

Dubos 培地による結核菌の耐性検査法

矢込 堅太郎・宮 本 泰

神奈川県衛生研究所 (所長 児玉 威)

受付 昭和 35 年 7 月 26 日

緒 言

結核菌の化学療法剤に対する耐性検査の方法は、衛生検査指針に記載されている方法をはじめ多くの術式が発表されている。臨床検査上結核菌の日常の耐性検査に要求されることは他の一般細菌における検査と同様であるが現在の状態からとくに短期間で成績がえられ、方法が簡単、操作が安全でかつ再現性があることがのぞまれる。この観点より細菌集団の化学療法剤に対する感受性または耐性を知るに当り、optical density (OD) を測定しそれから 50% 発育抑制 (ID_{50}) を求める Treffers¹⁾ の感受性測定法が結核菌の日常検査にも応用できるかどうかを Dubos 培地を用い INH の耐性検査の場合について検討した。

材料および方法

培地: Dubos 培地は指針にしたがつて作製。アルブミン液はメルク製牛血清 アルブミン Fraction V と榮研製結核用アルブミンを用いた。第一磷酸カリ培地は指針にしたがつて作製した。

菌株: $H_{37}Rv$, 青山 B, および患者分離株 F 株。

光電比色計: 日立 EPO-B 型, フィルターは $570m\mu$ を用いた。

測定法: 良質で径の均一中試験管を用い、これに Dubos 培地を 5 ml 宛分注し、耐性検査には 4.5 ml を分注し、ついで指定の終末濃度になるように INH を含ませた 0.5 ml の溶液を加える。菌液は手振法によりまず 10 mg/ml の浮游液を作りこれより 10 倍稀釈系列とし、その 0.1 ml を接種した。生菌単位 (vu/ml) はこれら菌液をさらに稀釈して 4 本の第一磷酸カリ培地に培養して算定した。OD は 1 種類 2~3 本の培地につき測定した。培養中は毎日 1 回培地をよく振盪した。第一磷酸カリ培地での耐性検査は指針の方法にしたがつた。実験 I では、接種量を増減することによつて発育の各時期の長さがどのように変化するかを追求し、実験 II では、INH を各濃度に含んだ培地での発育を測定、その値から ID_{50} を求めた。すなわち確率紙の縦軸に対照培養に対する INH 含有培地培養の発育程度の % を OD で測定した値を、横軸に薬剤濃度の対数をとつて図を画き、えられた図の縦軸の 50% に当

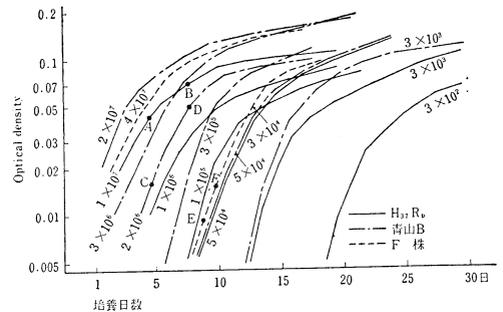
る点から横軸に垂線を下しその交点の濃度を求める。この値が ID_{50} である。

実験成績

実験 I 接種菌量と発育の各時期の長さ、および世代時間 (GT) との関係

$H_{37}Rv$, 青山 B, F 株の各接種量における発育曲線は図 1 のごとくであつた。この図から Lag, Log phase および GT を求めたのが表 1 である。Dubos 培地は図 1 からわかるように培養が早く定常期に達するので、表 1 の Log phase には、生菌数から求めた GT の値および 0.005 以下の値は光電比色計の性能上誤差が生じやすいので、結局 0.005~0.07 までを用いた。小川培地による生菌単位の測定は図 1 の発育曲線上の 2 点, AB, CD, EF の時期に行つた。えられた値から世代数 n を $n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$ (a および b は発育曲線上の 2 点の生菌単位数) から求めさらに 2 点

図 1 結核菌の発育曲線



図中の数字は接種量 vu/ml

間の時間を n で除して GT を計算して表 2 の成績をえた。

培養の塗抹検鏡所見から 3 株の菌では数コの細胞が cord を形成していてももちろん完全な単孤菌培養ではないことがわかつた。

実験 II 結核菌の INH 感受性の測定

実験 I の成績から接種菌量 $10^4 \sim 10^7$ vu/ml の場合に Lag が比較的短かく、かつ Log phase の期間が適当と認めためたので、この接種菌量を用いて感受性の測定を行つた。その結果は表 3 のごとくである。 ID_{50} の算

表1 結核菌の接種量と世代時間 (GT), Lag, Log phase の関係

H ₃₇ Rv	接種量	1×10 ⁷ vu/ml		1×10 ⁶	1×10 ⁵	3×10 ⁴	3×10 ³	3×10 ²
	Lag phase	3		6	7	8	12	17
	Log phase	2.5		5	5	5	5	5
	GT	1.4		1.6	1.3	1.1	1.1	1.3
青 山 B	接種量	2×10 ⁷	3×10 ⁶	2×10 ⁶	3×10 ⁵	3×10 ⁴	3×10 ³	
	Lag phase	1	2	4	5	8	12	
	Log phase	2.5	5	5	5	4	4	
	GT	1.2	1.5	1.2	1.2	1.1	1.2	
株 F	接種量	4×10 ⁷				5×10 ⁴		
	Lag phase	1				7		
	Log phase	2.5				5		
	GT	1.7				1.1		

