

ピラジナマイド耐性結核菌の検査について

第 5 報 pH 5.5 の 1 % 小川培地を通常検査
として使用した成績の統計的観察

沢井 武・宮城小枝子・立花嘉子

北里研究所附属病院 (指導 小川辰次)

受付 昭和 37 年 1 月 4 日

I 緒 論

沢井^{1)~4)} は従来までの種々の基礎的の実験から pH 5.5 の 1 % 小川培地は中和した病的材料を接種すれば直接法として、また菌液を接種すれば間接法としてピラジナマイド (以下 PZA と略す) 耐性結核菌の検査に使用できることを報告した。それでわれわれは昭和 33 年 4 月以来この沢井の方法を通常検査に使用してきた。今回は昭和 34 年 4 月より 35 年 9 月までの期間に実施した総件数 220 件の検査成績を材料として統計的に観察し培地の結核菌発育の状態、出来上がった培地の検定成績、および PZA 投与と耐性値の推移を検討したので報告する。

II 実験方法

1. 耐性検査の方法

① 対象

北里研究所附属病院へ入院中あるいは通院中の結核患者略痰および種々の材料から分離した結核菌を必要に応じて対象とした。

② 耐性検査培地

沢井の方法によつて pH 5.5 の 1 % 小川培地を台にして作った培地であつて PZA を培地 1 cc について 5,000 γ , 1,000 γ , 100 γ , 10 γ に混入した 4 本の培地と対照の 1 本の培地、合計 5 本を 1 組の耐性検査培地として使用した。

③ 接種および判定の方法

PZA 耐性検査と同時に SM, PAS, INH 等の耐性の検査を実施した。

a) 直接法

前日より投薬を中止して採取した塗抹陽性の略痰に 5 倍量のフェノールレッドの 0.004 % に混入した 4 %

NaOH を加えて十分に均等化し、まず 3 % 小川培地で作った SM, PAS, INH の耐性検査培地に 0.1 cc 宛接種しさらに一部をとつて 8 % HCl (容量) で中和してその 0.2 cc を PZA 耐性検査用培地に接種した。この場合中和によつて略痰液が約 2 倍に稀釈されるので、SM, PAS, INH の耐性検査培地の接種量と同じにするために 0.2 cc 宛を接種した。そしてともに 1 昼夜斜面台に寝かせて 37 °C に保存し、液のほぼ乾いたときにゴムキャップに変えて立てて培養した。その後は 1 週ごとに観察、対照に集落の十分に発育したときすなわち PZA では原則として 5 週、発育の悪いときは 6~8 週で判定し、SM, PAS, INH では 4~5 週で判定し、PZA 混入の最高の濃度に発育したところをもつて耐性値とした。

b) 間接法

3 % 小川培地に分離した集落をとつて 4 % NaOH で手振り法で 1 mg/cc の菌液を作り、0.04 % のフェノールレッドを 1 滴加えてさらに 8 % HCl で中和してその 0.1 cc 宛を PZA 耐性検査培地に接種し、1 mg/cc の菌液をさらに 4 % NaOH で 10^{-1} mg/cc にしたものの 0.1 cc 宛を 3 % 小川培地で作った SM, PAS, INH の耐性検査培地に接種した。接種後の操作は直接法と同様であつて、判定は大部分は 4~5 週目で行なつたが、一部発育の悪いものは 6~8 週で行なつた。判定の方法は直接法と同じである。

2. 作った耐性検査培地の検定

耐性検査培地のできるごとに硝子電極によつて対照培地の pH を計り、ついで 1 組の耐性検査用培地に PZA 感性菌である H₃₇Rv 株の 10^{-2} mg を 0.1 cc に含ませて接種し、4 週で判定して耐性値をみるとともに耐性検査培地の対照の発育の状態と検討した。

III 統計的観察方法とその成績

1. PZA 耐性検査培地と3%小川培地との対照における発育の比較

Table 1. Comparison of Growth in 1% Ogawa Egg-media pH 5.5 and 3% Ogawa Egg-media
a) Positive rate

Method 1% Ogawa egg-media pH 5.5 3% Ogawa egg-media	Direct method			Indirect method		
	+	-	Total	+	-	Total
+	126 (89.4%)	12 (8.5%)	138 (97.9%)	77 (97.5%)	2 (2.5%)	79 (100%)
-	1 (0.7%)	2 (1.4%)	3 (2.1%)	0	0	0
Total	127 (90.1%)	14 (9.9%)	141 (100%)	77 (97.5%)	2 (2.5%)	79 (100%)

Numerals show examples.

