

原 著

## 結核菌耐性検査培地の保存による薬剤力価の低下に関する研究

大 里 敏 雄

東京都職員共済組合清瀬病院

高 家 久 子

結核予防会結核研究所

受付 昭和 52 年 7 月 9 日

STUDIES ON DECREASE OF DRUG ACTIVITY DURING STORAGE  
OF DRUG-CONTAINING MEDIA FOR DRUG RESISTANCE  
TEST OF TUBERCLE BACILLI

Toshio OHSATO\* and Hisako TAKAYA

(Received for publication July 9, 1977)

In our country 1% Ogawa's egg media are used for drug resistance test of tubercle bacilli. The report presents the results of experimental studies on decrease of drug activity during the storage of drug-containing media in different temperature.

The methods of examination and the results of studies are summarized as follows:

1) The drug-containing media of streptomycin, isoniazid, PAS, rifampicin, ethambutol, ethionamide, cycloserine, kanamycin, capreomycin, viomycin and enviomycin (a new drug produced in Japan and used for treatment of tuberculosis) were prepared and stored in 4~5°C refrigerator, 22°C, 30°C, 37°C thermoregulators. The drug resistance test of H<sub>37</sub>Rv and strains isolated from previously untreated patients were performed at 1, 2 weeks and 1, 2 months after preparation of drug-containing media. The results of test were compared with that of test used drug-containing media before storage (used immediately after preparation).

The decrease of drug activity was most marked in ethionamide and rifampicin containing media stored outside of refrigerator and the decrease of drug activity was not observed in PAS, streptomycin, kanamycin, capreomycin, viomycin and enviomycin containing media. The degree of decrease of drug activity was as follows; rifampicin > ethionamide > cycloserine > isoniazid > ethambutol.

In the case of storage in refrigerator ethionamide showed the decrease of drug activity after two months storage, but other drug did not show the decrease of drug activity within 3 to 6 months.

2) The drug-containing media of streptomycin, kanamycin, capreomycin, viomycin and enviomycin were stored in 30°C thermoregulator and the drug resistance was examined by using these media after 3 and 6 months' storage. According to the test results, slight decrease of drug activity of streptomycin and capreomycin was observed but other drugs did not show the decrease of drug activity within 6 months.

Conclusively, the decrease of drug activity was marked in ethionamide and rifampicin

\* From the Kiyose, Tokyo Metropolitan Hospital, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

containing media and was slight in ethambutol containing media during storage outside the refrigerator. The drug-containing media for drug resistance test of tubercle bacilli should be stored in refrigerator after preparation and be used within 1 month.

## 緒 言

わが国では結核菌の耐性検査培地として1%小川卵培地が広く用いられているが、小川培地を用いた場合 SM, KM, CPM, VM, EVM, TH および RFP の力価が低下することが知られており、力価低下の程度は SM が最も小さく RFP が最も大きい。

一方、薬剤含有培地の保存と薬剤力価の低下の関係については、結核菌検査指針<sup>2)</sup>に「CS, TH は速やかに力価が低下するので氷室に保存した場合でも2週間以内に使用することが望ましい。他の薬剤培地でも氷室保存で1カ月以内に使用するようにつとめなければならない。」という意味の記載があるが、各薬剤培地の保存条件、保存期間と薬剤力価の低下の関係について検討された成績はみられない。

われわれは RFP が医療基準に採用され、RFP の耐性検査が通常の検査として行なわれるようになってから RFP 10  $\mu$ g に完全耐性を示す未治療株が数%に認められることに気付いた。昭和44年に実施された療研の研究成績<sup>2)</sup>によれば、RFP未使用例から分離した菌株で RFP 10  $\mu$ g に完全耐性を示したものはなく、また昭和48年の療研の研究<sup>3)</sup>では、未治療例から分離した菌株のうち RFP 10  $\mu$ g 完全耐性を示したものは0.97%にすぎず、RFP の初回耐性は極めてまれであると考えられる。したがって未治療例で数%にも RFP 10  $\mu$ g 完全耐性が認められることは耐性検査、特に RFP の耐性検査培地に何か問題があるのではないかと考えられる。そこでまず RFP 耐性検査培地について検討したところ、氷室外の保存によつて速やかに RFP の力価が低下することが判明したので、次いでその他の薬剤含有培地についても検討を行なつた結果、耐性検査に際して留意すべき重要な成績が得られたので報告する次第である。

