

結核菌の振盪培養に関する研究

—振盪培養による耐性度の測定—

昭和34年8月20日 受付

信州大学医学部戸塚内科教室 (指導: 戸塚忠政教授)

荒井 聖 二

Studies on Growth of Mycobacterium Tuberculosis with Shaking Culture Method

—Estimation of the Drug Resistance of Mycobacterium Tuberculosis with Shaking Culture Method—

Seiji Arai

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. T. Tozuka)

緒 言

近年結核症の化学療法並びに外科的療法の普及に伴い、抗結核剤が長期に亘り大量に投与される事により、結核菌の耐性獲得乃至耐性の増加が薬剤の効果に減弱させ、時には症状の増悪さへ見られる事は周知の事実であり、又耐性菌による感染の問題^{①-⑨}と相待つて結核菌の耐性をより早期に且つ正確に検出する必要に迫られている。従来、固形培地での耐性検査ではその耐性決定までに4週乃至は8週の長時日を要し、結核治療の面に大きな支障を来し、この打開の為に既に迅速検査法として多くの耐性検査法が試みられている^{⑩-⑭}。

著者^⑮は先に結核菌を振盪培養する事により菌の発育、増殖がより速やかに得られ、Generation Timeを短縮し得た事を報告したが、これを利用して結核菌の薬剤耐性度を測定し得るか、又これが従来、固形培地による耐性度測定の成績と一致するか否かについて検討し興味ある知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

使用菌株: 人型結核菌感受性株 H₃₇R_v 及び耐性株として H₂ (SM 1000r, PAS 100r, INAH 10r の夫々の単独耐性株) 及び当科入院患者の喀痰中より分離した患者分離株として小林株, 大和株, 三郎株, 清水株及び根本株を用いた。何れも小川培地及びその薬剤加培地に継代培養し、実験に当つては之を Dubos 培地に移植し、一週間振盪培養し均等に増殖せしめたものを用いた。

培地: 培地は Dubos 液体培地 (榮研) を用いた。

処方は前報^⑮に述べた通りである。その 11.3g を蒸留水にて 900ml とし、これに Tween 80 を 0.5% の割合に加えて高圧滅菌器にて 120°C, 15分間滅菌后、

0.5% 血清アルブミン (Fraction V) を 100ml の割合に加えて使用した。

添加薬剤: 添加薬剤はストレプトマイシン (明治製薬 Crystalline Dihydrostreptomycin Sulfate, 以下 SM), パス (第一製薬パスナール, 以下 PAS) 及びヒドラジット (武田製薬ハイコジット, 以下 INAH) を使用し, SM は注射用蒸留水にて溶解后 0.5% Tween-Albumin 培地にて希釈し, PAS は 0.5% Tween-Albumin 培地にて溶解希釈し, INAH は注射液を用い同様に希釈した。

培養: 培養には島津 AKA 光電比濁計の比濁用セルと同質のガラスで特別に製作した L 型試験管を用い、之に上記培地を 9ml 入れ、一週間振盪培養の菌液を 1 ml 宛接種し、孵卵器内の振盪装置^⑯に培養液面を水平にとりつけ、37±1°C にて7日間振盪し乍ら培養した。振盪装置は当教室にて考案したもので、1分間に30回の振盪数を持ち、水平面に対して13度上・下に運動する。

観察: 菌の発育は日数を追つて、島津 AKA 光電比濁計に L 型試験管をそのまま差し込み、標準管 No. 5 の Optical Density (以下 O.D.) を 100 とし、Filter なしでその O.D. を測定、計算した。同様に接種した対照を静置のまま前者と同一条件の下に培養し、両者の発育を比較した。

実験成績

実験 I: H₃₇R_v 株及び H₂ 株の振盪培養に対する薬剤添加の影響

1) SM 加培地に於ける発育

SM を加えない培地 (以下 0r 培地) 及び 1r/cc, 10r/cc, 100r/cc の割合に SM を加えた培地 (以下 夫々 1r, 10r, 100r 培地) の 4 段階を作つて実験を

行つた。

$H_{87}Rv$ に於ては「表1」及び「図1」に示す如く振盪培養では0r 培地のみが培養開始より2日後から菌の増殖が著明で logarithmic な發育をするのに対し、1r から100r 培地では菌の増殖は見られず、反つてO、D. は減少の傾向を示している。静置培養では0r 培地のみが arithmetic な發育を示すのみで、1r 以上の培地では振盪培養に於けると同様何れも菌の増殖は見られなかつた。0r 培地に於ける振盪培養と静置培養との Generation Time (以下 G.T.) を計算すると夫々18.1時間と97.0時間となり、振盪による G.T. の短縮が著明である。

H_2 SM 1000r 耐性株に於ては「表2」及び「図2」に示す如く、振盪培養では0r 培地及び1r から100r 培地の何れの培地にても2日後より菌の増殖は著明で logarithmic な發育をする。静置培養では何れの培地に於ても菌の増殖は緩やかで arithmetic な發育である。振盪培養に於ける0r, 1r, 10r 及び100r 培地での G.T. は夫々16.6, 16.5, 17.0及び16.3時間で有意な差は見られなかつた。静置培養では夫々62.4, 51.6,

62.4及び86.4時間となり、振盪により G.T. の著明な短縮を得た。

2) PAS 加培地に於ける發育

PAS の濃度は SM の場合と同様に4段階の培地を作り実験を行つた。

PAS 感受性の $H_{87}Rv$ の發育は「表3」及び「図3」に示す如くである。振盪培養で0r 培地では1日後より菌の増殖は著明で4日後には比濁計にて測定不能の状態に達した。1r から100r 培地では SM 加培地に於けるが如く、菌の發育抑制効果が完全でなく或程度の増殖が見られたが、薬剤を加えない培地との發育の差は3日以后より著明となつた。静置培養に於ては始めは何れの培地に於ても緩やかな増殖が見られるが、6日後になつて僅かながら發育の差が見られるのみであつた。振盪培養に於ける0r 培地及び1~100r 薬剤加培地の G.T. を計算すると23.6時間と36.0, 33.6及び35.3時間となり、0r 培地と薬剤加培地との間には明らかな差が見られる。静置培養では69.6時間と86.4, 78.4及び91.2時間となつている。

