

## 感受性ディスク法の検討

—主として血液添加培地の立場から—

高谷川 弥人・本間 光夫

富岡 一・鳥銅 勝隆

慶応義塾大学医学部内科学教室（指導：三方一沢教授）

（昭和 39 年 5 月 28 日受付）

## I. 緒 論

感受性ディスク法は個々の菌株の感受性を比較的容易に、かつ短時に判定しうる有用な方法として、すでにわが国でも多くの基礎的研究<sup>1-6)</sup>をへて、臨床検査の分野に今日ひろく用いられている。しかしながら従来より容認されている血液添加培地<sup>2-4)</sup>の立場からは殆ど検討されておらず、ノボピオンで血液の影響を受けることが指摘されている<sup>2)</sup>程度にすぎない。これに加えて、その実施状況をみると必ずしも規定された方法によらず種々の変法が用いられている。

かかる現況に際し、溶連菌にテトラサイクリン耐性株の出現増加の傾向が近時、欧米をはじめ本邦<sup>8,9)</sup>においても注目されるに至っており、感受性試験の第一線の方法としての本法の意義はいよいよ高まりつつある。

そこで我々はテトラサイクリン、クロラムフェニコール（以下、TC、CP と略す）両薬剤ディスクを用いて血液添加培地でのディスク法に基礎的検討を加え、これに基づき TC、CP 両ディスクの示す阻止円の関係を究明して、本法実施上、判定上に留意すべき諸因子の解明をこころみてみた。

## II. 実験方法

## 1) 基本術式

実験にあたり基本とした術式は、溶連菌 3 株、緑連菌 2 株では菌液 0.5 ml に馬血液（採血後氷室保存 2~5 日以内）1.0 ml を加え、これに 42°C 程度の Heart-Infusion Agar（以下、H.I.A. と略す）（栄研製）を総量 20 ml になる様にシャーレ（直径 87 cm 前後）に加えて混釈培地を作製し、乾燥後、栄研、昭和の TC、CP 両ディスクを設置、設置後栄研ディスクでは直ちに、昭和ディスクでは 4 時間氷室放置後に 37°C、15~18 時間培養を行ない、その結果えられた菌発育、溶血両阻止円を 2 方向より測定し、その平均値を以て判定した。ぶどう球菌、並びに赤痢菌では 100 倍稀釈培養菌液 0.5 ml に H.I.A. を総量 20 cc になる様に加えた混釈培地と、培養菌液 1 滴を基礎培地に接種した表面塗抹法（ガラス玉法<sup>2,6)</sup>による）を併用した。なお実験毎に必ず同

一 Lot の菌液、培地、血液、並びにディスクを使用し、培地の作製は迅速に行なう等、実験条件の統一を常にこころがけた。

## 2) 菌液の作製方法

溶、緑連菌の場合は TODD-HEWITT 培地（以下、T.H. と略す）（Difco 製）、ぶどう球菌、赤痢菌では Heart-Infusion Broth（以下、H.I.B. と略す）（Difco 製）を用いて 37°C、18 時間培養し、これを培養菌液原液とした。10 倍、100 倍、1,000 倍の稀釈菌液作製は前群では T.H. 培地、後群では H.I.B. を用いた。

## 3) 生菌数の算定方法

生菌数は溶、緑連菌では T.H. 培地、ぶどう球菌、赤痢菌では H.I.B. を用いて、10 倍稀釈法により実験毎に各培養液について算定した。

## 4) 最小発育阻止濃度の測定方法

実験に使用した菌株の最小発育阻止濃度は溶、緑連菌では 5% 馬血液添加 H.I.A.、ぶどう球菌、赤痢菌では H.I.A. を用いて、100 mcg/ml より上の倍数稀釈平板法で行ない、発育阻止をみた最小稀釈濃度を以てその値とした。なお、基礎的検討に主として用いた菌株、その種類、その由来、並びに最小発育阻止濃度は表 1 の如くである。

## III. 成 績

## A) 基礎的検討

## 1) 接種菌液についての検討

表 1 使用菌株ならびにその最小発育阻止濃度

菌種	菌 株 名	由 来	最小発育阻止濃度 (寒天平板倍数稀釈法)		
			TC (mcg/ml)	CP (mcg/ml)	PC-G (u/ml)
溶連菌	石川 株	猩紅熱	0.39	1.56	0.024
	大屋 株	"	"	"	"
	松永 株	"	"	"	"
緑連菌	広野 株	SBE*	1.56	6.25	3.12
	鎌田 株	"	"	12.50	6.25

