

1% 小川培地と 3% 小川培地における SM, PAS, INH の耐性値の比較

小川辰次・宮城小枝子
大谷典子・立花嘉子

北里研究所付属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和 38 年 6 月 3 日

1 緒 論

わが国の検査指針¹⁾では, SM, PAS, INH の耐性検査には, 直接法では 3% 小川培地, 間接法では 1% 小川培地を用いることになつてゐる。ところで, 同一患者について異なつた培地を用いて得られた成績をつなぎ合わせて, 耐性の消長をみていくときに, 不揃いのことがたびたびある。その一つの原因は, 培地によつて耐性値の出力に差があるからであつて, このことは以前から分かつていたことである。しかし, どの程度の差が出るかについてのはつきりした成績は, まだ発表されていない。それでわれわれは, 両培地による耐性値を比較したのでここに発表する。

2 検査方法

① 培地および抗結核剤の混入濃度

検査指針により, 培地 1cc について SM は 10 γ , 100 γ , PAS は 1 γ , 10 γ , INH は 0.1 γ , 1 γ , 5 γ に混入して 5cc 宛分注し斜面として固めた。他に对照として抗結核剤の混入されていない培地を 1 本加え, 合計 8 本の培地を 1 組の耐性検査培地として使用した。培地は 1% 小川培地と 3% 小川培地を用いた。

② 耐性検査の方法

その概略について記すと次のようである。

i) 直接法: 塗抹陽性の喀痰にフェノールレッドの 0.004% に混入した 8% NaOH を等量加えよく均等化し, この 1cc 宛を中試験管にとり, 一方は 8% HCl で中和するとともに他方は中和に要した 8% HCl の量だけの 4% NaOH を加えて両方を同一量として, 4% NaOH 処理のものは 3% 小川培地で作つた耐性検査培地に, 中和したものは 1% 小川培地で作つた耐性検査培地の 1 組宛に 0.1cc 宛接種して, 型のように斜面を水平

にして 1~2 日ねかし, 液のほぼ乾燥したところでゴムキャップに代えて, ほぼ 1 ヶ月, 発育の遅いのはさらに 1 ヶ月観察した。

ii) 間接法: 分離した結核菌を 1% 小川培地に継代し, 2~3 週培養して集落の十分発育したときに菌苔をかきとり, 磨砕コルペンですり, 蒸溜水を加えて 1 mg/cc の菌液を作る。さらに 0.004% にフェノールレッドの入つてゐる 4% NaOH で 10⁻² mg/cc とし, これを 1cc 宛 2 本の試験管にとり, 前同様に一方は 8% HCl で中和するとともに, 他方は中和に要した HCl の量だけの 4% NaOH を加えて, 両者を同一量として, 直接法同様それぞれ 1% 小川培地および 3% 小川培地で作つた 1 組宛の耐性検査培地に接種して, 約 1 ヶ月観察した。

③ 成績判定の材料

喀痰による直接法 51 例, 喀痰および喉頭粘液, 胃液, 膿等より分離したもの 194 例, 切除肺結核病巣より分離したもの 60 例, 合計 254 例が間接法で, これらを総計すると 305 例の材料となるが, このうち発育しなかつたもの, 对照培地に 20 以下の集落のものおよび 3% 小川培地と 1% 小川培地における発育に著明の差のあつたもの等 21 例を除いた 284 例が判定の对照となつた。これらはいずれも SM, PAS, INH の投与中, あるいは過去に投与を受けた肺結核症の患者からのものであるが, SM, PAS, INH の 3 者の耐性検査を同時に行なつたものである。

④ 成績の判定

对照に発育した集落数が無数の場合に, 抗結核剤を混入したところに 20 コ以下の集落を認めるとき, また有数の場合は 10 コ以下の集落を認めるときは, これを自然耐性菌と仮定して, この濃度では耐性菌は発育しなかつたことにした。また完全耐性とは对照が無数のときは, それとほぼ同じ数, 有数のときはその 75% 程度