H_2 PAS 100r 耐性株に於ては「表4」及び「図4」

表1 SM 加培地に於ける $H_{87}Rv$ の發育 (Optical Density)

培養 日数	装 置 時	SM加 r/c.c.					
		1	2	3	4	5	6
振盪 培養	0	46.1	84	155	525	1300	1720
	1	43.6	63	66	65	61	61
	10	44.8	57	50	50	48	45
	100	48.8	56	54	50	46	33
静置 培養	0	46.1	73	94	108	125	153
	1	38.5	59	71	73	70	68
	10	38.5	56	58	55	58	46
	100	44.8	59	48	54	45	41

表2 SM 加培地に於ける H_2 SM 1000r 耐性株の發育 (Optical Density)

培養 日数	装 置 時	SM加 r/c.c.					
		1	2	3	4	5	6
振盪 培養	0	23.1	43	88	325	850	1113
	1	23.1	41	80	375	838	1050
	10	32.1	43	85	300	813	1150
	100	30.7	37	79	300	788	1113
静置 培養	0	20.6	35	48	63	78	94
	1	20.6	32	45	61	84	93
	10	21.8	35	46	60	76	93
	100	28.2	38	53	69	85	98

図1 SM 加0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 ($H_{87}Rv$)

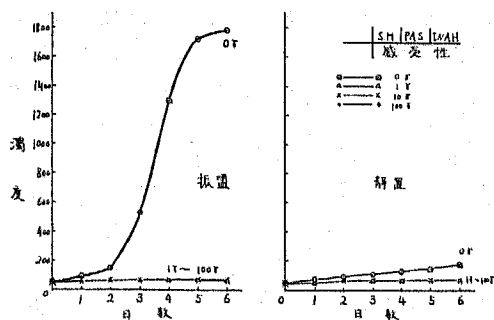


図2 SM 加0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (H_2 , 耐性度: SM 1000r)

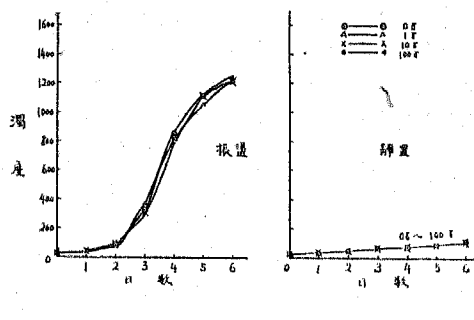
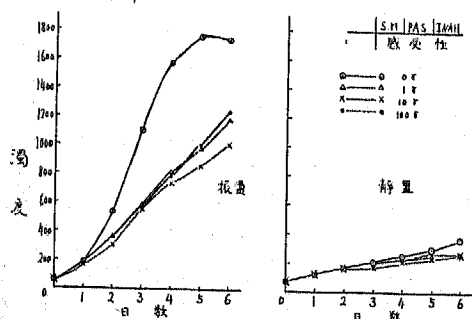
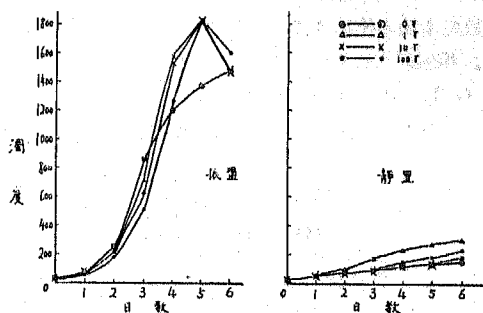


表3 PAS加培地に於ける $H_{87}R_v$ の發育
(Optical Density)

培養 PAS加 r/c.c.	培養 日数	装 置 時	1	2	3	4	6	6
			1	2	3	4	6	6
振盪培養	0	61	190	538	1000	1563	1750	1725
	1	70	195	362	582	813	975	1175
	10	58	168	300	545	738	850	1000
	100	64	193	362	558	788	1000	1225
静置培養	0	72	123	162	208	250	300	363
	1	73	128	162	201	225	256	275
	10	66	113	150	177	213	237	263
	100	74	130	162	201	225	263	256

表4 PAS加培地に於ける H_2 PAS 100r
耐性株の發育 (Optical Density)

培養 PAS加 r/c.c.	培養 日数	装 置 時	1	2	3	4	5	6
			1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	26	68	250	860	1200	1375	1475
	1	26	65	213	634	1525	1825	1475
	10	26	69	237	710	1588	1825	1475
	100	26	58	175	506	1263	1838	1600
静置培養	0	23	50	75	94	125	138	150
	1	26	58	93	177	238	269	300
	10	26	58	89	100	138	150	163
	100	25	53	88	100	144	188	225

図3 PAS加0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 ($H_{87}R_v$)図4 PAS加0.5 Tween-Albumin 培地による振盪培養 (H_2 , 耐性度: PAS 100r)

に示す如く、振盪培養では0rから100rの何れの培地に於ても2日後より菌の増殖は著明で4日後乃至5日後には比濁計の測定不能の域にまで達する。0r培地では3日目頃よりやや粗大な粒子状塊が現われ始め、菌の増殖は著明であるけれども4日後より他の培地に比し見かけ上濁度が落ちて来た。静置培養では何れの培地に於ても皆 arithmetic な發育であつた。振盪培養での0r, 1r, 10r及び100r培地に於けるG.T.は夫々14.2, 15.7, 15.9及び16.4時間で殆んど差はなく、静置培養では夫々39.1, 39.6, 35.0及び43.2時間であつた。

3) INAH 加培地に於ける發育

薬剤を加えない培地(0r培地)及び0.1r/cc, 1r/cc及び10r/ccにINAHを加えた培地で実験を行つた。

INAH感受性株 $H_{87}R_v$ に於ては「表5」及び「図5」に示す如くである。振盪培養に於て薬剤を加えない0r培地では1日後より菌の増殖は著明で4日後には比濁計で測定不能の域にまで達し、以後見かけ上濁度が落ちて来ている。0.1rから10r培地では1日後のO.D.は接種時に比し約2倍乃至2.5倍と増加するも、以後は漸次減少の傾向を示し、5日後より再び増加す