\* 亜急性細菌性心内膜炎

表2A 稀釈の影響 (溶連菌)

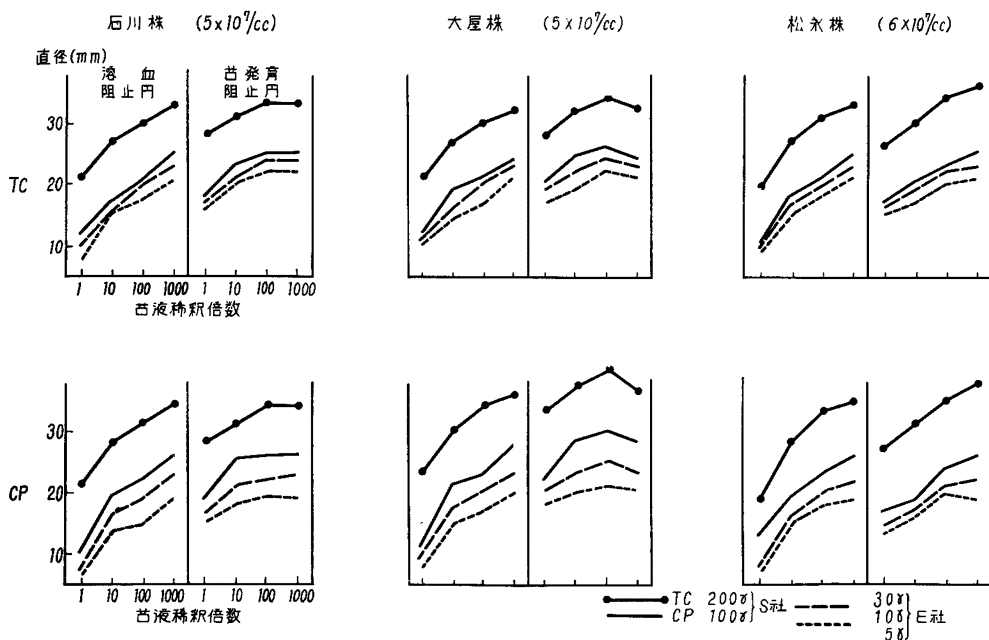
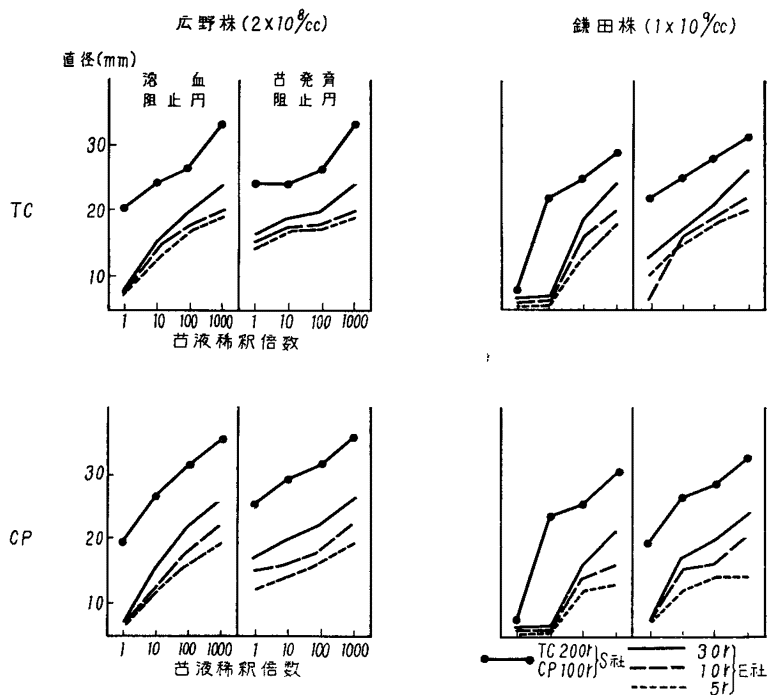


表2B 稀釈の影響 (緑連菌)