の集落数を抗結核剤の混入した培地に示したときであつて、それ以下の集落数の場合はすべて不完全耐性と示した。

3 成 績

これらの比較の実験で、対照に発育した集落数は221例は無数であつて、有数(200~20コ)のものは63例であつた。

Table 1. Comparison of SM Sensitivity Test Results

		3% Ogawa media		
		0γ	10γ	100γ
1% Ogawa media	0γ	90(127)	27 (22)	1 (0)
	10γ	2 (3)	67 (68)	21 (12)
	100γ	0 (0)	0 (0)	76 (52)

Note: Figures without parentheses indicate the number of cases with incomplete resistance and those in parentheses that with complete resistance.

Table 2. Comparison of PAS Sensitivity Test Results

		3% Ogawa media		
		0γ	1γ	10γ
1% Ogawa media	0γ	176(201)	13 (15)	0 (0)
	1γ	4 (5)	45 (36)	5 (4)
	10γ	0 (0)	3 (1)	38 (22)

Note: As table 1.

Table 3. Comparison of INH Sensitivity Test Results

		3% Ogawa media			
		0γ	0.1γ	1γ	5γ
1% Ogawa media	0γ	98(132)	3 (1)	0 (4)	1 (0)
	0.1γ	9 (7)	51(46)	4 (2)	0 (0)
	1γ	0 (0)	3 (6)	22(22)	3 (3)
	5γ	1 (0)	0 (1)	4 (1)	85(63)

Note: As table 1.

Table 4. Summary of Percentages of Coincidence in Results Obtained from 2 Media

Antituberculous agents	Degree of sensitivity	Number of cases with results coincided (%)	Number of cases with results not coincided (%)	
			3% Ogawa media > 1% Ogawa media	1% Ogawa media > 3% Ogawa media
SM	Complete resistance	247 (86.6)	34 (12.0)	3 (1.1)
	Incomplete resistance	233 (82.0)	49 (17.3)	2 (0.7)
PAS	Complete resistance	259 (91.2)	19 (6.7)	6 (2.1)
	Incomplete resistance	259 (91.2)	18 (6.3)	7 (2.5)
INH	Complete resistance	263 (92.6)	6 (2.1)	15 (5.3)
	Incomplete resistance	256 (90.1)	11 (3.9)	17 (6.0)

3%小川培地と1%小川培地における耐性値の相関の成績は、完全耐性でとつた場合と不完全耐性でとつた場合とを区別してSMは表1に、PASは表2に、INHは表3にそれぞれ示した。また一致、不一致の例を総括して表4に示した。

まずSMでは、耐性値の一致したものは完全耐性では86.6%、不完全耐性では82.0%である。不一致の例をみると、2段の差のあったものは不完全性の1例だけであつて他はいずれも1段の差であつて、3%小川培地において完全耐性、不完全耐性ともに耐性値の高いものが多く、それぞれ12%、17.3%であり、反対に1%小川培地のほうが耐性値の高かつたものは1.1%および0.7%で少ない。次にPASにおける一致率をみると、完全耐性、不完全耐性ともに91.2%である。不一致率をみると、いずれも1段の差であつて3%小川培地のほうが耐性値の高いものが多く、完全耐性で6.7%、不完全耐性で6.3%であつて、反対に1%小川培地のほうが高い値を示したのは、完全耐性で2.1%、不完全性で2.5%で少ない。最後にINHにおける一致率をみると、完全耐性で92.6%、不完全耐性では90.1%である。不一致の例をみると、2段差のものが2例で他は1段の差であつて、1%小川培地に高いものが多いが、推計学的に検討すると1%小川培地に高いものと3%小川培地に高いものとの間には有意の差はない。