る傾向を示している。しかし薬剤を加えない培地と加えた培地との發育の差は2日以後には著明であつた。振盪培養及び静置培養の0r培地に於けるG.T.は夫々20.5及び61.4時間であつた。

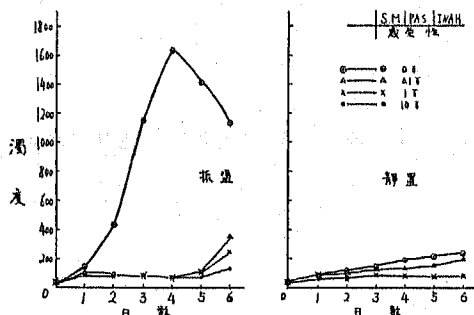
H_2 INAH 10r耐性株に於ては「表6」及び「図6」に示す如くで、振盪培養では何れの培地に於けるも1日後より菌の増殖は著明で3日後には比濁計で測定不能の域にまで達し、以後O.D.は見かけ上落ちて来ている。この理由については前報²⁰⁾に述べた。静置培養では何れの培地に於ても皆同程度の緩やかな菌の増殖を示している。0r, 0.1r, 1r及び10r培地に於けるG.T.は振盪培養では夫々22.6, 22.3, 22.5及び22.4時間で殆んど差はなく、静置培養では夫々51.6, 52.8, 50.4及び49.0時間であつた。

小 括

感受性株 $H_{87}R_v$ 及び各種薬剤単独耐性株 H_2 についてSM加培地、PAS加培地及びINAH加培地に於ける振盪培養を行つた結果、感受性株 $H_{87}R_v$ はSM加培地及びINAH加培地に於ては薬剤を加えた培地に於てO.D.は1日後までは増加するが、それ以後は殆ん

表 5 INAH 加培地に於ける $H_{87}R_v$ の發育 (Optical Density)

	培養 日数	INAH加 r/c.c.	装 置 時	1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	37.8	143	430	1155	1630	1410	1130	
	0.1	36.6	100	92	79	69	107	354	
	1	41.1	93	86	79	69	114	242	
	10	39.0	81	85	68	64	66	139	
静置培養	0	40.4	84	119	147	189	213	236	
	0.1	40.4	80	101	129	131	150	193	
	1	37.8	77	61	86	83	77	83	
	10	36.6	62	78	86	80	80	75	

図 5 INAH 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 ($H_{87}R_v$)

ど増加せず対照の 0r 培地に比較して著明な差を認める事が出来る。PAS 加培地にてはその接種菌量が前二者の約1.5倍 (O.D.として60乃至70, 菌量として約0.3mg/cc) 接種した為か或程度の菌の増殖が見られたが、グラフで示せば薬剤を加えない培地との間には菌の發育の差は著明であり、G.T.は対照の 0r 培地での23.6時間に対し薬剤加培地では夫々36.0, 33.6, 35.3時間となつている。

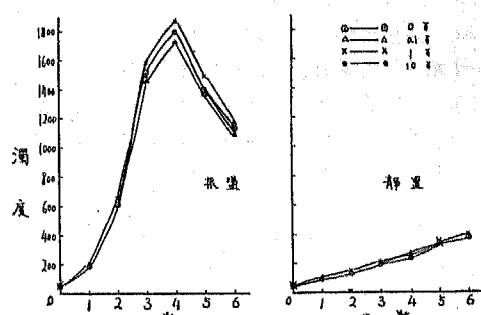
各単独耐性株 H_2 に於ては夫々各濃度の薬剤加培地に於ても1日乃至2日后より菌の増殖は著明であり、0r培地に於ける發育と比較して有意の差は認められない。即ち薬剤加振盪培養では薬剤の添加は感受性株に対しても耐性株に対してもその發育に促進或は抑制は認められない。従つて感受性株の場合には振盪培養を応用すれば、早ければ2日后遅くも3日乃至4日後には薬剤加培地との間に發育の差が著明となり、耐性度の判定が可能であると思われる。

実験Ⅱ：患者分離株の振盪培養による耐性度測定

実験Ⅰの成績を応用して、当科入院患者の喀痰中よ

表 6 INAH 加培地に於ける H_2 INAH 10r 耐性株の發育 (Optical Density)

	培養 日数	INAH r/c.c.	装 置 時	1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	53.6	187	608	1510	1790	1390	1130	
	0.1	52.5	185	618	1450	1720	1360	1080	
	1	58.5	202	658	1580	1860	1480	1170	
	10	57.2	194	655	1490	1790	1390	1090	
静置培養	0	53.6	90	131	193	236	337	374	
	0.1	53.6	94	135	193	242	332	374	
	1	57.2	95	142	200	254	332	398	
	10	56.2	96	145	200	266	332	374	

図 6 INAH 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (H_2 , 耐性度: INAH 10r)

り分離した患者分離株について実験を行つた。

1) SM 加培地に於ける發育

a) 小林株：固形培地での SM 耐性度は「図 7」に示す如く 1r 完全耐性、10r 不完全耐性菌で、成績は「表 7」及び「図 7」に示す。

薬剤を加えない培地及び 1r 加培地では 1 日后より菌の増殖は著明であるのに対し、10r 及び 100r 加培地では 2 日后より O.D. の増加は殆んど見られずかえつて減少の傾向を見、その差は著明である。静置培養でも殆んど同様の傾向を示すもその發育は緩やかで各培地間の發育の差はあまり著明でない。0r 及び 1r 加培地での G.T. は振盪培養では 19.9 及び 20.1 時間、静置培養では 27.6 及び 49.5 時間であつた。

b) 大和株：固形培地での SM 耐性度は「図 8」に示す如く 1r 不完全耐性菌で、成績は「表 8」及び「図 8」に示す。振盪培養では薬剤を加えない培地のみ 1 日后より菌の増殖が著明であるのに対し、1r から 100r 加培地では殆んど増殖は見られない。静置培養では 0r 培地のみ arithmetic な發育をする。振盪培養及び静置培養の 0r 培地での G.T. は夫々 18.7 及び 36.2