## 1) 菌液量の影響

接種菌量がディスク成績に影響をもたらすことは、既に明らかにされているところであるが<sup>1-5)</sup>、血液添加培地での様相を明らかにする目的で、溶、緑連菌を用いて検討してみた。その結果は表2A, Bに示す如く、1,000

倍稀釈菌液群での菌発育、溶血兩阻止円の境界は屢々不鮮明であつたが、接種菌液の稀釈倍数が10倍、100倍、1,000倍と高まるにつれ、兩阻止円とも増大し、接種菌量の影響が明らかに認められた。就中、溶血阻止円ではその傾向が顕著で、高濃度菌液 ( $5 \times 10^7/\text{ml}$  程度以上)。

表3A 菌発育阻止円と溶血阻止円との関係

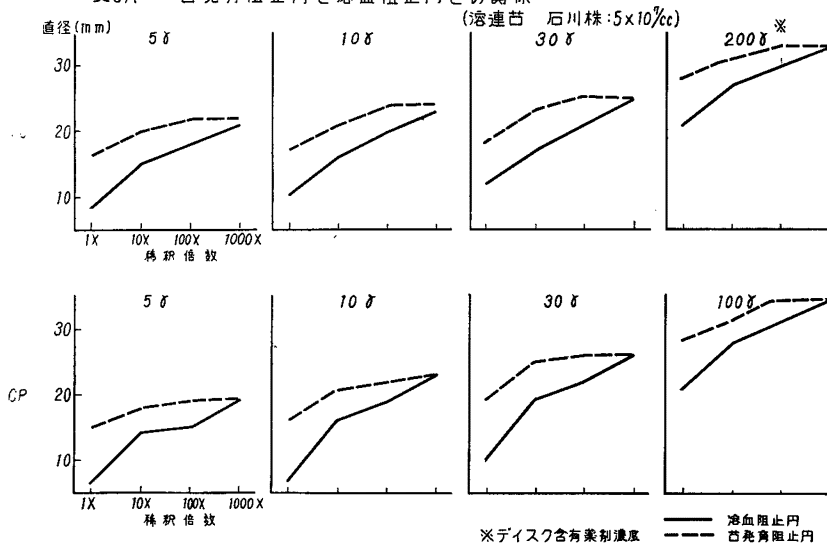
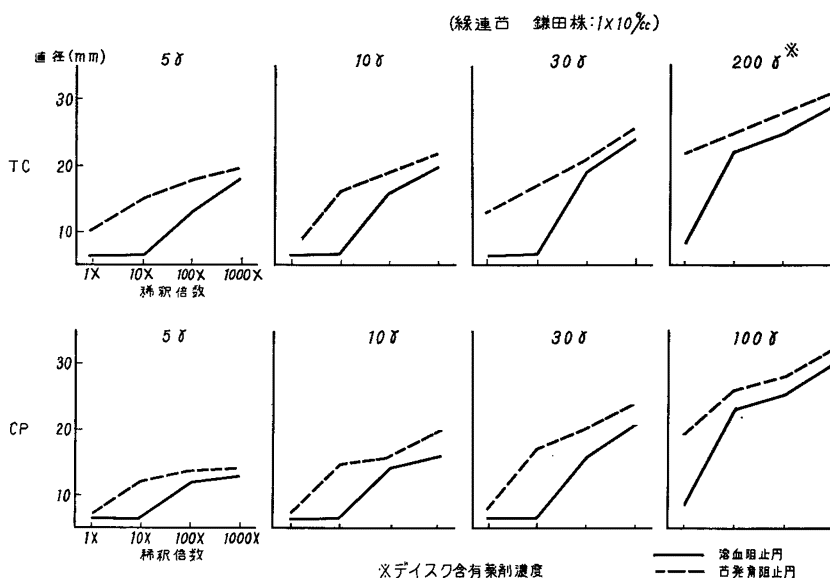


表3B 菌発育阻止円と溶血阻止円との関係



を接種した際には溶血阻止円を認めない場合をみることもあつて、菌発育阻止円との間に大きな差異がみられた(表3A, B参照)。然しながら100倍あるいは1,000倍稀釈菌液では大凡両阻止円が一致した。この様な事実は、一面両阻止円が平行関係にないことを如実に示しており(表3A, B参照)、従来とかく注視され勝ちな溶血阻止円に対し認識を改むる必要のあることを示唆している。なおこの菌液量の菌発育阻止円に及ぼす影響は表面塗拭法、混釈法で検討したばどう球菌、赤痢菌等の他の菌種術式によつても同様に認められている。

