

重層培地による結核菌の定量培養

第4報 重層培地による薬剤耐性結核菌の検査

小 川 辰 次
上 野 高 正*
高 倉 廉**

北里研究所付属病院

* 虎の門病院

** 鬼子母神診療所

受付 昭和34年10月8日

I 結 論

重層培地は結核菌の分離培養においては、3% 小川培地に比して発育が早いことは第2報¹⁾で述べたとおりである。それでこの培地を使用して薬剤耐性結核菌の検査を行なったので報告する。

II 方 法

i. 耐性検査用の培地

a. 培地の種類

重層培地、対照として3% 小川培地および1% 小川培地を使用した。

b. 抗結核剤の混入の仕方

抗結核剤としては SM, PAS, INH を用いた。培地 1 cc についての混入濃度は次のようである。

SM …… 1 γ , 10 γ , 100 γ , 1,000 γ

PAS } …… 0.1 γ , 1 γ , 10 γ , 100 γ
INH }

①重層培地：SM (Dihydro SM), PAS (PAS-Na), INH を無菌的に秤量し、滅菌蒸留水で所定量の50倍の溶液、たとえば50 γ , 500 γ , 5,000 γ , 50,000 γ 等の1列の溶液を作っておき、これを重湯煎で10分程度滅菌し、5 cc 宛分注した重層培地に無菌的に0.1 cc 宛を混入し、よく混合すると抗結核剤は培地によって約50倍に稀釈されるから、所定量に混入された耐性検査用の培地ができる。無菌試験をしたうえで使用する。

②3% 小川培地および1% 小川培地：SM は所定量の2倍量を、PAS, INH は所定量を凝固する前に混入して、試験管に5 cc 宛分注して、90°C 1時間て凝固滅菌する。

ii. 接種の方法

a. 直接法

喀痰に4% NaOH を約5倍量加え、振盪して十分

に均等化し、その0.1 cc 宛を重層培地、あるいは3% 小川培地で作った耐性検査培地に接種した。この場合は、抗結核剤の混入された培地のほかに対照として2本の抗結核剤の混入されない培地を使用した。培養したら重層培地では振盪してよくまぜる。そしてそのまま37°C の孵卵器に1晩放置したのち、ゴムのキャップに変える。また3% 小川培地、1% 小川培地では、接種された材料を凝固水とまぜ、培地をゆり動かして斜面の上に平等に拡げ、斜面を水平にして1~2日37°C の孵卵器に保存し、液のほぼ乾燥したところでゴムのキャップに変え、培養を継続した。

b. 間接法

磨碎コルベンにより、滅菌蒸留水で1 cc 中1 mg の菌浮遊液を作り、その0.1 cc すなわち0.1 mg 宛を、重層培地と1% 小川培地に接種した。その後の操作は直接法の場合に準ずる。

iii. 判定

直接法は培養後ほぼ4週で、間接法はほぼ3週で判定し、結核菌の発育した最高濃度をもって耐性値とした。

III 成 績

検査材料は、直接法では塗抹陽性の喀痰を、間接法では0.1 mg を接種したので、対照に発育した集落はいずれも無数であつた。

(1) 抗結核剤に接触したことの無い結核菌の耐性値(直接法)

化学療法はまだ実施されたことの無い患者の喀痰を対象とした。

成績は表1のようであつて、SM における耐性値は1 γ までであつて、検査例数のほぼ2/3は1 γ 以下であり、1/3は1 γ であつた。次にPAS では、32例の検査のうちの約半数は0.1 γ であり、他の半数は0.1 γ 以下であつたし、INH では、検査した25例の全

表 1 SM, PAS, INH に接触したことの無い結核菌の耐性値の分布 (直接法)

抗結核剤の種類	混入濃度 γ/cc		0.1 γ 以下	0.1 γ	1 γ 以下	1 γ	10 γ	100 γ
	検査例数							
SM	27		—	—	17	10	0	0
PAS	32		17	15	—	0	0	0
INH	25		25	0	—	0	0	0

注：欄中の数字は例数を示す。

部が 0.1 γ 以下であった。すなわち重層培地では SM において耐性値がもつとも高く, PAS, INH の順で耐性値が低くなる。前にも述べたように, 対照に発育した集落数はいずれも多くて数えることができなかつ

表 2 3% 小川培地との耐性値の比較 (直接法) [その1] SM

	重層培地					合計
	0 γ	0.1 γ	1 γ	10 γ	100 γ , 1,000 γ	
3 % 小川培地	0 γ	7	1			8
	1 γ	6	17			23
	10 γ		8	2		10
	100 γ			1	2	3
	1,000 γ				2	10
合計	13	26	3	4	10	56