## 研究および実験方法

研究方法：通常の耐性検査における未治療株の RFP の耐性と、検査に用いた RFP 培地の保存期間との関係を検討した（昭和49年5月～6月の例について）。

### 実験方法

実験Ⅰ：RFP, TH, CS, EB, INH および PAS 含有培地を作製し、これをビニール袋に入れて袋の口を閉じ、5℃の氷室、22℃、30℃ および 37℃の恒温器(室)に分けて保存し、1週、2週、1カ月および2カ月後に耐性検査を実施し、培地作製後直ちに実施した耐性検査の成績と比較した。

実験Ⅱ：PAS, SM, KM, CPM, VM および EVM 含有培地は37℃、2カ月保存では著明な力価の低下が認められなかつたので、これらの薬剤含有培地を30℃の恒温器に保存し、3カ月および6カ月後に耐性検査を実施し、高温長期保存の影響を検討した。

実験Ⅲ：RFP, TH, CS, EB および INH 含有培地を5℃の氷室に3カ月および6カ月保存して耐性検査を実施し、低温長期保存の影響を検討した。

I～Ⅲの実験に用いた培地は1%小川培地、菌株は H<sub>37</sub>Rv と未治療患者から分離した株(後藤株)の2株で、10<sup>-3</sup> mg を接種し、3週、4週および6週後に観察を行なつた。

## 研究および実験成績

研究成績：通常の検査における未治療株の RFP 10  $\mu$ g 完全耐性の率と、RFP 耐性検査培地の作製から使用までの期間の関連を検討した。培地は自家製で、この当時は作製後冷暗所に保存し2週以内に使用されている。検討の対象とした時期は昭和49年5月～6月に行なわれた耐性検討例であるが、その成績は表1に示したように培地使用までの期間が6日以内の群では6週判定で RFP 10  $\mu$ g 完全耐性を示したものは3.2%であつたが、保存期

表1 RFP 耐性培地の保存期間と RFP 未使用株の 10  $\mu$ g 完全耐性の関係

保存期間 (室温)	4週判定			6週判定		
	検査数	10 $\mu$ g 完全耐性		検査数	10 $\mu$ g 完全耐性	
総数	214	5	2.3%	226	10	4.4%
～6日	92	1	1.1	95	3	3.2
7～9	67	2	3.0	69	3	4.3
10日～	55	2	3.6	62	4	6.5

表2 RFP 培地の保存成績 (4週判定)

保存期間	保存温度	菌				株			
		H <sub>37</sub> Rv				後藤株			
		RFP 濃度 $\mu\text{g}$				RFP 濃度 $\mu\text{g}$			
		0	10	25	50	0	10	25	50
0		卅	-	-	-	卅	+30	+1	-
1週	5°C	卅	-	-	-	卅	+20	-	-
	22	卅	-	-	-	卅	+30	-	-
	30	卅	-	-	-	卅	+18	-	-
	37	卅	+3	-	-	卅	+80	-	-
2週	5°C	卅	-	-	-	卅	卅	-	-
	22	卅	+	-	-	卅	卅	-	-
	30	卅	+14	-	-	卅	卅	+	-
	37	卅	卅	+5	-	卅	卅	卅	+
1ヵ月	5°C	卅	-	-	-	卅	+200	+50	-
	22	卅	-	-	-	卅	卅	卅	+30
	30	卅	卅	+68	-	卅	卅	卅	卅
	37	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
2ヵ月	5°C	卅	-	-	-	卅	+10	+10	-
	22	卅	卅	卅	+42	卅	卅	卅	+
	30	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
	37	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+

表3 TH 培地の保存成績 (4週判定)

保存期間	保存温度	菌			株		
		H <sub>37</sub> Rv			後藤株		
		TH 濃度 $\mu\text{g}$			TH 濃度 $\mu\text{g}$		
		0	25	50	0	25	50
0		卅	+55	-	卅	卅	-
1週	5°C	卅	+48	-	卅	+200	-
	22	卅	+120	-	卅	卅	-
	30	卅	+110	+3	卅	卅	-
	37	卅	卅	+43	卅	卅	+50
2週	5°C	卅	+97	+5	卅	+100	-
	22	卅	卅	+72	卅	卅200	+
	30	卅	卅	+150	卅	卅400	+100
	37	卅	卅	卅	卅	卅	卅
1ヵ月	5°C	卅	+110	-	卅	+100	-
	22	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	30	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	37	卅	卅	卅	卅	卅	卅
2ヵ月	5°C	卅	卅200	+12	卅	+	+
	22	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	30	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	37	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表4 CS 培地の保存成績 (4週判定)