## 2) 培養菌液遠沈上清の溶血能の有無

前述の如く、接種菌液によつては溶血阻止円の出現が著るしく阻害されたので、この点を究明する目的から、先づ溶、緑連菌のT.H.培地による培養菌液遠沈上清の溶血能の有無を検討してみた。その実験方法は表4にも示す如くT.H.培地培養菌液の3,000回転、20分遠沈上清を分離し、その0.1~0.5mlにASLO用Bufferを総量0.5mlになる様に加えた稀釈上清液を各検体毎に2列作成し、稀釈列別に5%馬、或いは兎洗滌血球液(ASLO用Buffer使用)0.5ccを加え、直ちに37°C

表 4 培養菌遠沈上清の溶血能の検討 (TODD-HEWITT Broth)

Exp. 1		Exp. 2				
菌株	術式上清 血液の種類 Buffer	0.5	0.4	0.3	0.4	0.1
		0	0.1	0.2	0.1	0.4
		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
溶連菌	石川株	馬	—	—	—	—
	大屋株	馬	—	—	—	—
	松永株	馬	—	—	—	—
緑連菌	広野株	馬	—	—	—	—
	鎌田株	馬	—	—	—	—
	馬	—	—	—	—	—

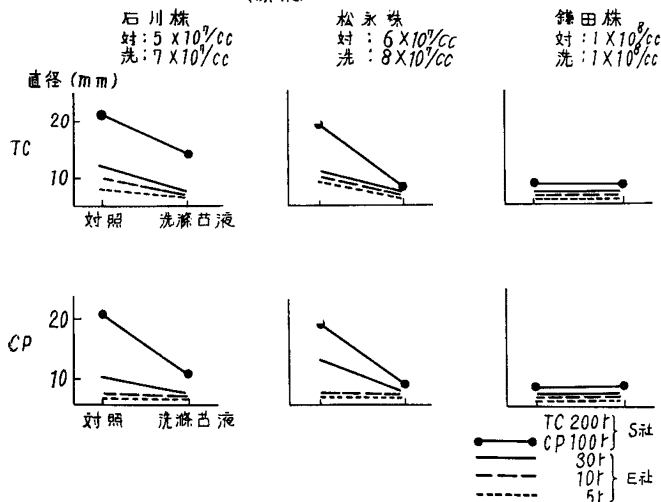
(37°C 1 時間後判定)

で1時間反応させて溶血の有無を判定した。その結果、溶、緑連菌のいずれの遠沈上清中にも溶血能の存在を認めえなかつた。ただし本検体を RANTZ らの SLO 力価測定法<sup>7)</sup>に準拠した方法、即ち ASLO 標準血清を加えずに、L-Cystein で還元して行なつた実験では、いずれの溶連菌での遠沈上清中にも溶血能の存在を認めることが出来た (表 4 参照)。

### 3) 洗滌菌液での検討

前項に引きつづき阻止円に影響する菌液中の因子を究明する目的から、培養菌液を 3,000 回転、20 分、3 回 T.H. 培地で洗滌してえた菌体を、T.H. 培地で原量に

表 5 洗滌菌液での成績 (原液)



菌株	術式上清 血液の種類 Buffer	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05
		0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
		0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
溶連菌	石川株	馬	卅	卅	+	±	—
	大屋株	馬	卅	卅	卅	±	—
	松永株	馬	卅	卅	卅	卅	±
緑連菌	広野株	馬	—	—	—	—	—
	鎌田株	馬	—	—	—	—	—
	馬	—	—	—	—	—	—

