

結核菌の抗結核剤に対する 耐性検査法について

第1報 固型培地に抗結核剤を流しこむ簡易法について

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

平沢 亥佐吉

(受付 昭和29年11月1日)

(この論文は昭和29年2月28日、文部省科学研究費・結核研究班・化学療法研究科会及び、昭和29年3月結核病学会関東地方会において発表した。)

1 緒言

耐性検査には固型培地による直接法が専ら使用されるようになってきたが、この場合の耐性検査用培地は、予め抗結核剤を鶏卵液と、基汁との混合液に加え、これを凝固して作っておく事が必要である。このため加熱による抗結核剤の力価の減少を考慮せねばならず、保存期間による力価の減弱も考えねばならぬ。又急を要する場合、耐性検査が出来ないという不便もある。このような事から固型培地を用いて簡単に耐性検査を実施出来る方法がないかと、従来の中試験管に凝固した培地により研究を進め、期待出来る成績を得たので報告する。

2 実験方法

a) 培地の作り方

培地 A: 従来の耐性用固型培地の製法によりつくつた。すなわち 1% 或いは 3% KH_2PO_4 培地の凝固前の基汁と卵液の混合液に、Dihydro streptomycin (DHSM), Paraaminosalicylic acid (PAS) Tb_1 , Isonicotinic acid hydrazid (INAH) の所要培地濃度の 50 倍の溶液を、50:1 の割合に加えて、培地 1cc につき、10, 8, 6, 4, 2, 1, 或いは 10, 5, 2.5, 0.6, 或いは、1000, 100, 10, 1 γ /cc 等の系列をつくり、滅菌中試験管に 5cc 宛分注し、90°C, 1 時間で滅菌凝固を行った。

培地 B: 5cc 宛分注して凝固した 1% または 3% KH_2PO_4 培地に、上記各抗結核剤の所要培地濃度の 50 倍液 0.1cc 宛、すなわち培地 A の場合と同じ割合に分注し、斜面を充分にうるおして、斜面を上にして斜面面に水平になるようねかせ、1 昼夜 37°C の孵卵器中に放置し、大部分乾燥させたのち使用した。すなわち培地 1 本中に含まれる抗結核剤の量は、A, B 両培地は同量であり、A 培地において、SM の凝固のさいの加熱による力価の減少は全然考慮に入れてない。

b) 実験手技

この A, B 両培地を用いて、実際に耐性検査を行つてその成績を比較した。主として塗抹陽性の喀痰を用いて直接法を行つたが、なお一部菌液による間接法も実施した。すなわち、直接法では SM, PAS, INAH の場合は喀痰を 4% NaOH で 5 倍に稀釈し、その 0.1cc を、3% KH_2PO_4 培地を合にしてつくつた A, B 両耐性培地に接種した。Tb₁ の場合のみは喀痰を 4% NaOH で 5 倍に稀釈し、20% HCl でフェノール・レッドを指示薬として中和後その 0.1cc を、1% KH_2PO_4 培地を合にして作つた A, B 両耐性培地に接種した。

次に菌液による間接法では、すべて 1% KH_2PO_4 培地を合にして作つた A, B 両耐性培地を用いて行つた。すなわち培養 3~4 週の集落を白金耳でかきとり秤量し、磨砕ホルベン中で磨砕し滅菌蒸溜水にて稀釈し、1cc 中 1mg の菌液をつくり、その 0.1cc を A, B 両培地に接種した。なお成績の判定はすべて培養 4 週の終りに行つた。

3 実験成績

A 両培地の比較成績

1) DHSM について

第1表は DHSM について 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0 γ /cc の稀釈系列で行つた比較成績 (a) は一致例、(b) は不一致例である。間接法 7 例、直接法 10 例につき行つた。第1表 (a) に見る如く、一致例は直接法 10 例中 6 例、間接法は 7 例中 4 例で全く一致している。次に第1表 (b) に見る如く不一致例は直接法 4 例、間接法 3 例であるが、いずれも僅かな差異を示すに止まり、直接法の (2) と間接法の (3) でやや差が目立つが、完全耐性でとればすべて一致しており、明らかな差を示すとは云え得ない。