以上を総括すると、一致率、不一致率は完全耐性でとつても不完全耐性でとつても大差はない。SM、PAS、INHの中でもつとも高い一致率を示したのはPAS、INHでこの両者ではほぼ同様であつたが、SMではこの両者に比し多少低い。不一致の例をみると、SM、PASでは3%小川培地に高いものが多く、その傾向はSMにおいてとくに著明であり、INHでは培地による差ははつきりしない。

4 考 察

3%小川培地は1%小川培地に比して KH_2PO_4 の量が多く、したがつてpHはそのまま6.4程度、4%NaOHで処理されたものを0.1cc接種したあとでは

7.0前後となるが、時間の経過とともにさらに酸性に傾くようである。これにひきかえ1%小川培地は7.1程度であつて、中和した材料あるいは菌液をそのまま接種するのでpHはそのままである。したがつて当然培地による耐性値の違いが推定される。事実SMについては、Walton B. Geiger²⁾らはSMの活性は弱アルカリ性で強く、酸性では弱くなるといっている。小川³⁾らの黒野株、H37RV株による実験でも、亀崎⁴⁾のMyco. 607(非病原性)による実験でも、3%小川培地は1%小川培地に比して耐性値が高い。これらの成績は、今回の284例の成績をさらに裏書きしている。

またPASについては、黒野、H37RV株により実験した小川らの成績では、3%、1%小川培地の間に差がなかつたが、しかし小川³⁾の喀痰による耐性値は、3%小川培地に高い値を示すものが多い。これとわれわれの成績と比較すると、一見、感性菌における成績が異なつていような感じがするが、これは小差であつたためであらう。次にINHについては、黒野、H37RV株により実験した小川の成績では3%、1%小川培地の間に差がなかつたが、小川³⁾の昭和37年度厚生省結核療法研究協議会のINH投与前の耐性値の集計では、1%小川培地に高いものが多いが推計学的には検討していない。感性菌では耐性値に差がなかつたのはPAS同様おそらく小差であつたために見落としたものであろうし、INH投与前の耐性値の集計は、今回のわれわれの成績とほぼ同じ傾向を示している。これを要するに、われわれの今回の成績は、諸先進の成績とほぼ一致するものであるが、実際問題として、これを3%小川培地と1%小川培地との一致率からみれば、完全耐性でとつても不完全耐性でとつても、ほぼ同様で、SMでは85%前後、PAS、INHでは90%前後である。

以上の事実は、検査指針の基準のように、抗結核剤をSM、PASの10倍宛の2段階あるいはINHの3段階程度の混入により作った耐性検査培地による検査成績は、大まかにいつて、3%小川培地でも1%小川培地でもほぼ同様であることを示しているものである。しかし細かにみていくとき、INHについてはそれでよいが、SM、PASについては多少問題がある。すなわちSM、PASでは3%小川培地で感性で、1%小川培地で耐性を示すものはごくわずかで問題にならないが、1%小川培地で感性で、3%小川培地で耐性を示すものはSMで10%もあり、PASでは5%もある。このような場合には、3%小川培地を基準と考えれば当然耐性を考えるべきであるが、1%小川培地を基準に考える場合には、これらの中には感性のものも含まれていることを考慮すべきであ

らう。したがつて、培地による差をなくすには、これらのどちらか一つの培地で耐性の検査をすることがもつともよい。この場合は当然、1%小川培地と3%小川培地との耐性菌の限界が違つてくるはずであるが、実際にはこれを一本にして耐性の限界を決めているところに問題がある。しかし耐性の検査は培地だけでなく、接種菌量、その他の種々のことによつて影響されるので、たとえ培地を一つに決めても、ある程度のごぼこは覚悟しなければならない。このようにして考えてみると、耐性検査の成績は化学療法の実施のうえのもつとも大きなよりどころではあるが、それがすべてであつてはならない。結局それは良識ある医師の判断にまかされるべきではなからうか。