室温 15 分間反応後血球を加え 37°C 45 分後に判定、血球液は 5%, Buffer は ASLO 用

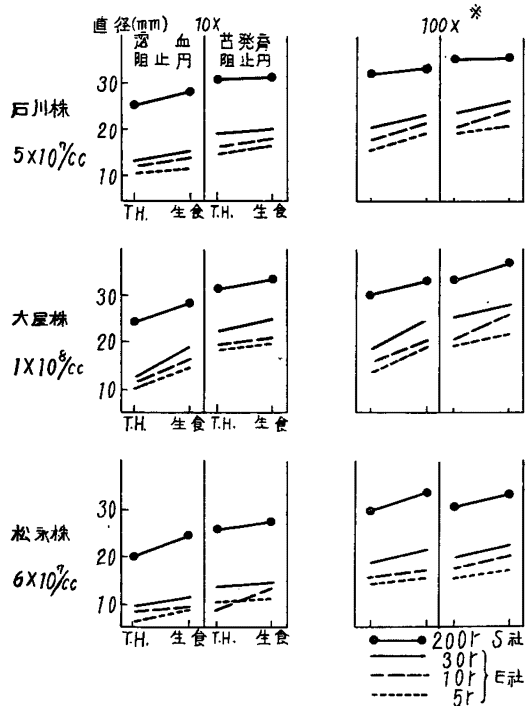
復し、かかる洗滌菌液での菌発育、溶血阻止円との関係を出発材料を対照として比較検討してみた。その結果は表 5 に示すごとく、かかる培養菌液遠沈上清の影響を無視できる条件下でも洗滌菌液が高濃度の際には溶血阻止円の出現が著しく阻害された。この成績は前項の成績とともに生菌量のみが阻止円に関係することを自ずから明らかにしている。

### 4) 稀釈液の影響

我々は今回の実験に際し、上述の如く菌液の稀釈をすべて溶、緑連菌では T.H. 培地、ぶどう球菌、赤痢菌では H.I.B. を使用したが、一般には菌液の稀釈、並びに菌浮遊液の作製には屢々生理的食塩水 (以下、生食と略す) が用いられている。そこで溶、緑連菌を用いて生食稀釈の影響をディスク成績並びに生菌数の 2 面から検討してみた。その結果、表 6 A, B に示す如く、緑連菌では T.H. 培地稀釈群と生後稀釈群との間に差異を認められなかつたが、溶連菌では生食稀釈群に菌発育、溶血阻止円のやや増大をみとめた。

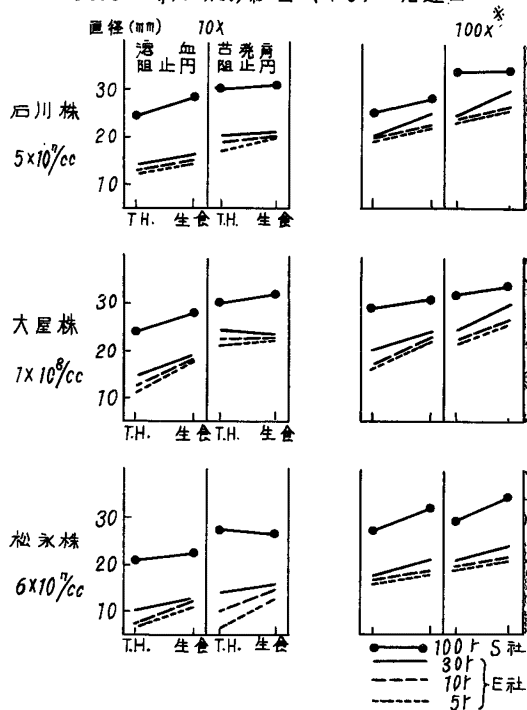
そこで、生食稀釈の生菌数への影響を 1/10 N 稀釈液中における生菌数からみると、表 7 の如く、T.H. 培地稀釈群では稀釈直後群と室温 (冬期)、氷室 3 時間放置群との間に殆んど生菌数の変動をみながつたのに反し、生食稀釈群では稀釈直後群ですでに生菌数の減少が認められ、3 時間

表6A 稀釈液の影響 (TC) 遠達苗



※接種苗液の稀釈倍率

表6B 稀釈液の影響 (TC) 溶連苗



※接種苗液の稀釈倍率

表7 稀釈液の生苗数に及ぼす影響 (溶連苗)