時間であつた。

以上の振盪培養の成績から見ると小林株は 0r, 1r 培地に発育し, 10r 及び 100r 培地に発育せず, 大和株は 0r 培地にのみ発育し, 固形培地上の完全耐性の判定と一致する。

2) PAS 加培地に於ける発育

a) 三邨株: 固形培地での PAS 耐性は「図9」に示す如く 100r 完全耐性菌で, 成績は「表9」及び「図9」に示す。振盪培養では薬剤を加えない培地及び加えた培地の何れにても1日後より菌の増殖は著明で5日後には最高 (O.D. 1800 以上) に達し, 6日後には見かけ上 O.D. は落ちて来る。静置培養では何れの培地にても arithmetic な発育である。0r, 1r, 10r 及び 100r 培地に於ける G.T. は振盪培養では夫々 19.4, 19.6, 19.8 及び 20.3 時間, 静置培養では夫々 40.1, 37.4, 38.4 及び 35.5 時間であつた。

b) 清水株: 固形培地での PAS 耐性は「図10」に示す如く 100r 耐性菌で, 成績は「表10」及び「図10」に示す。振盪培養では三邨株と同様何れの培地にても1日後より菌の増殖は著明で, 6日後には最高に達す

る。静置培養では何れの培地にても大体 arithmetic な発育であるが, 1r 培地では他の培地に比し2日後より菌の増殖はやゝ上まわっている。0r, 1r, 10r 及び 100r 培地に於ける G.T. は振盪培養では夫々 24.6, 23.2, 22.9 及び 22.0 時間, 静置培養では夫々 32.9, 28.9, 31.5 及び 32.3 時間であつた。

この場合すべて耐性菌を使用したので対照との発育に差はなく, 固形培地による耐性度の判定と同様な成績を示した。

3) INAH 加培地に於ける発育

a) 三邨株: 固形培地での INAH 耐性は「図11」に示す如く 0.1r 完全耐性菌で, 成績は「表11」及び「図11」に示す。振盪培養に於て薬剤を加えない培地及び 0.1r 加培地では1日目より菌の増殖は著明で, 4日後には最高に達し以後は見かけ上 O.D. が落ちて来ている。之に対し 1r 及び 10r 加培地では1日後の O.D. は夫々 147 と 124 と増加しているが, 以後は殆んど増加は見られず, 1r 培地では4日後 10r 培地では5日後より O.D. が増加の傾向を示して来ているが, 0r 及び 0.1r 培地との間には発育の差が著明である。静

表7 SM 加培地に於ける小林株の発育
(Optical Density)

培養日数 SM r/c.c.	装置時	培養日数					
		1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	39.8	142	438	1181	1725	1800
	1	41.1	142	363	706	1100	1250
	10	37.2	96	85	83	81	79
	100	42.3	82	73	69	73	66
静置培養	0	42.3	100	183	261	335	413
	1	37.2	94	143	209	258	275
	10	47.5	90	125	125	130	125
	100	38.5	74	71	70	68	68

表8 SM 加培地に於ける大和株の発育
(Optical Density)

培養日数 SM r/c.c.	装置時	培養日数					
		1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	26.9	106	288	900	1525	1675
	1	25.7	74	104	106	110	108
	10	33.1	47	49	48	49	36
	100	25.7	47	44	43	43	40
静置培養	0	32.1	67	100	138	163	193
	1	29.5	66	89	84	94	94
	10	29.5	53	56	54	55	53
	100	25.7	45	39	41	38	33

図7 SM 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (小林株)

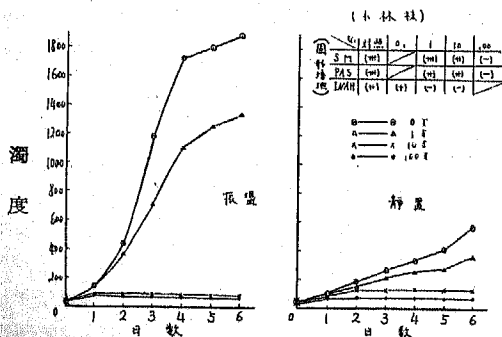


図8 SM 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (大和株)

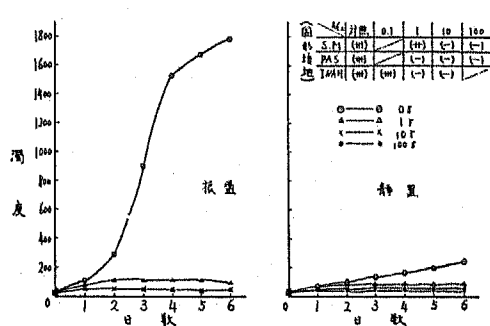
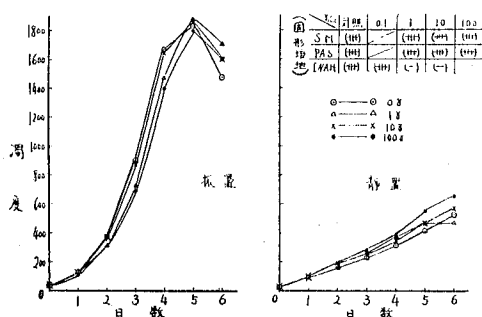


表9 PAS 加培地に於ける三邨株の發育
(Optical Density)

培養日数 PAS r/c.c.	装置時	培養日数					
		1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	33.8	135	372	900	1675	1825
	1	32.4	133	310	722	1475	1875
	10	39.8	133	372	874	1650	1838
	100	39.8	120	310	698	1400	1800
静置培養	0	34	90	162	227	313	413
	1	34	99	172	265	375	463
	10	32	100	186	265	363	463
	100	29	95	180	278	388	550

図9 PAS 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (三邨株)