計学的には差はない。また3%小川培地にのみ発育したものは12例(8.5%)であつて、PZA耐性検査培地にのみ発育したものは1例であつた。間接法では79例中PZA耐性検査培地に発育したものの97.5%、3%小川培地に発育したものの100%であつて、この場合にも両者の間に差はない。PZA耐性検査培地にのみ発育したものはなかつたが、3%小川培地だけに発育したものが2例(2.5%)であつた。なお直接法において耐性検査培地で陰性で3%小川培地陽性の12例のガフキー番号および3%小川培地上に発育した集

落数を示すと表2のようである。

3%小川培地陰性でPZA耐性検査培地に陽性を示した1例はガフキーII号でPZA耐性検査培地上に認めて集落数は1コであつた。次に間接法でPZA耐性検査培地陰性、3%小川培地陽性の2株はいずれも無数の集落を示していた。以上のように陽性率のうえでは差はないが、直接法ではガフキー陽性のものが3%小川培地の6倍も陰性を示したこと、またこれらの3%小川培地上の集落はいずれも無数であること、また間接法でもPZA耐性検査培地陰性で3%小川培地に発育した集落数が無数であつたこと等はPZA耐性検査培地の発育が悪いことを示している。

Table 2. Comparison of Growth in 1% Ogawa Egg-media pH 5.5 and 3% Ogawa Egg-media

b) Gaffky number and colony count on the 3% Ogawa egg-media of 12 cases which are negative on the 1% Ogawa egg-media pH 5.5 and positive on the 3% Ogawa egg-media by direct method

Oolony count	Gaffky No.							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
###						1	1	2
##		2	1				1	4
+					1		1	2
+		3			1			4
Total		5	1		2	1	3	12

- Numerals show examples.
- Expression of colonies is as follows.

} + means many.
}
+ } colony count
Numerals }
- } negative

Table 3. Comparison of Growth in 1% Ogawa Egg-media pH 5.5 and 3% Ogawa Egg-media
c) Colony count

Media	Method Colony count	Direct method				indirect method			
		###	##	+	+	###	##	+	+
1% Ogawa egg-media pH 5.5		21	42	47	16	8	29	33	7
3% Ogawa egg-media		83	28	7	8	39	25	10	3

- Numerals show cases.
- Expression of colonies is same as table 2.

の件数は直接法、間接法ともに PZA 耐性検査培地は 3% 小川培地の約 1/4 であつて、もつとも少ない集落の区分の + か 3% 小川培地の 2 倍の例数を示し

ている。すなわち PZA 耐性検査培地に発育する集落は 3% 小川培地に比して少ない。

C) 集落の発育するまでの期間

Table 4. Comparison of Growth in 1% Ogawa Egg-media pH 5.5 and 3% Ogawa Egg-media
d) Period until growth of colonies

Media	Method Period (week)	Direct method							Total	Indirect method							Total
		2	3	4	5	6	7	8		2	3	4	5	6	7	8	
1% Ogawa egg-media pH 5.5		4	37	47	29	6	3	0	126	5	15	21	24	5	5	2	77
		(3.2)	(29.3)	(37.3)	(23.0)	(4.8)	(2.4)		(100)	(6.5)	(19.5)	(27.3)	(31.2)	(5.5)	(5.5)	(2.5)	(100)
3% Ogawa egg-media		20	84	18	4	0	0	0	126	17	47	9	3	1	0	0	77
		(15.8)	(66.7)	(14.3)	(3.2)				(100)	(22.1)	(61.0)	(11.7)	(3.9)	(1.3)			(100)

Numerals show cases and () show percentage

3% 小川培地と PZA 耐性検査培地の両培地に発育したものについて初発集落発現までの期間をみた。その結果は表 4 に示すように、直接法、間接法ともに耐性検査培地では大部分は 3, 4, 5 週に発育しているのに、3% 小川培地では 2, 3, 4 週において発育している。次に 4 週までに発育した例数をみると、直接法では PZA 耐性検査培地は 88 例 (69.8%) に対して 3% 小川培地 122 例 (96.8%) であり、間接法では PZA 耐性検査培地は 46 例 (54.3%) であるのに 3% 小川培地は 73 例 (94.8%) であつていずれの場合も PZA 耐性検査培地は 3% 小川培地に比して発育が遅れている。