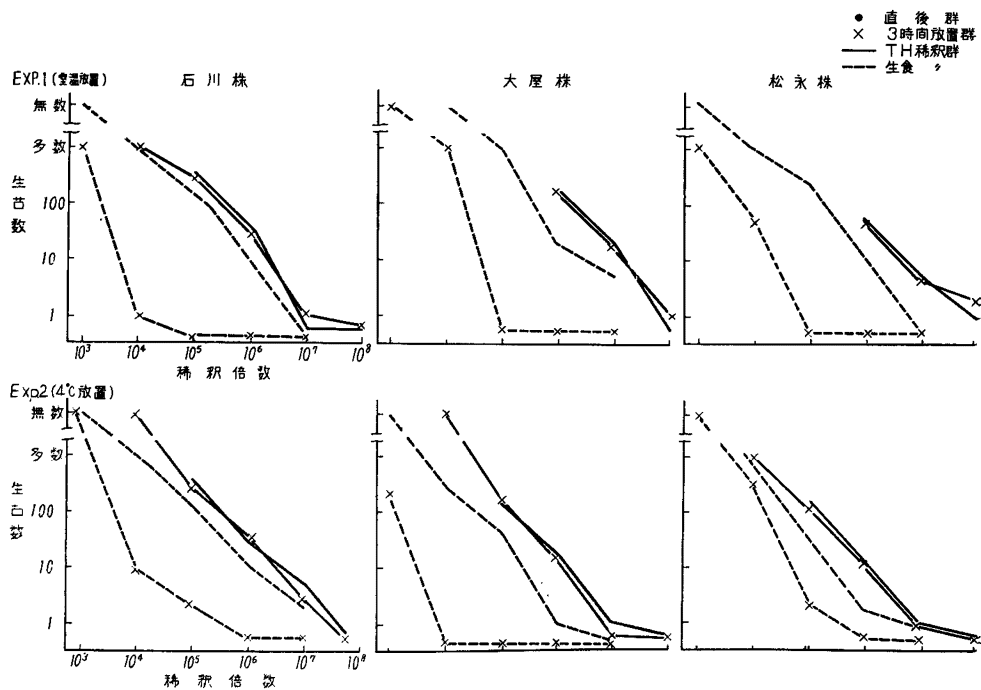


表8A 血液量の影響 (TC, 洛連古)

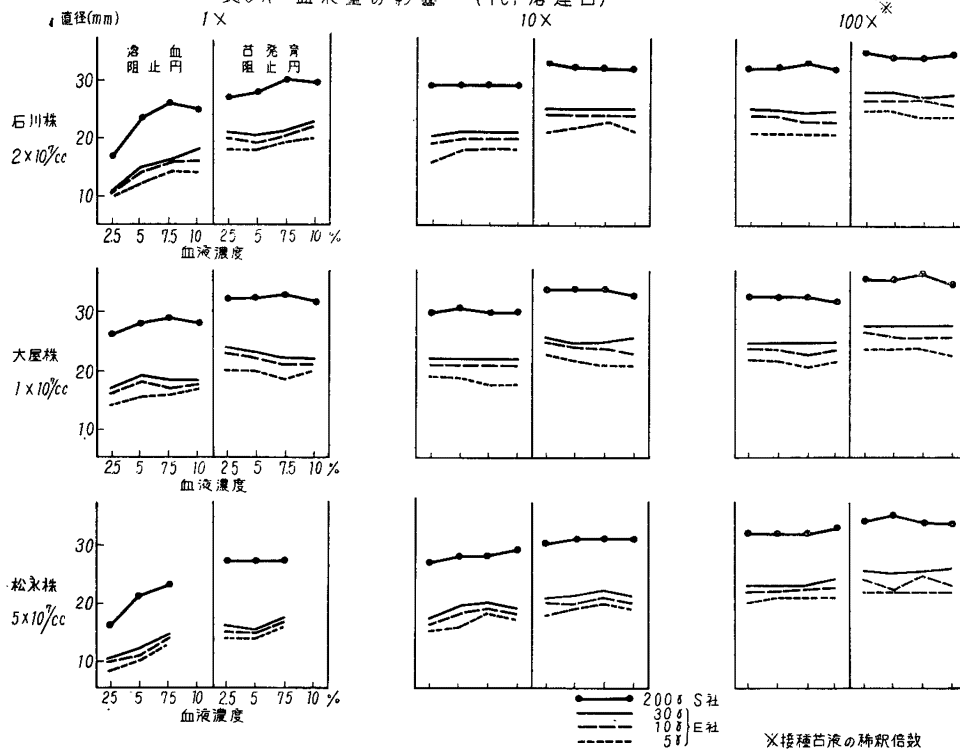


表8B 血液量の影響 (CP, 洛連古)