注：1) 表中の数字は例数を示す。
2) □は一致した例数を示す。

表 3 3% 小川培地との耐性値の比較 (直接法) [その2] PAS

	重層培地					合計
	0 γ	0.1 γ	1 γ	10 γ	100 γ	
3 % 小川培地	0 γ					0
	0.1 γ	6				6
	1 γ	2	8	6		16
	10 γ		1	13	1	15
	100 γ			3	4	8
合計	8	9	22	5	8	52

注：表2に同じ。

表 4 3% 小川培地との耐性値の比較 (直接法) [その3] INH

	重層培地					合計
	0 γ	0.1 γ	1 γ	10 γ	100 γ	
3 % 小川培地	0 γ	12	2			14
	0.1 γ		4	4		8
	1 γ		4	4		8
	10 γ			6	12	18
	100 γ					2
合計	12	10	14	12	2	50

注：表2に同じ。

た。したがって重層培地では, 接種菌量がかかなり多くとも, この程度の耐性値を示すものは感性菌とみてよい。

(2) 3% 小川培地との耐性値の比較 (直接法)

喀痰は SM, PAS, INH 等の使用中の患者, あるいは使用後の患者より採取したものであつて, 耐性検査の前日は化学療法剤の投与を中止した。

a. SM

横に重層培地の成績, 縦に 3% 小川培地の成績をとつて, その相関関係をみたのが表2である。合計 56 例の実験であるが, 一致したものは 38 例 (67.9%) であつて, 残りの 18 例は不一致を示した。不一致例の大部分の 17 例は 3% 小川培地が高い耐性値を示し, 1 例のみが重層培地のほうが高い耐性値を示した。なおその差は, 1 段階のものがその全部であつて, 2 段階のものはない。

b. PAS

成績は表3のようである。表3でみるように, 一致したものは 52 例中の 15 例 (28.9%) であつて, 残りの 37 例 (71.1%) は 3% 小川培地において高い耐性値を示している。1 段階の差を示したものは 31 例, 2 段階の差を示したものは 6 例である。すなわち SM に比して両培地における差は著明である。

c. INH

成績は表4のようである。すなわち50例中の34例(68%)が一致し、16例は不一致を示した。そのうちの6例は重層培地が高い耐性値を示し、10例は3%小川培地のほうが高い耐性値を示している。なおINHの場合は、2段階の差を示したものは1例もない。以上の成績から分かるようにINHにおいては、SM、PASに比して両培地における差はもつとも少ない。なおSM、PAS、INHともに両培地における不一致はあつたとしても、両培地の相関を認めることができる。

(3) 1%小川培地との耐性値の比較(間接法)

重層培地は、本来は直接法に用いられる培地であることはいうまでもないことであるが、菌液を接種した場合

表5 1%小川培地との耐性値の比較(間接法)
[その1] PAS

		重層培地					合計
		0γ	0.1γ	1γ	10γ	100γ	
1 % 小 川 培 地	0γ	5					5
	0.1γ	4	4				8
	1γ	2	10	8			20
	10γ		8	15	1		24
	100γ				3	4	7
合計		11	22	23	4	4	64

注:表2に同じ。

表6 1%小川培地との耐性値の比較(間接法)
[その2] INH

		重層培地					合計
		0γ	0.1γ	1γ	10γ	100γ	
1 % 小 川 培 地	0γ						0
	0.1γ	1	1				2
	1γ			1			1
	10γ				3		3
	100γ				3	2	5
合計		1	1	1	6	2	11

注:表2に同じ。

でも同様によい発育を示すことを認めている。菌液を用いる間接法が可能ならば一層便利である。それではたして間接法に用いたときはどうかと思い、1%小川培地を対照として比較してみた。なお用いた菌株は、抗結核剤の投与を受けたことのある患者から分離したものをを使用した。この実験はSMについては実施せず、PASとINHについて実施した。

表5はPASにおける成績であるが64例中の22例(34.4%)が一致したが、残りの42例(65.6%)は1%小川培地が高い耐性を示した。そして2段階高い耐性を示したものは42例中の10例である。

この相関関係は、PASの直接法の場合と全く同様である。またINHについては、11例の比較にすぎないので、その傾向ははつきりしないが、1%小川培地が高い耐性値を示すものようである。

IV 総括および考察

抗結核剤に対する耐性結核菌の検査の方法をふりかえってみると、抗結核剤の使用されだした当時は、主としてKirchnerやDubosの液体培地を用いる間接法が使用されていたが、結果判定までの期間の長いこと、耐性菌の割合が分からないこと、および体内から直接出てくる菌を実験するほうが、一たん分離してさらに増殖させた菌を使用する間接法よりもより妥当であることなどのために、臨床的には、固形培地による直接法がもつぱら使用されるようになってきた。しかし固形培地にも欠点がないわけではない。その1つは凝固滅菌による抗結核剤の力価の減少がはつきりしないことである。