保存期間	保存温度	菌			株		
		H <sub>37</sub> Rv			後藤株		
		CS 濃度 $\mu\text{g}$			CS 濃度 $\mu\text{g}$		
		0	20	40	0	20	40
0		卅	-	-	+20	-	-
1週	5°C	卅	-	-	+20	-	-
	22	卅	?	-	+37	-	-
	30	卅	+	-	+12	-	-
	37	卅	+10	-	+28	-	-
2週	5°C	卅	-	-	卅	-	-
	22	卅	+1	-	卅	-	-
	30	卅	+10	-	卅	-	-
	37	卅	+32	-	卅	-	-
1ヵ月	5°C	卅	-	-	卅	-	-
	22	卅	+110	-	卅	-	-
	30	卅	+~200	-	卅	+	-
	37	卅	卅	+100	卅	卅	-
2ヵ月	5°C	卅	+30	-	卅	-	-
	22	卅	卅	+~200	卅	卅	-
	30	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	37	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表 5 EB 培地の保存成績 (4週判定)

保存期間	保存温度	菌				株			
		H <sub>37</sub> Rv				後藤株			
		EB 濃度 μg				EB 濃度 μg			
		0	1.25	2.5	5	0	1.25	2.5	5
0		++ <sub>200</sub>	+ <sub>100</sub>	-	-	++	+	-	-
2 週	5°C	+++	++	-	-	+++	+ <sub>100</sub>	-	-
	22	+++	++	-	-	+++	+	-	-
	30	+++	++	-	-	+++	+	-	-
	37	+++	++	-	-	+++	++	-	-
1 カ月	5°C	+++	++	-	-	+++	+	-	-
	22	+++	+++	+ <sub>3</sub>	-	+++	+	-	-
	30	+++	+++	+ <sub>1</sub>	-	+++	+	-	-
	37	+++	+++	+	-	+++	++	+	-
2 カ月	5°C	+++	++	-	-	+++	++	-	-
	22	+++	+++	++	-	+++	++	+	-
	30	+++	+++	++	-	+++	++	+	-
	37	+++	+++	++	-	+++	+++	+	-

注：1 週保存の成績は略。

表 6 INH 培地の保存成績 (4週判定)

保存期間	保存温度	菌					株				
		H <sub>37</sub> Rv					後藤株				
		INH 濃度 μg					INH 濃度 μg				
		0	0.025	0.05	0.1	0.5	0	0.025	0.05	0.1	0.5
1 カ月	5°C	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	22	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	30	+++		+ <sub>5</sub>	+ <sub>1</sub>	-	++		+	-	-
	37	+++		+ <sub>~200</sub>	+ <sub>3</sub>	-	++		+	+	-
2 カ月	5°C	+++	++	-	-	-	+++	-	-	-	-
	22	+++	++	-	-	-	+++	++	+	-	-
	30	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+	-	-
	37	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-

注：1,2 週保存の成績は略。

間が10日以上群では6.5%と2倍以上の率を示した。この成績から RFP 培地は室温保存では力価が低下し、感性株が耐性と判定される可能性があると考えられたので、次の一連の保存実験を行なった。

第 I 実験

RFP, TH, CS, EB, INH および PAS 含有1%小川培地を作製し、5°Cの氷室、22°C、30°C および 37°C 恒温器に保存し、1 週、2 週、1 カ月、2 カ月後に耐性検査を実施し、培地作製直後の耐性検査成績と比較した。RFP 含有培地の成績は表 2 に示したように氷室外の保存では温度の高いほど、保存期間の長くなるほど耐性が高く表

現されている。これは RFP の力価の低下を示しているが、一方氷室に保存した場合は2カ月でも著明な力価の低下は認められないようである。

TH 含有培地では表 3 に示したように、RFP と同様に氷室外の保存では著明な力価の低下が認められる。5°C の氷室保存では1 カ月までは力価の低下は認められないが、2 カ月保存では若干の力価の低下が認められる。

CS 含有培地の保存実験の成績は表 4 に示したが、氷室外の保存では漸次力価の低下していることがわかる。しかし RFP や TH に比べると力価低下の程度はやや少ないと考えられる。

表7 PAS, SM, KM, CPM, VM, EVM 培地の保存成績 (4週間判定)