2. 作つた耐性検査培地の検定

9 組の培地の検定成績を表 5 に示したか、そのうち pH を測定した 6 組のうち pH 5.58, pH 5.60 のものでは 1,000 γ に発育し、pH 5.52 より酸性側の 4 組の培地ではいずれも 10 γ に発育し 100 γ に発育した

Table 5. Inspection of 1% Ogawa Egg-media pH 5.5

PZA Concentration γ/cc	Date of preparation	pH														
		1959/27/9	1959/6/12	1960/26/1	16/2	20/4	12/5	21/6	12/7	11/8						
5,000		5	58	60	5	51	5	49	5	48	5	52				
1,000		2	21													
100		130	83													
10		卅	卅	122	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	3	1	卅	
0		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	57	卅	

1) Report in table shows presence of colony and degree of growth.

2) Expression is same as table 2

ものはなかつたし、pH を測定しなかつた 3 組においても集落の発育は 10 γ どまりである。次に対照の発育をみると、pH を測定しなかつたものの 2 組は ++, 57 のように少ない集落を示しているか、その他のものではいずれもよい発育を示している。この例はあるいは pH が酸性に傾きすぎたのかもしれない。

以上の成績から pH 5.58, 5.60 の 2 組の培地および対照の発育の悪かつた 2 組の培地合計 4 組の培地は pH が高すぎたり、10 γ 以上に発育したり、対照に発育した集落が少なかつたりしているから適当な培地ということかてきようし、この 4 組を除いた残り 5 組の培地は適当な培地ということかてきよう。

3. PZA 耐性結核菌の出現の統計的観察

INH の 1 γ 完全耐性以上のものを耐性菌として INH 耐性菌のものと耐性のないものとに分けて、INH (0.3 g 毎日) と PZA (2 g 毎日) とを併用した場合の PZA 耐性菌の出現の状態をみた。

成績は表 6 に示すようである。まず PZA 使用期間別にみると、INH 耐性の有無にかかわらず PZA 使用期間が長ひくとともに耐性値が高まる傾向がある。いま PZA 100 γ 以上を耐性菌と仮定して 1~3 カ月の投与期間中の出現率をみると、INH 耐性のあつたもののほうが著明に多い。また 4 カ月投与以上のものでは両者ともほとんど全部が耐性になつているので耐性菌の出現率は 100% であるか、INH 耐性のものでは PZA 5,000 γ 耐性のものかみられるのに INH 耐性のないものでは、5,000 γ となつたものは 1 例もない。以上の成績は検査例数が少ないし Back ground も揃っていないから決定的なことはいえないが、INH 耐性菌では PZA 耐性の出現の仕方が著しいことが推定さ

Table 6. Influence of INH Resistance for Appearance of PZA Resistant Tubercle Bacilli

PZA Concentration γ/cc	INH resistance	None					Yes											
		Before prescription	Period of prescription (month)					Before prescription	Period of prescription (month)									
			1~3	4~6	7~9	10~12	13~		1~3	4~6	7~9	10~12	13~					
5,000																		
1,000			4	5	6	7	27	22	5	6	11	1	1	4	6	11	5	5
100		2 (18%)	5 } 90%	3 } 100%	2 } 88%	1 } 100%	1 25%	11 } 77%	6	3	2	2	2	4	2	4	4	4
10	4	5			1		2	7	3									
0	14	4	1				1	4										
Total	28	11	10	8	4	8	4	49	32	9	12	20						

Numerals show cases and percentase.

