191 (5.5%)	6 (0.2%)

KM

Fig. 1, Table 4 にみられるように、20 μg 10% を耐性限界とし直接と間接と比較すると間接が高度に高い ($P=0.0000$)。20 μg 1% 以上では間接がさらに高い。50% 以上も、50 μg 1% 以上もともに間接が有意に高かった。しかしコルク栓とM型栓の差はなかった。微細コロニーは20 μg には極めて多く、50 μg ではほとんどなかった。

1968年の初めよりKMの耐性検査は全例30, 40, 50 μg について行った。残念ながら20 μg は行っていない。総数398例。

30 μg = 50 μg	379 例	{	共に0%	319例
	(95.2%)		共に ∞	52例
			共に+	8例
30 μg > 50 μg	19 例			(4.8%)

以上の成績から主耐性値を20 μg 10% とすれば、副耐性値は30 μg 1% 以上が50 μg よりよりよいと思われる。Canettiの原法もそうになっている。

一般に耐性値は間接法になっている。KMは間接が抗結核剤中では飛びぬけて高いが、やはり間接法の成績によらねばならない。初回耐性値は1970年から12年間ほとんど一定であった (Fig. 1)。

EB (Table 5)

2 μg での直接と間接の比較では1%以上、10%以上ともに間接が有意に低い ($P<0.003$)。しかし50%以上および3 μg 1% 以上では有意差はなかった。

初回耐性例の年度別変動をみると (Fig. 1), 特に直

接法ではSMに次いで変動はなほ大きく、初めの2年間は3%以下であったものが以後10%あるいはそれ以上になった。個人的経過でも、感性かと思うと耐性になったりして判断に迷う例が時々みられた。患者自体の耐性値の変動か、測定技術によるものかより深い洞察の必要を痛感した。微細コロニーは2 μg に多く、3 μg にはほとんどなかった。

討 論

もともとCanettiらの耐性値は純細菌学的にきめたものである。本来は臨床的にきめるべきであるが、2~3剤を併用している現在、確実に1剤の耐性をきめることは至難の業で、細菌学的方法によらざるを得なかった。この方法できめた耐性値と臨床との不一致は、別に考慮せねばならぬと言っている。

細菌学的方法とは wild strain の MIC を求めその中間値以上を耐性値とすることである。例えばINH 0.2 μg 1% は wild strain の中間値0.0005の2,000倍、最高値の250倍になっている。二次薬は一次薬に比しこの割合ははるかに少ない。

耐性値は critical concentration (耐性濃度) と critical proportion (耐性割合) の2つから成り立っている。耐性濃度は耐性が感性かを分ける基本的なもので、割合は耐性の度合いを示すものである。よりよい耐性値とは、

1) どんなに低い耐性値も見逃さないが、感性例まで耐性としてはならない。

2) 耐性値は wild strain の中間値以上でなければならぬ。

Table 6 Comparison of Clinical Significant Resistance Criteria of Various Drugs between Several Laboratories

	France 1969 proportion method L-J medi.	U. S. A. 1985 proportion method Agar medi.	Unit. Kingd 1969 ratio method L-J med.	Germany 1969 *** absolute con. method L-J med.	Japan 1975 absolute con. method Ogawa med.	NAKANO C. H. 1966 proportion method Ogawa med.
INH	0.2 μg	0.2 μg	0.2 μg	0.2 μg	1.0 μg	0.2 μg
RFP	40.0	1.0			50.0	10.0
SM	4.0*	2.0		5.0	20.0	10.0**
EB	2.0	5.0**			5.0	2.0
KM	20.0	5.0			100.0	20.0

note : * Originally it was 1.0%, but was changed to 10% on 1969.

** This is 2 μg 1% due to H. L. David.¹⁴⁾

*** In East Germany, at first vertical diffusion method exclusively had been used but after precise comparative study it was changed to proportion method as national policy since 1975.¹⁵⁾

**

** At first we used 4 μg 1%, but because of we couldn't use DH-SM and the difference of the cap, we changed to 10 μg 1% tentatively.

3) 耐性割合は治療期間が長びくに併行して上昇する。一次薬は90%以上になるが、二次薬は高々50%位にしかならない。

一次薬の特長は、通常の服薬量で達しうる血中濃度が試験管内の発育阻止濃度の30~50倍であるのに、二次薬では高々10倍である。

このようにして細菌学的にきめられた耐性値と他の国々の耐性値をTable 6に示す。

私どもはCanettiの原法に従ったのであるが、SMとRFPは前述の理由で異なっている。

冒頭に述べたように各国の耐性値が余りにまちまちであるので、国際的統一の希望はだれしも望むところと思われるが、その道は遠いようである。しかしこの希望に一步でも近づくためには、次のような最も大切な点の解決がまず必要と思われる。