		(30°C)							
菌 株	保存期間	対照培地	PAS		SM		KM		
			0 25	0 5 $\mu$ g	2 5	5 $\mu$ g	25	50 $\mu$ g	
H <sub>37</sub> Rv	0	卅	—	—	—	—	—	—	
	3カ月	卅	—	—	—	—	—	—	
	6カ月	卅	—	—	+50	—	—	—	
後藤株	0	卅	+20	—	+50	—	+7	—	
	3カ月	卅	+7	—	+50	+2	+10	—	
	6カ月	+100	+3	—	+17	+7	+7	—	
菌 株	保存期間	対照培地	CPM		VM		EVM		
			25	50 $\mu$ g	25	50 $\mu$ g	25	50 $\mu$ g	
H <sub>37</sub> Rv	0	卅	—	—	—	—	—	—	
	3カ月	卅	—	—	—	—	—	—	
	6カ月	卅	+1	—	—	—	—	—	
後藤株	0	卅	—	—	+20	—	—	—	
	3カ月	卅	+10	—	+30	—	+1	—	
	6カ月	+100	+20	—	+50	—	—	—	

EB含有培地の保存実験は1 25  $\mu$ g, 2 5  $\mu$ g および 5  $\mu$ g の3濃度を用いて実施したか、その成績は表5に示したように氷室外保存では1カ月で力価の低下が認められる。

INH含有培地の保存実験では、2週までは氷室外保存でも力価の低下が認められなかつたので、次の表6には1カ月および2カ月保存の成績のみを示したか、氷室外保存では1カ月で力価の低下が認められる。この表で1カ月保存と2カ月保存の両実験でINHの濃度が異なっているのは1カ月保存の実験をまず実施し、この成績からより低い濃度の検討が必要であると考え2カ月保存の実験を再度行なつたからである。

PAS含有培地は0 5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g について保存実験を行なつたか、37°C 2カ月保存では特に力価の低下は認められなかつた(表略)。

### 第II実験

先に述べたようにPAS含有培地は37°C, 2カ月保存でも著明な力価の低下は認められず、またSM, KM, CPM, VM および EVM 含有培地は以前に行なつた実験で37°C 2カ月保存でも著明な力価の低下が認められなかつたので、今回はこれらの薬剤含有培地を30°Cに3カ月および6カ月保存した場合の力価の低下について検討した。PASの濃度は0 25  $\mu$ g, 0 5  $\mu$ g, その他の薬剤は25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g とした。その成績は一括して表7に示したか、3カ月保存では力価の低下はほとんど認められなかつたか、6カ月保存ではSM, CPMに若干の力価低下が認められるようである。

### 第III実験

第I実験ではRFP, TH, CS, EB および INH 含有培地は、氷室に保存した場合は2カ月まではTHを除いては力価の低下は認められなかつたので、これら薬剤含有培地を5°Cの氷室に更に長期に3カ月および6カ月保存した場合の薬剤力価の低下について検討した。その成績は表8に示したように、TH培地以外は6カ月まで著明な力価の低下は認められなかつた。

### 考 案

今回われわれはRFP耐性検査培地の室温保存による力価の低下、すなわち見かけ上の耐性上昇に気付き、各薬剤の耐性検査培地について保存実験を行ない、薬剤の力価低下の問題について検討を加えた。

従来、薬剤含有培地の保存については結核菌検査指針<sup>1)</sup>には“氷室に保存し、1カ月以内に使用するようにつとめなければならぬ。ただし、CS, THは力価の減弱が早いので同じ条件下に保存しても2週以内に使用したほうがよい”と記載されているか、その他の薬剤含有培地については特に記載は認められない。

また市販培地では氷室に保存すること、あるいは10°C以下に保存することなどの注意が書かれているにすぎない。

培地は製造直後から氷室に保存しなければならないことは常識と考えられるか、市販培地の場合、検査室か入手するまでの保存条件はこれにはるかに遠いものと考え

表 8 RFP, TH, CS, EB, INH 培地の保存成績 (4週間判定)

(5°C)

菌 株	保存期間	対照培地	RFP		TH		CS	
			10	50 $\mu$ g	25	50 $\mu$ g	20	40 $\mu$ g
H <sub>37</sub> Rv	0	卍	—	—	+100	—	+50	—
	3カ月	卍	—	—	卍	+28	+	—
	6カ月	卍	—	—	+100	+26	+100	—
後藤株	0	卍	+	—	+20	—	—	—
	3カ月	卍	+150	—	+100	+7	+?	—
	6カ月	卍	+	—	卍	+50	+100	—

  