重層培地は、液体と固形の混合の培地であるが、その大部分は液体である。しかもこの培地は3%小川培地と同様に前処理した材料をそのまま接種できるし、発育した集落数も数えることができるので耐性菌の割合も分かる。かつまた抗結核剤の加熱による影響を考慮する必要はない。したがって重層培地は、耐性検査のうえからは、液体培地と固形培地の優れた点を、兼ね備えたものといつても過言ではなからう。

以上のようなことから実際にこの重層培地を使用して2~3の実験を行なつてみた。

まず抗結核剤に接触したことの無い菌株、すなわち感性菌についての従来までの耐性値をみると、固形培地においても液体培地においてもSMがもつとも高く、次にPASでありINHはもつとも低い。しかもいずれの抗結核剤においても、その耐性値の分布の幅は狭い。私の重層培地における成績もこれと全く同様である。

次に諸先進^{2)~4)}の成績では、液体培地であるKirchner、Proskauer-Beck、Dubos等の培地では、固形培地である占部・山田の卵黄寒天培地、Herroldの卵

黄寒天培地、ATS 培地に比して耐性値が低く出る傾向にあることが証明されているが、われわれの重層培地においても、3% および 1% 小川培地に比較すると、SM, PAS, INH とともに低い耐性値を示している。しかし重層培地は、固形と液体の混合培地であることでは Kirchner 培地等と異なる。それで重層培地と Kirchner 培地の耐性値を比較した。その結果 SM⁵⁾、PAS では重層培地のほうが耐性値が高く、INH⁷⁾ においてはほとんど差を認めていない。以上の成績を総合すると、重層培地の耐性値は Kirchner 液体培地と、固形培地との中間の値を示していることが分かる。このことは培地の組成が液体と固形の混合であることのためかもしれないが、重層培地の特異な一面を示すものであろう。次に抗結核剤に接触したことがある結核菌についての耐性値の比較でも SM, PAS においては 3% 小川培地のほうが高い耐性値を示す傾向にある。このことは感性菌の場合と全く同様である。しかし INH においては、その傾向ははっきりしない。さらに多数につき研究する必要がある。

しかし、いずれにしても重層培地と 3% 小川培地、1% 小川培地の間には、耐性値のうえではある相関を認める。

以上のようなことから、重層培地は、耐性結核菌の検査には固形培地同様使用することができる。古久保⁹⁾は切除肺結核病巣より分離した結核菌についての耐性検査で使用している。次に耐性値の判定までの期間であるが、従来までの成績をみると、液体培地は固形培地に比して早く判定できる利点のあることが証明されている^{9)~11)}。重層培地は、結核菌の分離培養においては固形培地に比して早く発育することは前にも述べたとおりである。しかし抗結核剤の混入している重層培地の中における耐性結核菌の発育は、集落の多い場合は比較的早い、少ない場合は、固形培地と差はない。これは少ない集落の場合は、結核菌と判定することがむずかしいためである。したがって重層培地において耐性の早く判定できるのは、対照培地に集落が多くて、しかもそれが完全耐性であるか、感性である結核菌に限られている。

V 結 論

重層培地を結核菌の薬剤耐性の検査に使用して次のような成績を得た。

1) 抗結核剤の投与を受けたことのない患者の喀痰を用い、直接法により耐性の検査をすると、その耐性値は SM では 1 γ あるいは 1 γ 以下、PAS では 0.1 γ あるいは 0.1 γ 以下、INH では 0.1 γ 以下であった。

2) 抗結核剤の投与を受けたことのある患者の喀痰による直接法で、重層培地と 3% 小川培地を、また抗結核剤の投与を受けたことのある患者の喀痰より分離した菌について、間接法により重層培地と 1% 小川培地を比較すると、SM, PAS では重層培地による耐性値は低い傾向を示す。INH ではその傾向は著明ではないが、やはり低い傾向を示している。

本研究は結核予防会結核研究所在任中のものである。

文 献

- 1) 小川 他：結核，35：256，昭35.
- 2) 小酒井：医療，4 (5)：40，昭25.
- 3) Elizabeth H. Williston & Guy P. Youmans：Amer. Rev. Tbc., 59：336，1949.
- 4) Sidney Bernstein, Elizabeth M. Bradley, Edgar M. Medlar & William Steenken：Amer. Rev. Tbc., 62：101，1950.
- 5) 小川：診断と治療，臨時増刊 γ 肺結核 γ 83，昭29.
- 6) 白井：抗研誌，8 (11)：24，昭27.
- 7) 小川：未発表.
- 8) 古久保：結核研究の進歩，18：190，昭32.
- 9) 金沢・佐藤：慶応医学，28 (7)：333，昭26.
- 10) 内田・吉川・木村：第 8 回厚生省医務局研究発表会抄録，4，昭28.
- 11) K.A. Jensen：Bulletin of the International Union against Tbc., 24 (1・2)，78，1954.