さてこの実験より明らかな如く、A, B が非常によく一致する事より、DHSM が凝固加熱により力価が 1/2 に下るという事は、矛盾があるように思われたので、われわれは更に DHSM の 2 倍量凝固—2 A, 2 倍量流しこみ

第1表 DHSM を所定量用いた実験
(a) 一致例

方 法	直 接 法						間 接 法											
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)								
喀 痰・菌 株	A B		A B		A B		A B		A B									
DHSM 濃度	A B		A B		A B		A B		A B									
10 r/cc	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	-	+3	+40	-	-	+13	+40
8	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	-	+92	+88	++	++	+70	+81
6	-	-	-	-	+	+	+++	+++	++	+++	-	-	+168	+128	+++	+++	+26	+120
4	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+1	+1	++	+++	+++	+++	+++	+++
2	-	-	-	-	+14	+5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1	+1	+17	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0	+75		+++		+++		+++		+++		+++		+++		+++		+++	

註: 1) 表中の数字は集落数を示す
2) +++…培地全面に融合して集落を生じたもの, ++…完全には融合しないもの, ++…数えられないもの

第1表 DHSM を所定量用いての実験
(b) 不一致例

方 法	直 接 法				間 接 法									
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)							
喀 痰・菌 株	A B		A B		A B		A B							
DHSM 濃度	A B		A B		A B		A B							
10 r/cc	-	-	-	-	-	-	+	+						
8	-	-	-	+1	-	-	-	+20	+	++				
6	-	-	-	+8	-	-	++	++	+++	++				
4	-	-	-	+7	-	+5	++	++	-	+1	++	++	+++	+++
2	-	-	++	+++	+16	+46	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
1	-	+	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0	+++		+++		++		+++		+++		+++		+++	

註: 第1表(a)に同じ

第2表 DHSM を所定量および2倍量用いた実験(直接法)

DHSM 濃度	喀 痰		(1)		(2)		(3)		(4)							
	培地		2A	2B	A	B	2A	2B	A	B						
10 r/cc	-	-	-	-	-	-	+1	+1	-	-	-	+1	-	-	++	+++
5	-	-	+1	+70	-	+1	+++	+++	-	+6	+40	+9	+2	++	+++	+++
2.5	-	-	++	++	++	++	+++	+++	+46	+14	+15	+43	+++	+++	+++	+++
1.2	++	+55	++	++	+++	+++	+++	+++	+48	+16	++	++	+++	+++	+++	+++
0.6	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
0			++		+++		+++		+++		+++		+++		+++	

註: 第1表(a)に同じ

2B, 及び A, B の 4 培地について 10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0 r/cc の 2 倍稀釈系列で喀痰 15 例につき実験した。

第2表はその結果の一部を示したものであるが, この結果もやはり, 2A は 2B に, A は B によく一致している。この外の 11 例についても全く同様の成績を示した。もしこの場合加熱により DHSM の力価が 1/2 に

減少するとすれば, 2A と B が一致する筈であるが, 全例においてかかる例は見なかつた。したがって, 加熱により力価が 1/2 に下る事については疑問があるのではなからうか。

以上の成績からわれわれは日常検査として行われている 10 倍稀釈系列 (1,000, 100, 10, 1, 0 r/cc) で喀痰 7 例につき実験したが, この場合は 7 例共 AB は非常によく一致し, ただ (4) の 1 例のみ不一致を見るが, これも著明な差とは云えない。

2) PAS について

PAS は 10, 5, 1, 0.5, 0 r/cc の系列で喀痰 15 例に行つた。第4表はその一部であるが, 完全耐性でとれば, 15例共全部一致し, 不完全耐性で不一致を見た 2 例—(2), (5) とも僅かな差にすぎない。

3) INAH について

100, 10, 1, 0.1, 0 r/cc の 10 稀釈系列で, 喀痰 18 例に実施した。第5表はその中の 7 例を示した。完全耐性でとれば, 18例全部一致し, 不完全耐性で差を示したのは 3 例—(2), (3), (5) であるが, これ等 3 例の差はごく僅かなものであつて誤差の範囲のものにしかすぎない。