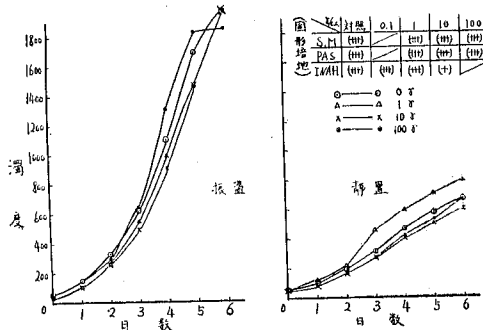
置培養に於ても略同様の傾向が見られるが、その増殖は arithmetic で一週間では發育の差は僅かである。0r 及び 0.1r 培地に於ける G.T.は振盪培養では 23.6 及び 25.9時間、静置培養では 45.6 及び 41.0時間であった。

b) 清水株：固形培地での INAH 耐性度は「図12」に示す如く 1r 完全耐性、10r 不完全耐性菌で、成績は「表12」及び「図12」に示す。振盪培養に於ては薬剤を加えない培地及び 0.1r 培地では 1 日後より菌の増殖は著明で、6 日後には最高に達している。(1r 培地では雑菌混入) 10r 培地では接種時他の培地に比しやゝ菌量が多かつたにもかかわらず、菌の増殖は 4 日後迄緩やかで 4 日後より増殖は著明となるも、6 日後に於ける O.D.は 0r 及び 0.1r 培地のそれに比し $\frac{1}{2}$ 以下であり、發育の差は明らかである。静置培養に於ても略同様の傾向が見られるが、その増殖は arithmetic で一週後に於いても發育の差は僅かである。振盪培養に於ける 0r, 0.1r 及び 10r 培地での G.T.は夫々 24.6, 25.0 及び 48.7時間、静置培養では夫々 41.1, 36.2 及び 61.7時間であった。

表10 PAS 加培地に於ける清水株の發育
(Optical Density)

培養日数 PAS r/c.c.	装置時	培養日数					
		1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	56	145	322	620	1100	1688
	1	44	115	260	545	988	1475
	10	39	105	250	494	913	1475
	100	51	150	297	634	1313	1825
静置培養	0	59	100	193	315	463	569
	1	53	105	199	455	588	700
	10	42	88	168	265	400	501
	100	40	88	162	265	413	525

図10 PAS 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (清水株)



c) 根本株：固形培地での INAH 耐性度は「図13」に示す如く 10r 完全耐性菌で、成績は「表13」及び「図13」に示す。振盪培養では薬剤を加えない培地及び各濃度加培地の何れの培地にも 1 日後より菌の増殖は著明で logarithmic な發育を示し、0r 培地では 5 日後、その他の培地では 4 日後より見かけ上 O.D.が落ちて来る。静置培養では何れの培地に於いても arithmetic な發育を示す。振盪培養に於ける 0r, 0.1r, 1r 及び 10r 培地での G.T.は夫々 20.4, 20.3, 22.5 及び 21.7時間、静置培養では夫々 45.6, 46.3, 49.5 及び 57.7時間であった。

以上振盪培養では三邨株では 0.1r 培地に發育、1r 以上では發育せず、固形培地での耐性度判定の成績と一致し、清水株は 1r 培地は雑菌汚染の爲判定不能であつたが、0.1r 培地に發育、10r 培地に軽度發育を示し、固形培地の成績とほぼ一致し、根本株は耐性株で各濃度の培地ですべて対照と等しい發育を示し、固形培地での成績と一致した結果であつた。

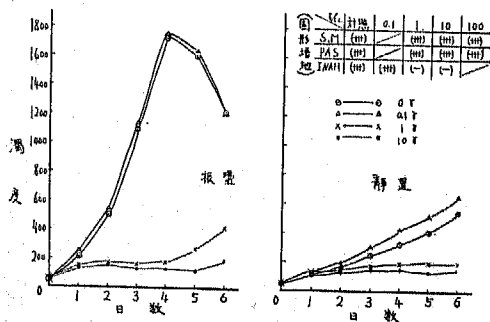
小 括

患者分離株の小林株、大和株、三邨株、清水株及び

表11 INAH 加培地に於ける三邨株の發育
(Optical Density)

	培養日数 INAH γ/c.c.	装置時	培養日数					
			1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	51.2	208	500	1085	1720	1590	1210
	0.1	56.2	253	540	1130	1740	1630	1200
	1	57.2	147	165	159	173	266	417
	10	52.5	124	135	124	121	109	183
静置培養	0	50.0	107	161	241	322	408	541
	0.1	61.0	128	197	300	420	515	649
	1	63.4	128	152	178	191	195	195
	10	61.0	112	126	143	151	133	151

図11 INAH 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (三邨株)



根本株の5株を用いて、SM, PAS 及び INAH を夫々の濃度に加えた培地にて振盪培養を行った結果、不完全耐性度と同濃度の SM 加培地にては小林株、大和株共に菌の發育は抑制され、完全耐性度と同濃度の培地、即ち小林株では 1γ 培地、大和株では 0γ 培地でのみ菌の増殖が著明で、両者の發育の差は明らかであつた。従つてこの方法では固形培地でのいわゆる不完全耐性という事は現われず、完全耐性度と一致した成績が示された。

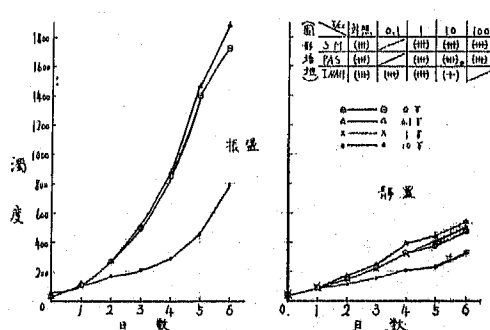
PAS 加培地にては三邨株、清水株共に PAS 100γ 完全耐性菌で、振盪培養でも之と一致した成績であつた。

INAH 加培地にては三邨株、根本株共に固形培地での耐性度と一致した濃度の培地で菌の發育を見、固形培地での耐性度の成績と一致した結果が得られた。しかし清水株では固形培地での不完全耐性度と一致した 10γ 培地では菌の増殖は緩やかではあるが、或程度の發育が見られ、他の培地での菌の増殖との間には明らかな差があり、1γ 加培地での成績は雑菌が混入し結果が得られなかつたが、不完全耐性度を顯示すると思わ