1) 採取菌の新旧

耐性検査のための採種菌は、すべて発育の盛んな新しい菌が望まれる。理想的には固形培地では接種後10日目、液体培地では1週目の菌を接種する。Trudeau¹⁵⁾では固形培地10日目の菌であった。私どもの所では、固形培地で4週判定後遅くもその2週以内の菌を用いている。

2) 菌液の均等化

結核菌は自らは動かないので、菌は全体的に菌塊を作り耐性菌は耐性菌どうし集まっている。Fenner¹⁷⁾はTween albumin液に培養した菌液でも口過しないと少なくとも80%は5個以下の菌塊を作っているという。したがって使用に当たっては常に軽く遠沈しつづいて口過している。79%バラバラになった菌液を浄水、0.1% bovine albumin液およびM/15のdisodium hydrogen phosphate液中加入して、時間おきに観察したところ、0.1% bovine albumin液中では24時間100%バラバラであったが、他の2液では2時間後には再凝集した。

固形培地の場合は菌塊を培地全面よりかきとり硝子玉のはいったフラスコ中で短時間振盪した後浄水を加えて標準液と濁度調整する方法、さらにこの液を遠沈あるいは一夜静置後上清を用いる方法、口紙で口過する方法、短時間超音波をかける方法等が提案されている。菌液の均等化は耐性検査法中の最も重要なものの一つである。

菌液の稀釈は最も厳密に行ってもコロニー数は併行して減少しない。Bercea¹⁸⁾の研究では、 10^{-5} mg/ml液0.2 ml接種した菌の平均値は19.25、 10^{-6} では1.92ではなく3.81、 10^{-7} では0.38でなく0.44であった。Berceaはすべて化学ピペットで菌液を1.0 ml、浄水を10 mlのピペットで9 mlとってよく混合した後、ピペットを取替えて次の稀釈を行った。各稀釈液から0.2 mlずつ接種、各稀釈液ごとに40~43本ずつ接種した

成績である。

私どもの所では、最初の10年間は口紙による口過菌液を用いていたが、技術者が発病したため以後は口過は中止しTween 80の10%液1滴を中試験管にとり、固形培地全面からかきとった菌塊5~10 mgをこの中に入れ、直径6 mmの硝子棒で試験管壁で丹念に摩擦した後浄水を加え標準液と濁度調整を行った。その結果、 10^{-5} 菌液0.1 ml接種した菌数が10個から100個あった割合は口過法では40%、Tween 80では75%、また20個から100個だと22%と50%とTweenの方がはるかに勝れていた。新鮮な菌液を用い、さらに工夫すれば、よりよい成績が期待されることは確実である。

3) 接種菌量

absolute concentration methodでは接種菌量の一定が特に大切で、菌量が常に変わるようでは検査自体行わない方がよいとまでいわれている。

Meissnerは仮に50個の耐性菌があっても、それが臨床的に有為なためには全菌数は5,000個(すなわち耐性菌は1%)なければならないと言っている。

Brandon¹⁹⁾は、Pasteur研の長年の成績が 10^{-5} の菌数が20, 50, 100の割合であったというので、極めて綿密な数学的計算と実験の後、80%以上の精度で同じ成績を再現するためには、一次薬(SM, INH, PAS)では2,000~10,000、二次薬では200~1,000個の菌を接種する必要があるという。

4) 卵培地と寒天培地

日本は戦後アメリカの占領下にあつて、全部アメリカの規準を受けついでいた。アメリカが寒天培地になったので日本でも一時使ってみたが、雑菌がはいりやすい上に寒天培地の必要性が十分理解できなかった。

柳沢はKM²⁰⁾の耐性検査に際し、卵培地は寒天培地に比し力価が余りに下り使いものにならないとして寒天培地の成績を発表している。力価減弱はそのほかSM(1/4~1/2) RFP(1/10)等にもみられている。のみならず初回例での直接と間接の差もまちまちで、例えばRFP 10 μ g 1%では直接が飛びぬけて高く、EB 2 μ g 10%でも直接が極めて高い。一方、KMは20 μ g 10%で間接が高度に高い。また、薬剤によっては差がほとんどないものもある。

アメリカ⁹⁾では7H10培地が粉末状にして販売されている。また耐性検査用の薬剤は、Disc²¹⁾としても発売されている。

結 論

1) proportion methodでは対照の菌数も耐性培地上の菌数も正確に数えることが絶対必要である。

2) 耐性検査用菌液は新鮮で、個々バラバラになっている極めて均等な菌液であること、稀釈に併行して同じ

割合にコロニー数の減少が必要である。

3) 小川培地での臨床耐性限界は間接法によることを前提として、RFPは10 μ g 1%とし補助として20 μ g 1%も行う。SMはDH-SMが使用不能、栓の関係その他で10 μ g 1%、INHは0.2 μ g 1%を主とし0.1 μ g 10%も附加する。KMは20 μ g 10%と30 μ g 1%、EBは2 μ g 10%と3 μ g 1%とする。