第3表 DHSM について通常検査の10倍稀釈系列で行った実験(直接法)

DHSM 濃度	喀痰		(1)		(2)		(3)		(4)		(5)		(6)		(7)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1,000 r/cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註: 第1表(a)と同じ

第4表 PAS について行つた両培地の比較(直接法)

PAS 濃度	喀痰		(1)		(2)		(3)		(4)		(5)		(6)		(7)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
10 r/cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註: 第1表(a)と同じ

第5表 INAH について行つた両培地の比較成績(直接法)

INAH 濃度	喀痰		(1)		(2)		(3)		(4)		(5)		(6)		(7)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
100 r/cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註: 第1表(a)と同じ

4) Tb₁ について

2倍稀釈系列(10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3, 0 r/cc) 6例

および10倍稀

釈系列(100,

10, 1, 0 r/cc)

8例を喀痰につ

き行つた。

2倍稀釈系列

は第6表(a)に

その6例を示し

たが、表に見る

如く完全耐性で

一致しなかつた

もの1例—(2)

第7表 培養翌日に SM を流し込んでやつた C 培地と A, B の三培地の比較(直接法)

DHSM 濃度	喀痰		(1)			(2)			(3)			(4)			(5)			(6)			(7)		
	A	B	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
10 r/cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註: 第1表(a)と同じ

および不完全耐性で一致しなかつたもの1例—(4)である。しかしその差はごくわずかである。10倍稀釈系列の成績は第6表(b)に8例中の7例を示した。完全耐性でとれば8例共全部一致し、不完全耐性でわずかの差を示したものは、(1), (2)の2例のみである。

第6表 Tb₁ について行つた両培地の比較(直接法)(a) 2倍稀釈系列

Tb ₁ 濃度	喀痰		(1)		(2)		(3)		(4)		(5)		(6)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
10 r/cc	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註: 第1表(a)と同じ

第6表 Tb₂ について行つた両培地の比較(直接法)(b) 10倍稀釈系列

Tb ₂ 濃度	喀痰		(1)		(2)		(3)		(4)		(5)		(6)		(7)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
100 r/cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註: 第1表(a)と同じ

B) SM を培養翌日に流しこんだ実験

急を要する場合には培養をまず実施し、翌日に培養した培地の上に抗結核剤を流しこむようにすれば、事前の準備をしないで、翌日に後の操作をやらばよいので更に好都合である。このような方法が果して実際に行うものかどうかと思ひ、同一材料について A 培地 B 培地とならびに、培養を行つてから翌日に SM を流しこんだ C 培地について喀痰7例について比較して見た。

第7表に見る如く、その結果は(2), (3), (5)の3例において、C培地はA, Bに比し、やや高く耐性が出るが、その他の4例は一致している。

4 総括および考案

われわれは喀痰による直接法、並びに間接法により、DHSM, PAS, INAH, Tb_1 の耐性検査を従来のように(A)凝固する前に混入してその上で凝固した培地と、(B)普通の病的材料の結核菌培養検査用培地として準備された培地の上に、抗結核剤を流しこんで乾燥させた培地とを用いて、耐性検査を実施した結果、普通検査の場合のように10倍稀釈系列の濃度の場合には勿論の事、2倍稀釈系列の濃度の場合でも、全検査例の大部分において一致する成績を得た。固型培地の上に抗結核剤を流し込んで耐性検査をしようとする考えは、すでに小川・工藤¹⁾が昭和24年結核病学会、関東地方会において1% KH_2PO_4 培地を用いて、SMの阻止力の検査を行い、確実な成績を得る事を発表し、昭和25年結核誌に発表した。また、P. Coletsos et Boisvert²⁾(1949)はLöwenstein-Jensen培地について研究を行っている。最近川村³⁾(昭和29年)は1% KH_2PO_4 培地による阻止力の実験においてわれわれと全く同様な比較をやり、抗結核剤を流しこんでやる方法が実際に用い得る事を証明している。