表12 INAH 加培地に於ける清水株の發育
(Optical Density)

	培養日数 INAH γ/c.c.	装置時	培養日数					
			1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	39.0	112	277	488	850	1400	1720
	0.1	40.4	119	277	500	865	1460	1880
	1	45.3	(500) C	C	C	C	C	C
	10	51.2	102	171	206	284	457	790
静置培養	0	45.3	97	149	222	327	374	468
	0.1	43.8	97	161	246	385	438	540
	1	45.3	94	161	224	320	392	480
	10	45.3	90	119	156	202	228	326

図12 INAH 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (清水株)



れる成績であつた。

以上の事により患者分離株に於ても振盪培養を応用した場合、固形培地での耐性度とよく一致した成績が得られ、しかもより顕著な成績であり、更に又菌の増殖を促進させる事により、早ければ2日乃至3日後にはその耐性度を判定する事が可能である。

考 察

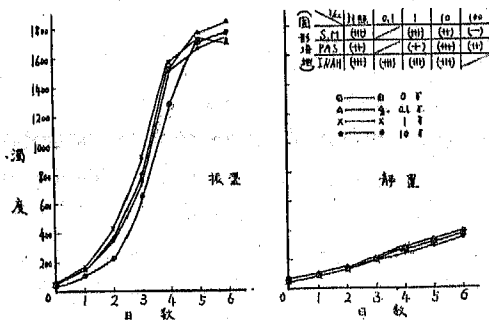
Dnbos 等⁽²⁷⁾⁻⁽²⁹⁾によつて抗酸性菌の培養に Tween-Albumin 培地が利用されて以来、その發育を促進させる事が出来、更にこの培地を振盪したり通氣を行つて、培地に酸素の供給を容易にする事により、抗酸性菌の發育をより一層促進させ得る事が知られ、振盪による人型結核菌の發育促進効果は内外の学者により認められ、Halpern 等⁽³⁰⁾、Volk 等⁽³¹⁾、Miller 等⁽³²⁾、青柳等⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽⁴¹⁾、川村等⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾、呉・勝又⁽³⁷⁾、戸塚等⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾及び土屋⁽⁴⁰⁾などの報告がある。

著者は前報⁽²⁶⁾に於て教室保存の人型菌 H₃₇R_v 及び新鮮患者分離株を用い、振盪培養が菌の發育、増殖を促進せしめ、Generation Time を短縮し得る事を認め、之により結核菌の早期発見ひいては結核の早期治

表13 INAH 加培地に於ける根本株の発育
(Optical Density)

培養 日数	INAH r/c.c.	装 置 時	1	2	3	4	5	6
			1	2	3	4	5	6
振盪培養	0	43.8	112	223	652	1280	1700	1770
	0.1	57.2	147	372	805	1530	1770	1840
	1	54.8	173	430	925	1570	1710	1700
	10	56.2	152	358	760	1510	1660	1720
静置培養	0	48.8	88	131	194	261	314	374
	0.1	50.0	93	138	199	273	326	385
	1	53.6	97	138	197	266	318	385
	10	61.0	107	145	194	254	286	356

図13 INAH 加 0.5% Tween-Albumin 培地による振盪培養 (根本株)



療並びに薬剤耐性菌の早期検出法として利用し得る可能性を報告した。

Dubos 培地による結核菌の薬剤耐性検査は静置培養では矢込等²²⁾は $H_{87}Rv$ 、青山 B 株及び患者分離株 F 株で添加薬剤に INAH を用い、得られた O.D. より Treffers の方法²³⁾で ID_{50} を求め、判定は 7~10 日目頃行うのが適当であるとし、高津等²⁴⁾は 3% 小川培地で分離した患者分離株を用い、添加薬剤は SM, PAS, INAH の三者について行い、培養 2 週間成績を判定し得ると報告し、又中泉²⁵⁾は Dubos-Youmans 培地による間接法で、馬場等²⁶⁾は Kirchner 液体培地で直接法及び患者分離株を用い夫々耐性検査を報告している。

振盪培養を用いた報告は現在の所青柳・水野²⁷⁾の報告があるのみで、氏等は Tween 80 1% 加 Sauton 培地で $H_{87}Rv$ 及び *M. avium* を用い、薬剤は SM, PAS, INAH, Viomycin, Tibion, Pyrazinamid, Levulinic acid oxime, Angstromycin, N-hydroxy-2-pyridine thione 及び Pyridomycin 等の既知抗結核剤 10 種について、Treffers の方法²³⁾で ID_{50} を求

め、人型菌で 48 時間以内、*M. avium* では 8 時間以内で再現性のある ID_{50} が得られると報告している。

現在迄の所静置培養では患者分離株について行つた報告はあるが、振盪培養では $H_{87}Rv$ 及び *M. avium* 等についての報告のみで、患者分離株を用いた報告には接しない。

今回振盪培養を利用して、感受性株 $H_{87}Rv$ 及び H_2 株の SM, PAS, INAH の夫々単独耐性株及び当科入院患者喀痰中より分離した患者分離株 5 株を用いて、その耐性度の測定が可能であるか、又従来の固形耐性培地での成績と一致するか否かについて検討した。

厚生省衛生検査指針の結核菌検査指針²⁸⁾に定められた薬剤濃度は 10 倍階段稀釈法をとつており、著者の目的は臨床検査に応用する事であり、又従来の固形培地の成績と比較するに便利な為に 10 倍稀釈法をとり、SM 及び PAS は 0, 1, 10, 100 r/cc とし INAH は 0, 0.1, 1, 10 r/cc の 4 段階に定めて実験を行い、菌の発育は濁度をもつて表わし、この濁度の差即ち菌の発育の差を比較して耐性度の判定を行つた。