4) 国際統一を希望し、その前提としての耐性検査上の最重要と思われる2, 3の問題点について述べた。

5) 卵培地と寒天培地の優劣について、卵培地の欠点について種々述べたが、寒天培地についても欠点の有無、程度をより深く探究するとともに、両者の勝れた点についても比較し、両者の終局的優劣を決定することが大切と思われる。

稿を終るに当たって多くの方々に陰になり日向になって御援助を頂いた。

医局関係では第一に吾妻洋君をあげねばならぬ。在局時に常に私の側にあって研究の手伝いをして頂いた。既使用例におけるRFP 0.9gの使用のし方についての私の考え方は、彼の症例の示唆によるものである。新海明彦、井樋六郎両名誉院長には私の研究を励まし不明の点の解明を助けて頂いた。そのほか医局の諸先生には無理な治療法、期間等多くの注文をしたにかかわらずよく助けて頂いた。

検査関係では proportion method を心よく引きうけ、その改善のため全力を尽した斎藤千別君と、私の細かい臨床検査を綿密に実施して頂いた故二村久君の2人には特に感謝を捧げたい。

病歴係の戸戸弘子女史は結核患者が退院時その病歴を私の部屋に運んで頂いた。これによって入院例の結核患者全例を把握できた。

病院外では八千代銀行頭取新納太郎氏、同銀行コンピュータ部門部長小泉次郎氏および豊原弘美氏に本研究の初期、研究の方向づけのため多大の援助を頂いた。

ここにこれらの方々へ深甚の感謝を捧げる。

文 献

- 1) IUAT Trial : An international investigation of the efficacy of chemotherapy in previously untreated patients with pulmonary tuberculosis. Bull IUAT 1964 ; 34 : 79-191.
- 2) The second cooperative chemotherapy trial of the union. Bull IUAT. 1969 ; 42 : 7-57.
- 3) G Canetti, et al. : Mesure de la sensibilite du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par methode des proportions. Rev tuberc et poumon. 1963 ; 27 : 217-272.
- 4) 馬場治賢, 他 : 抗結核剤の耐性問題 第1部, 結核. 1992 ; 67 : 595-605.
- 5) 馬場治賢 : 抗結核剤の耐性問題 第2部 臨床耐性限界 その1, 結核. 1994 ; 69 : 387-396.
- 6) Symposium : Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull WHO. 1969 ; 41 : 21-43.
- 7) 二村 久, 結核菌培養時における一新型M型の開発に就て, 医療. 1973 ; 27 : 33-38.
- 8) G Meissner : Some bacteriological observations arising out of the international unions chemotherapy investigations. Bull IUAT. 1964 ; 34 : 187-190.
- 9) Public health mycobacteriology : A guide for the Level III laboratory. 1985, US Department of health and human services C.D.C., Atlanta Georgia 30333.
- 10) 馬場治賢, 他 : SM, INH, PAS の臨床耐性限界, 結核. 1972 ; 47 : 353-360.
- 11) R Thibier, et al. : Bacilles résistantes d'emblee en milieu universitaire pendant les années 1956-1960. Bull IUAT. 1962 ; 32 : 113-117.
- 12) C Canetti, et al. : Frequence et caracteres de la resistance primaire dans 2144 cas de tuberculose pulmonaire non encore traitee provenant de diverses region de France. Premier rapport du centre d'études sur la resistance primaire. Rev tub et pneumologie. T 28 : 1115-1156, 1964.
- 13) Symposium : Clinical significance of bacterial resistance tests. Bull IUAT. 1957 ; 27 : 212-279.
- 14) Text Book : Clinics in chest medicine, Tuberculosis. may 1980. Saunders.
- 15) R Kalich, et al. : Vergleichende Resistenzbestimmungen von Mykobakterien mit dem vertical Diffusionstest und der proportion methode (economical test). Z Erkr Atem. 1974 ; 140 : 242-252.
- 16) USPHS cooperative investigation. Prevalence of drug resistance in previously untreated patients. amer rev resp dis. 1969 ; 89 : 327-336.
- 17) F Fenner : The enumeration of viable tubercle bacilli by surface plate counts.

- amerc rev tub. 1951 ; 64 : 353-380.
- 18) O Bercea, et al. : The disproportionality between colony count and dilution of the inoculated suspension in quantitative culture of mycobacterium tuberculosis. Tubercle. 1968 ; 49 : 310-317.
- 19) JG Brandon, et al. : Statistical aspects of the proportion method for determining the drug-resistance of tubercle bacilli. Scand j resp dis. 1969 ; 50 : 1-18.
- 20) 熊谷袋蔵, 柳沢 謙 : カナマイシン耐性検査法の研究, 日本医事新報. 1838, 3-6. 昭和34年7月18日.
- 21) Notes : Cooperative field test of drug impregnated discs for susceptibility testing of mycobacteria. amerc rev resp dis. 1971 ; 103 : 423-426.