われわれの実施している流しこみの方法では、果して0.1cc流しこんだ抗結核剤が5ccの培地中に平等に滲透するかどうかはまだ実験していない。しかし2倍稀釈の系列の実験においてさえも確実に一致しているのであるから滲透の問題はまた実験を重ねる事とし、少なくともこの方法は、実際に用い得るものと考えられる。このようにすれば加熱による抗結核剤の力価の減少や、耐性培地の保存等に対して考慮する必要もないし、随時作る事が出来るので都合である。なお急を要する場合には培養しておいて、その翌日に抗結核剤を流しこんでもよい。多少耐性が高く出る傾向にはあるが著明の差はない。

次に、われわれの方法に似ているものに Coletsos⁴⁾(1951)の方法がある。この方法は50cm²の面積のLegroux 壇に Löwenstein-Jensen 培地で平板をつくり、これに抗結核剤を流しこみ、抗結核剤の量を、われわれのccに対してcm²すなわち単位面積に対して濃度をきめている。この方法の追試を佐藤⁵⁾(昭29)はカレルの壇に、平板に1% KH_2PO_4 培地を固めて、実施し使用し得る事を証明している。

しかしわれわれの実験によれば従来単位容積(cc)に対して濃度をきめる方法がそのまま応用出来るのであるからして、何か従来の方法に大きな欠点でもあればともかく、殊更 Coletsos の方法に切りかえる必要もないと思われる。また中村⁶⁾(昭26)は、固めた3% KH_2PO_4

培地の凝固水をして、ソートン培地に稀釈した抗結核剤を2cc加え、固型培地は単に集落を形成させる基質と考えて、抗結核剤が培地の中に滲透する事の問題については検討していないが、この考えは別問題としても、実際に10倍稀釈系列の実験では、重層した方が、予め固めて混入した培地に比して耐性が高く出るようである。

5 結 論

1) 3% KH_2PO_4 培地, 1% KH_2PO_4 培地を合にして、SM, PAS, INAH, Tb_1 の2倍、或いは10倍稀釈系列で、従来の方法に従って、薬剤混入後に凝固してつくった耐性検査用培地と、予め凝固してつくった結核菌検査用培地の上に抗結核剤を流しこんでつくった耐性検査用培地を、喀痰による直接法及び菌液による間接法で、次のような73例につき耐性検査を実施した。

稀釈系列 方法 抗結核剤	2 倍		10 倍	合 計
	直接法	間接法	直接法	
SM	9	10	7	26
PAS	15			15
INAH			18	18
Tb_1	6		8	14
合 計	30	10	33	73

SM, PAS, INAH, Tb_1 のいかんを問わず、両耐性培地について一致した成績を得た。それでわれわれのような流しこみ培地でも実際に使用し得る。

2) SMの2倍稀釈系列について、従来のようにして作った耐性培地と、流しこんでつくった耐性培地とを、それぞれ所定量及び2倍量入れて、耐性の出方を19例につき比較すると、所定量混入凝固したものは、所定量流しこんだものに、2倍量混入凝固したものは、2倍量流しこんだものにそれぞれ一致した。よつて、凝固のさいの加熱により DHSM の力価が1/2減少するとの事で、2倍量を凝固前に加える事は再考を要する。

3) 培養した翌日に抗結核剤を流し込んで、耐性検査はできる。

(本研究に要した費用の一部は文部省科学研究費によつた。厚く感謝の意を表す。 小川辰次)

文 献

- 1) 小川・工藤：結核，25巻，1号，490頁，昭25。
- 2) P. Coletsos et Boisvert：Am. Inst. Pasteur. de Lill. 1949, II.
- 3) 川村：結核の臨床，2巻，5号，47頁，昭29。
- 4) Coletsos：Présse Mdicale. 82: 25. 1951.
- 5) 佐藤：医学と生物学，30巻，3号，99頁，昭29。
- 6) 中村：結核，26巻，9,10,11合併号，566頁，昭26。