Lag, Log phase, GT 項の数字は日数である

表2 発育集落算定法によつて求めたGT

菌 株	生菌単位 vu/ml	生菌単位 vu/ml	2点の比	世代数	GT	図における 2点間のGT
H ₃₇ Rv	A 5~10 × 10 ⁷	B 1.5~2 × 10 ⁸	B/A 2.5	1.34	2.1	3
青 山 B	C 1.1 × 10 ⁷	D 7 × 10 ⁷	D/C 6.4	2.65	1.1	1.5
F 株	E 5 × 10 ⁵	F 1 × 10 ³	F/E 2	1	1	1.4

表3 結核菌のINH含有培地における発育量の測定

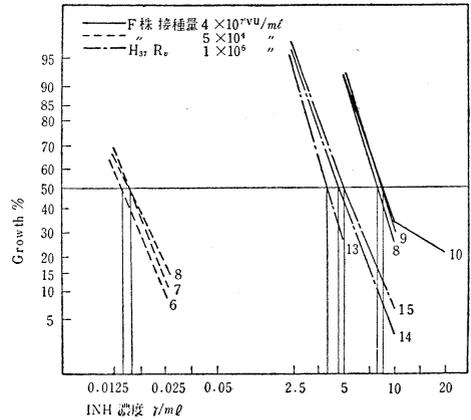
菌 株	F 株										H ₃₇ Rv			
	5 × 10 ⁴ vu/ml					4 × 10 ⁷ vu/ml					1 × 10 ⁶ vu/ml			
接種量	INH 濃度										0 .0125 .025 .05γ/ml			
培養日数	0	2.5	5	10γ/ml	0	2.5	5	10	20γ/ml	0	.0125	.025	.05γ/ml	
0 日	.000	.000	.000	.000	.020	.020	.020	.020	.020	.004	.004	.004	.005	
2	.001	.001	.001	.000	.025	.024	.020	.020	.020					
4	.001	.001	.001	.000	.047	.042	.035	.020	.020					
5										.055	.030	.005	.005	
7	.002	.002	.001	.000	.088	.085	.080	.020	.020	.102	.071	.011	.005	
9	.0095	.009	.001	.000	.103	.100	.092	.029	.022					
10	.015	.014	.001	.000										
11					.125	.120	.115	.045	.035	.180	.125	.059	.017	
12	.050	.045	.006	.000										
14	.070	.067	.030	.005	.155	.150	.155	.080	.040					
16										.185	.145	.085		
17	.090	.088	.061	.007										
23				.017										

表中の数字は OD

定ができる培養日数は、表 3 から F 株 5×10^4 vu/ml では 12 日目、 4×10^7 vu/ml では 7 日目、 $H_{37}Rv$ 1×10^6 vu/ml では 5 日目からであった。表 3 から各培養日数の ID_{50} を確率紙で示したのが図 2 で、その値は表 4 のごとくである。

他方小川培地での耐性検査(10^{-2} mg/ml 0.1 ml 接種)の成績は表 5 の通りである。Dubos 培地において結核菌を培養したとき、耐性菌と感受性菌の発育速度が著しく異なると、Treffers の方法は適用できない。そこで F 株の INH $10 \gamma/ml$ に発育した菌を同じ濃度の培地に 3 代培養し、この株と原株との発育を比較した。その結果原株の $0 \gamma/ml$ における GT と耐性株の $0 \gamma/ml$, $10 \gamma/ml$ の培地での GT はともに 1.3 日と同じ値を示した。

図 2 確率紙による ID_{50} の測定



図中の数字は判定日

表 4 培養日数と ID_{50} の関係

	接種量	判定日								
		6日	7	8	9	10	13	14	15	
F 株	5×10^4 vu/ml						4	4.5	5	
	4×10^7			8.5	9	9				
$H_{37}Rv$	1×10^6	0.014	0.0175	0.0175						

表中の数字は γ/ml

表 5 小川培地による耐性検査成績

F 株	INH 濃度	0 γ/ml	0.1	0.5	1	5	10	50	100
	成績		■	■	■	■	■	■	+
$H_{37}Rv$	INH 濃度	0	0.01	0.05	0.1	0.5			
	成績	■	■	+	-	-			