小括に於て述べた如く振盪培養により、感受性株 $H_{87}Rv$ に於ては SM 或は INAH を加えた培地では菌の増殖は見られず、又耐性株 H_2 に於ては何れの培地にも同程度の菌の増殖を示しているが、唯 $H_{87}Rv$ の PAS 加培地では薬剤加培地にも或程度の発育が見られた。之は SM 及び INAH 加培地に比し接種菌量が約 1.5 倍 (O.D. として 60 乃至 70、菌量として約 0.3 mg/cc) 接種されており、固形培地に於て接種菌量が多ければもとの耐性度より高濃度の培地にも発育する事と同じ理由²⁹⁾によるものと考えられ、この場合に於ても接種菌量が多過ぎた為と思われる。しかし薬剤を加えない培地との菌の発育の差は 3 日乃至 4 日後には明らかとなり耐性の判定は可能である。

患者分離株に於ては固形培地での耐性度の成績と一致した結果であつたが、SM 加培地での小林株及び大和株と INAH 加培地での清水株の振盪培養で、夫々菌の不完全耐性度と一致した薬剤濃度では菌の発育は全く抑制されるか或は殆んど増殖が認められなかつた。患者分離株は種々の耐性度の菌の集合である事から考えると、小林株、大和株及び清水株の中に含まれる不完全耐性菌の数が少い事と同時に、液体培地では添加薬剤がよく混和し、従つて薬剤が菌に均等に作用する為に不完全耐性菌が発育しなかつたものと思われる。

固形培地での耐性度と液体培地での耐性度とが一致するか否かについて、馬場等²⁶⁾は Kirchner 培地で

迅速耐性測定を行い、SMでは可成り一致したが、INAHでは半数しか一致せず大部分は迅速法の方が耐性が高く現われたと述べ、中泉^⑥はDubos-Youmans培地での間接法と小川培地による直接法とを比較し、一般患者51例についての結果はPAS及びINAHでは耐性値の一致するものは夫々92%及び88%と何れも90%内外の値を示し、SMは78%でSM、PASでは直接固形培地の示した値は間接液体培地の値より高く現われたと述べている。之に対し今村^④は小川培地に比しSM及びINAHは10倍の高感受性が見られ、PASに於ては著しく不鮮明であつたとし、又Fischer^⑤、山根^⑩等もSMに対する結核菌の感受性がSauton培地、Lockeman培地等Tween 80を含有しない培地に比して、Dubos培地を用いる場合には見かけ上10倍の高感受性に検定される事を報告しているが、著者の行つた実験ではH₈₇Rv、H₂及び患者分離株の何れに於ても固形培地での耐性度とよく一致した成績が得られた。著者は振盪に際し0.5%にTween 80を添加して用いる必要のある事を既に報告^⑨したが、Tween 80の薬剤作用に及ぼす影響も考えなければならない。青柳等^{⑪⑫}はTween 80を用いた場合薬剤効果が抑制されたり、又は促進される事もあり得ると述べている。著者の成績では耐性菌に対して、Tween 80が薬剤の作用に促進或は抑制的な効果を与える成績は認められなかつた。但しPASに於てH₈₇Rv株の完全発育抑制が見られなかつた事は今後検討を要するものであろう。

固形培地中の薬剤の力価はその保存並びに培養の時日と共に低下してゆく事は周知の通りで、小川(政)^⑬は1% KH₂PO₄培地に於てDHSMは氷室では6週でも殆んど変わらないが、37°Cでは $\frac{1}{2} \sim \frac{2}{3}$ になり、INAHは不安定で氷室で6週後に $\frac{1}{2} \sim \frac{2}{3}$ となり、37°Cでは2週で $\frac{1}{2} \sim \frac{3}{4}$ 、4週で $\frac{1}{4}$ 、6週で $\frac{1}{4} \sim \frac{1}{8}$ と急激に減弱し、PASは37°Cの保存では僅少乍ら減弱が見られるが、氷室では4週程度では力価は減弱しないと考えてよいと述べており、長時日の保存乃至は培養中にその薬剤の力価の低下を来し、その耐性検査は不正確さを増して来る。之に対し土屋^⑭はB.C.G.菌を用い、小川培地保存による薬剤の効力低下について、SM及びINAHは5°C以下及び28°Cでは低下は認められず、PASは5°C以下保存では12週より、28°C保存では8週より僅かに効力の低下を認めたと報告している。又小川(辰)^⑮は培地中に加えられた抗結核剤は37°Cに放置されると次第に能力が減少して来る事を認め、又判定が長びくと培地の中で耐性になつたのではないかと思われる様な菌が発育して来る故、判定はなるべく

早く行つた方がよいと述べている。この点著者の行つたTween-Albumin培地による振盪培養では、その判定までに極めて短時日でよく、2日乃至3日後には判定が可能で、薬剤の力価の低下は静置培養に比し明らかに少いものと考えてよいであらう。

固形培地に於ては又その製作上凝固滅菌する前に薬剤の添加をする為、熱により力価の変化する薬剤はその能力の低下を計算して添加せねばならず、小川(辰)^⑮は85°C、40分凝固滅菌でSMの能力の低下率を50%としており、中泉^⑥はSMに於ては熱分解と卵蛋白の吸着の為有効薬剤濃度の減少が認められ、しかもそれが血清凝固器による熱処理の行い方により毎回一定に出来ぬ欠点がある事が考えられると述べており、固形培地では一般に添加薬剤の濃度を一定にし難く、又菌に対して薬剤の作用が不均一となり勝ちである。耐性検査を行う場合培地の条件として、薬剤が均等に混和し、従つて菌に対して平等に作用するもの、発育が早くなるべく早く判定出来るもの、又少量の菌でも速やかに発育を示すもの、雑菌が発育しないもの、薬剤を加えた後は加熱する必要のないもの、集落の計算の出来るもの等の要件があげられるが、Tween-Albumin培地では之等の条件に適しており、又Treffers^⑯も指摘している如く液体培地で比濁計を用いて測定する場合、非常に迅速である事、数字的評価の客観性がある事、初期の薬剤濃度を限定出来る事、又拡散効果の欠除、薬剤濃度の定量が容易である事などがあげられ、又加熱により力価の変化する薬剤でも滅菌後に注加する事が出来、しかもこの培地を振盪する事により判定日数を短縮出来る点等推奨に値するものと考えられる。