菌 株	保存期間	対照培地	EB			INH		
			1.25	2.5	5 $\mu$ g	0.025	0.05	0.1 $\mu$ g
H <sub>37</sub> Rv	0	卍	卍	—	—	+150	—	—
	3カ月	卍	卍	—	—	+120	—	—
	6カ月	卍	+100	—	—	+130	—	—
後藤株	0	卍	+200	+2	—	+	—	—
	3カ月	卍	卍500	+4	—	+	+2	—
	6カ月	卍	卍	+3	—	+	—	—

られる。特に夏の荷車あるいは車による輸送、取次店での保存期間、条件を考えると、高温に長くおかれているものと考えなければならぬであろう。

今回のわれわれの保存実験成績からみると、PAS, SM, KM, CPM, VM および EVM 含有培地以外の薬剤含有培地は、高温であるほど、また長期であるほど、保存中に薬剤力価が低下し、その低下の状態は TH, RFP は最も著明であることが判明し、氷室外の保存では1~2週で明らかに力価の低下が認められた。したがって、製造後すぐに培地を入手して氷室に保存することができるようなごく例外的な施設を除けば、市販培地を使用した耐性検査成績の信頼性は低いものといわなければならない。精度の低い検査は大きなマイナスの情報を与えることになるが、耐性検査において不適当な培地を用いた場合、感性菌を耐性菌と誤ることが多く、この危険性は TH, RFP において最も高いことが判明した。日常の耐性検査に不適当な培地が用いられていないかどうかをチェックするためには、H<sub>37</sub>Rv などの標準株の耐性検査を随時実施する他に、未治療患者あるいは RFP 未使用例の RFP の耐性検査成績を注意して検討する以外に方法はないであろう。

療研の細菌科会の昭和49年の調査成績<sup>4)</sup>によれば、全国の医療機関から抽出した467施設のうちアンケートに回答のあつた239施設の79.1%の施設では市販の耐性検査培地を使用していることが報告されており、これらの施設では前述のチェックが是非とも必要であろうと思

れる。療研の昭和44年の報告<sup>2)</sup>では、RFP 未使用例の RFP 10  $\mu$ g 完全耐性は0であり、同じ療研の昭和48年の未治療例の成績<sup>3)</sup>では0.97%で、RFP 未使用例で RFP 10  $\mu$ g に完全耐性を示すものはごくまれであると考えられる。したがって RFP 未使用例で数%以上に RFP の10  $\mu$ g 完全耐性が認められる場合には、まず薬剤力価の低下を考えなければならないであろう。TH 含有培地も RFP 含有培地と同程度あるいはそれ以上に力価が低下するが、もともと耐性と感性を区別することが困難な薬剤であるため、耐性検査成績から薬剤力価の低下を云々することが難しく、この目的には感性と耐性の区別の明瞭な RFP が最も適当であると考えられる。

いずれにしろ、薬剤含有培地は製造直後から氷室に保存することが絶対必要条件であり、この条件の守られていない培地を用いた耐性検査の信頼性は低いものと考えなければならないであろう。

## 結 論

種々の抗結核薬含有1%小川培地の保存による薬剤力価の低下の有無、低下の状況を検討し次の結論を得た。

1) TH, RFP, CS, EB および INH 含有培地は4~5°C の氷室以外の保存では漸次力価が低下する。低下の程度は、TH, RFP 含有培地において最も著明かつ速やかである。これら薬剤含有培地の薬剤力価低下の程度は TH > RFP > CS > INH  $\geq$  EB と考えられる。

2) これらの薬剤含有培地も4~5°C の氷室に保存し

た場合は、かなり長期間力価の低下は認められない。しかし TH 含有培地は2カ月の保存で力価の低下が認められるので1カ月以内に使用することが必要である。

3) PAS, SM, KM, CPM, VM および EVM 含有培地は、室温でかなり長期に保存しても力価の低下はほとんど認められない。

以上より耐性検査培地は製造直後より 4~5°C の氷室に保存することが絶対必要条件であり、特に TH, RFP, CS, INH および EB 含有培地ではこの原則が厳守されなければならない。したがって市販培地はメーカーから検査室の間の流過程においてこの原則をどのようにし

て守るかが大きな課題であろう。

本研究は結核研究所附属病院在職中に行なつた研究であり、この成績の一部は第50回日本結核病学会総会において大里が報告した。

#### 文 献

- 1) 結核菌検査指針：厚生省監修，日本公衆衛生協会発行，1972.
- 2) 日本結核療法研究協議会：結核，45：317，1970.
- 3) 日本結核療法研究協議会：昭和48年研究報告書.
- 4) 日本結核療法研究協議会：昭和49年研究報告書.