考 察

細菌の薬剤感受性を、対照培地と薬剤含有培地における菌の発育を OD によつて表示しその発育 % を確率紙に plot することによつて求める Treffers の方法を結核菌の場合にも応用した例は青柳ら²⁾によつてすでに報告されている。彼らの方法は T-type tube を用い振盪培養によつたもので高い精度で短期間に成績がえられている。しかし普通の検査室では装置の点などそのままでは利用しがたく思われる。そこで Dubos 培地を用い静置法による日常検査への応用を検討した。実験 I で示した発育曲線から求めた表 1 の Lag phase は、菌を接種したときの OD が光電比色計の読みにかかる程度であれば求めることができるが、それ以下の場合にはすでに Log phase に入つた状態で読みを表われてくるので、測定するとき、何時ごろから Log phase として OD が読めるかを示しているにすぎない。次に Log phase をどこまでとするかを定めるのは非常に問題であ

表 6 培養のある時期までの平均 GT

		図よりの求めた値	計算値
$H_{37}Rv$	A	1.4 日	0.75 日
	B	2.5	0.83
青山 B	C	1.2	0.75
	D	1.5	0.9
F 株	E	1.1	0.6
	F	1.1	0.76

つて、そのために生菌単位と図からの GT について検討すると、A, B, C, D, E, F の各点までの値は表 6 のごとくで、表からわかるように各株の接種時から 2 点までの GT の値は差があり、この時期がすでに真の意味での Log phase でないことを示している。すなわち Dubos 培地では早く定常期に達するといえる。 ID_{50} の算出が可能 ためには対照培地と耐性培地の両培地中の菌の発育が少なくともある同一時期にそれぞれの Log phase 上にあることを必要としている。すなわち Log phase を共有する時期が存在する必要がある。表 6 の B 点が OD 0.07 でこの辺までを Log phase として使用できるとして、全 population の 90 % の細菌細胞が薬剤で抑制される場合を検討する。この場合には発育する菌数は % となり、この培養が対照の培養とあ

る期間 Log phase を共有すればよい。そこで $\text{GT} = 1.5$ として計算すると $\text{Log}_2 10 = \frac{\text{Log } 10}{\text{Log } 2} = 3.3$ 世代となり $3.3 \times \text{GT} = 4.7$ で約 5 日ほどの発育の遅れが生ずる。対照の OD が 0.07 のとき 90% 抑制を受けた培養の OD は 0.02 で Log phase を共有でき、Dubos 培地、静置法でも日常検査程度ならば Treffers の方法は使用可能である。表 6 で、図から求めた値と生菌単位からの計算値とは 1.5 倍も差があるが、この差の原因の 1 つに、静置培養のために発育した細胞が数コで cord を作っているのを挙げるができる。新見ら⁵⁾も small inoculum technique および光電比色法から同様な成績を挙げている。INH 感受性測定の実験では Dubos 培地での方法と小川培地の方法との成績を比較すると、ほぼ平行した値を示している。Dubos 培地での成績は表 4 からわかるように培養期間の短かい方が ID_{50} の値が低くでている。これは培養期間が長くなると対照培養が定常期に入らため、抑制を受けた培養との差が少なくなつてくることによる。この傾向は接種菌量の多い場合にも Log phase が短かいので同様である。以上の結果から対照培養の OD が 10 日目ごろに 0.1 となる接種量、 $10^6 \sim 10^5 \text{ vu/ml}$ で 7~10 日の間に ID_{50} を測定するのが適当と思われる。はじめの接種量が多ければ、それだけ耐性菌 population の分布が正確にえられるわけで、この点第一磷酸カリ培地を用いる通常の耐性検査の場合よりも 10^2 倍も接種量を多く用いるこの方法はより正確な値を示すことになる。もしこれだけの菌量を固形培地に用いると耐性の誤

みか非常に不正確となるという成績が佐藤⁴⁾によつて報告されている。本実験の方法は、比較的多い接種量が使用できしかも再現性のある成績が短期間にえられ、さらに結核菌の各薬剤に対する感受性の分布の標準偏差(勾配)を計算で求めておけば、対照培養と抑制を示した耐性培地の 1 濃度の培養からも ID_{50} が求められるという利点を有する。さらに ID_{50} の値と感受性の勾配は薬剤の有効血液中濃度決定の基礎となり、Demerec⁵⁾らの指摘する化学療法剤に対する first-step-resistant の発生防止の 1 資料ともなる。

結 論

化学療法剤に対する結核菌の感受性測定を Dubos 培地、静置法によつて行う方法を検討した。すなわちえられた OD から Treffers の方法で ID_{50} を求める場合、接種量 $10^6 \sim 10^5 \text{ vu/ml}$ (1 mg/ml の菌液を 5 ml の培地に 0.1 ml 接種)、判定を対照培地の OD が $0.07 \sim 0.1$ となる 7~10 日目ごろに行うのが適当と思われた。

文 献

- 1) Treffers, H.P.: J. Bacteriol., 72(1): 108, 1956.
- 2) 青柳高明・水野伝一: 第 10 回日本細菌学会関東支部会抄録, 25, 昭32.
- 3) 新見美仁 他: 結核, 30 (増刊号): 73, 昭30.
- 4) 佐藤直行: 臨床病理, 4 (4): 283, 昭31.
- 5) Demerec, M.: J. Bacteriol., 56 (1): 63, 1948.