れる。

IV 考 案

PZA 耐性結核菌の検査については厚生省⁵⁾の検査指針の中にもまだ研究中とだけしか記載されていない。しかし臨床のうえにはかなり広く使用されている。ことに PZA 投与の対象となる患者は SM, PAS, INH 等に対して耐性を有するもので、X 線的にみても重症に属するものが多い。したがって PZA 投与においても早く耐性菌の出現する可能性が推定されるから、PZA の耐性結核菌の検査をやつて正しい投与をやつていく必要がある。それでわれわれは沢井の方法を通常検査に使用してみた。この方法は McDermott⁶⁾の説に従い、pH 5.5 にした 1% 小川培地を台にして作ったものであつて、旗野⁷⁾、平井⁸⁾等も使用できることを証明している。われわれの通常検査の成績は前述のようであつて、この成績は沢井の基礎実験を全の裏がきするものであつた。すなわち 3% 小川培地に比して接種菌量が多いにもかかわらずやや発育が悪いし、また同様の方法で作つたものでも時により培地の pH がやや変動し、感性菌であつても 10⁷ 以上に発育することや、対照に発育する集落数が少ないことがある。これらの事実は PZA 耐性検査培地の不安定な一面を示すものであるが、その原因は用いた卵の性状によるものかまた全卵液に塩酸を加えるときの技術によるものかはつきりしない。この対策としては培地の製造を慎重にするとともに、必ず製造に H₃₇Rv 株のような感性菌を標準として検定し、検定に不合格の場合には、検査の成績を破棄するようにすればよい。しかもこの培地による成績では PZA 耐性菌の出現の状態は SM, PAS, INH 等の場合と全く同様であつて PZA 投与の期間の長びくとともに耐性菌が出現するし、INH 耐性菌をもっている患者では、INH と PZA を併用しても INH 感性菌をもっている患者に比して早くしかも高い耐性値を

示している。以上のようなことから pH 5.5 にした PZA 耐性検査培地による方法はけつして最上の方法とは思わないが、優れた方法ができるまではこの培地を使用し PZA の適正な投与を実施することが望ましい。

V 結 論

pH 5.5 の 1% 小川培地による PZA 耐性培地を実際の検査に使用した直接法 141 例、間接法 79 例の成績を統計的に観察し次のような成績を得た。

1) 陽性率、集落数、集落の発育するまでの期間を比較してみると、PZA 耐性検査培地は 3% 小川培地に比して結核菌の発育が悪い。

2) INH 耐性菌をもっている患者に PZA と INH を併用して投与すると、感性菌のものに比して PZA 耐性になりやすい。

3) PZA 耐性検査培地は同じ方法で作つた場合でも pH に多少の変動があることがあるし、感性菌であつても 10⁷ 以上の混入濃度に発育することもあるし、対照培地に発育した集落が少ないことがある。それで耐性検査培地の製造ごとに標準菌株として PZA 感性菌をもつてその培地を検定し、検定に合格した培地の成績のみをとるならば、この培地は通常検査として使用することができる。

文 献

- 1) 沢井：結核，34：493，昭34.
- 2) 沢井：結核，34：568，昭34.
- 3) 沢井：結核，34：692，昭34.
- 4) 沢井：結核，34：761，昭34.
- 5) 厚生省：衛生検査指針（結核菌），昭34.
- 6) Walsh McDermott et al. : Am. Rev. Tbc., 70：748，1954.
- 7) 旗野 他：結核研究の進歩，22：47，昭33.
- 8) 平井 他：第 34 回日本結核病学会発表，昭34.

Examination for Pyrazinamide-resistant Tubercle Bacilli. Fifth report: Statistical observation of the results using 1 % Ogawa egg-media pH 5.5 for examination.

Sawai previously reported that 1 % Ogawa egg-media pH 5.5 can be used to examine pyrazinamide resistant tubercle bacilli. The authors have utilized this method for routine examination and then observed statistically the results of 220 cases, examined the growth of tubercle bacilli, approval result of medium, relationship between pyrazinamide dose and resistant rate.

1) When 1 % Ogawa egg-media pH 5.5 and 3 % Ogawa egg-media are compared the positive rate of growth of tubercle bacilli, colony number, period until colonies develop are inferior in 1 % Ogawa egg-media pH 5.5 as compared to those in 3 % Ogawa egg-media.

2) When the patient with INH resistant bacilli is given pyrazinamide and INH, tubercle bacilli from a patient with INH resistant bacilli easily becomes pyrazinamide resistant than a patient with INH sensitive bacilli.

3) The pH of 1 % Ogawa egg-media pH 5.5 brings about slight changes even by the same turing process, and on this medium pyrazinamide sensitive tubercle bacilli sometimes grow over 10 *g/cc* while only a few colonies are found on the control media.

For this reason, when preparing this medium it is always necessary to examine this with pyrazinamide sensitive tubercle bacilli, and if the results of only those passing this examination are taken, this medium can be used for routine test.