著者は、以上の如くSM、PAS及びINAH加Tween-Albumin培地に於て、H₈₇Rv、夫々の単独耐性株H₂及び患者分離株5株を用いて振盪培養による耐性検査を行つた結果、従来の固形培地の成績とよく一致し、しかもより正確な成績が得られ、更にその判定は2日乃至3日後には可能であつたので、この方法は一般結核菌の迅速耐性検査法として使用可能であると考えらる。

結 語

人型結核菌感受性株H₈₇Rv、SM、PAS、INAH各単独耐性株H₂及び当科入院患者喀痰中より分離した患者分離株5株を用い、SM、PAS、INAHを0.5% Tween-Albumin培地に添加し、振盪培養によりその耐性度を測定し次の結果を得た。

1) 感受性株H₈₇RvでSM、PAS 1 τ 、INAH 0.1 τ 以上を加えた培地では菌の発育は抑制される。

2) 各単独耐性株 H_2 では SM, PAS, INAH を 0.1 (INAH のみ), 1, 10乃至100 (SM, PAS のみ) τ/cc 加えた各々の培地に於て何れも対照と同程度の菌の発育が認められた。

3) 患者分離株に於ては固形培地で検出した完全耐性度と一致した濃度の SM, PAS, INAH の各添加培地で菌の発育が見られ、それ以上の濃度の培地との間に発育の差が明らかで、従来の固形培地での成績と一致した結果であつた。

4) 感受性株 $H_{87}R_v$, 各単独耐性株 H_2 及び患者分離株 5 株の何れに於ても、菌の発育の見られる場合は 2 日乃至 3 日後から著明であつた。

稿を終るに臨み種々御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師戸塚忠政教授並びに教室の勝又昭司博士に深謝致します。

本論文の要旨は第24回日本内科学会信越地方会に於て報告した。

文 献

- ①Middlebrook, G. et al: Am. Rev. Tuberc., 70; 852, 1954 ②Cumming, M. M. and Hiving, D. G.: Am. Rev. Tuberc., 70; 637, 1954 ③Chaves, A. D. et al: Am. Rev. Tuberc., 72; 143, 1955 ④新津袈裟三: 日内誌, 43; 899, 1955 ⑤北本 治: 結核, 32 (増刊号), 51, 1957 ⑥奥真 一・西田哲郎: 日内誌, 46; 1460, 1957 ⑦酒井栄一: 結核, 34; 287, 1959 ⑧酒井栄一: 信州医誌, 8; 1006, 昭.34 ⑨中泉直正: 結進, 22; 94, 昭.33 ⑩藤村義男: 日結, 10; 97, 昭26 ⑪山本四郎: 日内誌, 42; 927, 1954 ⑫山本四郎: 名古屋医学, 98; 133, 昭.29 ⑬清水邦彦: 医療, 8; 739, 昭29 ⑭小川政敏: 日結, 12; 81, 昭.27 ⑮佐藤 裕: 日結, 13; 124, 昭.28 ⑯内田 誉・他: 最新医学, 9; 175, 昭.29 ⑰近藤 享・福生富三: 結核の臨床, 1; 61, 昭.28 ⑱小川辰次・長田 進: 日結, 13; 119, 昭.29 ⑲小川辰次・長田 進: 結核, 31; 302, 1956. ⑳河合 潔: 結核, 30; 621, 1955 ㉑馬場治賢・他: 最新医学, 9; 190, 昭29 ㉒矢込堅太郎・宮本 泰: 結核, 33; 760, 1958 ㉓高津良房・池田吉郎: 日結, 17; 143, 昭.33 ㉔宇野久彌太: 結核, 30 (増刊号), 99, 1955 ㉕秋葉朝一郎・高橋昭三: 日本細菌誌, 12; 567, 1957 ㉖荒井聖二: 信州医誌, 8; 1212, 昭.34 ㉗Dubos, R. J. et al: Am. Rev. Tuberc., 54: 204, 1946. ㉘Dubos, R. J. and Middlebrook, G: Am. Rev. Tuberc., 56; 334, 1947 ㉙Dubos, R. J.: J. Exper. Med., 97; 377, 1953 ㉚Halpern, B. and Kirchheimer, W. F.: Am. Rev. Tuberc., 70; 665, 1954 ㉛Volk, W. A. and Myrvik, Q. N.: J. Bact., 66; 386, 1953 ㉜Miller, I. L. and Roessler, W. G.: Am. Rev. Tuberc., 73; 716, 1956 ㉝青柳高明・水野伝一: 日本細菌誌, 11; 629, 1956 ㉞青柳高明・水野伝一: 日本細菌誌, 12; 819, 1957 ㉟川村 達・河合 道: 国立公衆衛生院研究報告, 5; 16, 昭.31 ㊱川村 達・河合 道: 日本細菌誌, 12; 561, 1957 ㊲奥 真一・勝又昭司: 日内誌, 46; 771, 1957 ㊳戸塚忠政・他: 日本医事新報, 1740; 42, 1957 ㊴戸塚忠政・荒井聖二・他: 日内誌, 47; 433, 1958 ㊵土屋院司: 日本細菌誌, 14; 24, 1959 ㊶Aoyagi, T. and Mizuno, D.: J. gen. Microbiol., 20; 173, 1959 ㊷青柳高明・水野伝一: 日本細菌誌, 12; 819, 1957 ㊸Aoyagi, T. and Mizuno, D.: J. gen. Microbiol., 20; 180, 1959 ㊹Treffers, H. P.: J. Bact., 72; 108, 1956 ㊺結核菌検査指針: 衛生検査指針, 細菌血清学的検査指針, 1953 ㊻柳沢 謙: 臨床病理, 4; 355, 昭31 ㊼占部 薫: 臨床病理, 2; 473, 昭29 ㊽小酒井望・他: 臨床病理, 4; 278, 昭31 ㊾今村邦雄: 結核, 33; 99, 1958 ㊿Fischer, M. W.: Am. Rev. Tuberc., 57; 58, 1948 ㉑山根 績: 抗研誌, 6; 75, 1950 ㉒小川政敏・他: 最新医学, 9; 148, 昭.29 ㉓土屋院司: 結核の臨床, 2; 278, 昭31 ㉔小川辰次: 結核菌検索の基礎と応用, 240, 昭.26