5 結 論

検査指針に従い、培地1ccについてSMは10r、100r、PASは1r、10r、INHは0.1r、1r、5rに混入して作った3%小川培地には4% NaOHの喀痰液あるいは菌液を、1%小川培地には中和した喀痰あるいは菌液を0.1cc宛同時に接種して、両培地における耐性値を比較し次のような成績を得た。比較の材料はSM、PAS、INHの投与中あるいは投与後の肺結核症の患者の喀痰、胃液、喉頭粘液、切除肺結核病巣より分離した結核菌284例で、この材料につき同時にSM、PAS、INHの耐性検査を実施したものである。

1) SMでは約85%、PAS、INHでは約90%以上一致した。不一致の例をみると、SM、PASでは3%小川培地で高く出たものが多かつたが、この傾向はSMで著明であつた。またINHでは1%小川培地で高く出るものがわずかに多かつたが、推計学的には有意の差はなかつた。

2) 一致率は完全耐性でとつても、不完全耐性でとつても、ほぼ同じような傾向を示した。

文 献

- 1) 衛生検査指針I(細菌、血清学的検査指針IV)、厚生省編集、昭33。
- 2) Walton B. Geiger, Green and Waksman: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 61: 187, 1946。
- 3) 小川辰次・沢井武・斎藤直藏: 臨床病理, 4: 304, 昭31。
- 4) 亀崎華家: 結核, 35: 153, 昭35。
- 5) 小川辰次: 結核予防会結核予防職員研究所における短期講習会資料, 昭29。
- 6) 小川辰次: 日本医事新報, 1495: 11, 昭27。

Comparison of SM, PAS and INH Sensitivity Test Results Obtained with 1% and 3% Ogawa Media.

According to the Guide for Japanese Standard Tests concerning the SM, PAS and INH sensitivity tests, 3% Ogawa medium is to be used for the direct method, and 1% or 3% Ogawa medium for the indirect method. When one observes the changes in the results of a series of sensitivity tests performed on a single patient by using various types of media, he will find that the results are not arranged in expected order. One of the reasons known to us for a long time is that there is a difference in sensitivity test results obtained with various media. However, there has been no report of clear cut results on this subject. Thus, following the Guide for Japanese Standard Tests, 0.1 ml. of 4% NaOH treated sputa or suspension of tubercle bacilli was inoculated on the 3% Ogawa media containing 10 γ and 100 γ of SM, 1 γ and 10 γ of PAS, 0.1 γ , 1 γ and 5 γ /ml of INH, and 0.1 ml. of neutralized sputa and suspension of bacilli on the 1% Ogawa media. Then, the results of the sensitivity tests obtained from the bacilli grown on these two media were compared. Samples used were sputa, and tubercle bacilli isolated from sputa gastric content, laryngeal swabs of the patients suffering from pulmonary tuberculosis having received or receiving SM, PAS and INH, and the tuberculous lesions of surgically resected lungs, totalling 284. The following is the result obtained.

In respect to SM sensitivity, the results obtained

from these two media were close each other in 85% of samples examined, and as to PAS and INH sensitivity, in more than 90%.

When the cases in which results from two media were widely different, were further investigated, it was found that the number of more resistant strains to SM and PAS were larger when 3% Ogawa medium was used than that when 1% medium used, especially so on SM sensitivity. Whereas, the number of more resistant strains to INH was slightly larger with 1% Ogawa medium than with 3% medium. However, in the latter instances, there was no significant difference statistically.

The percentage of coincidence of the results from 2 media tended to be similar irrespective of the degree of sensitivity.

From the above findings, it is better to use a single type of medium in order to see changes in the sensitivity test results. But in case one has to use two types of media, it has to be borne in mind that somewhat higher values for SM and PAS resistance may be obtained with 3% Ogawa medium than with 1% medium. However, the results of sensitivity tests may be influenced not only by the type of media but also by the inoculum size and others, so that some fluctuation of the results in a series has to be expected. Therefore, one should not depend entirely upon the results of sensitivity tests for the performance of chemotherapy, although it is one of the most important factors. After all, should it not be left to the hands of physicians with good sense?