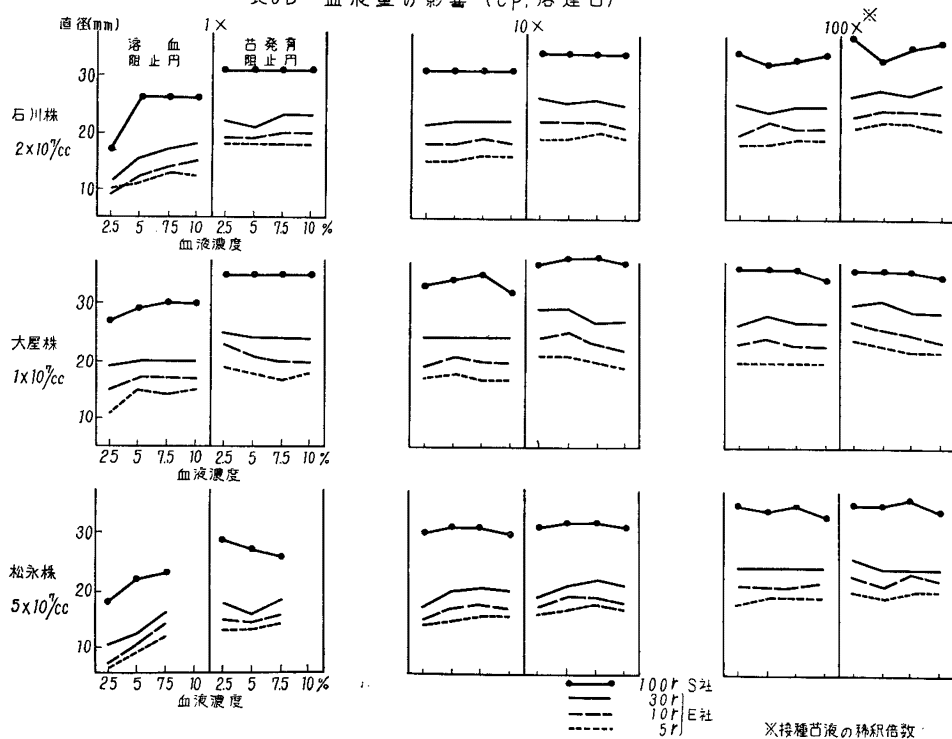


表8C 血液量の影響 (TC, 緑連苔)

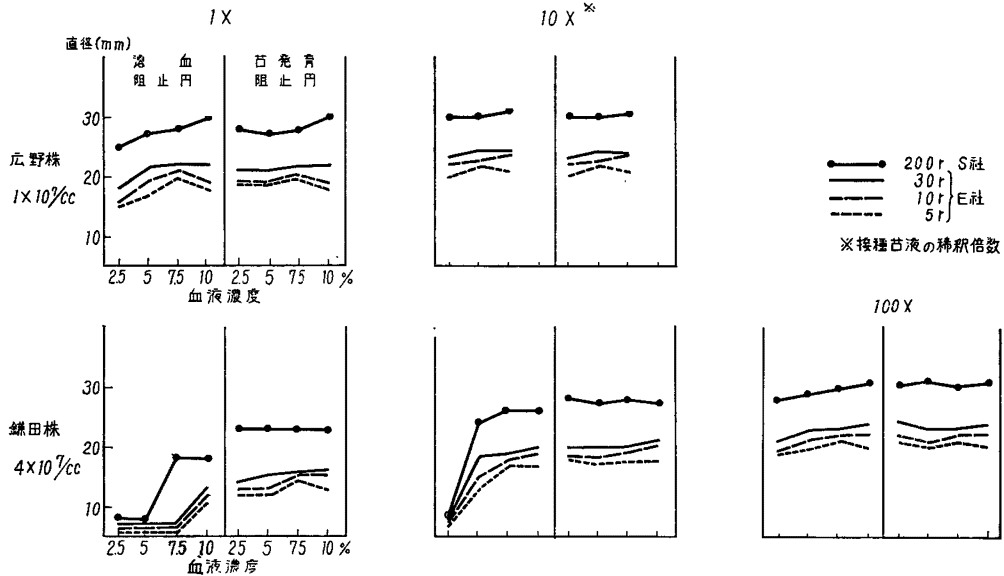
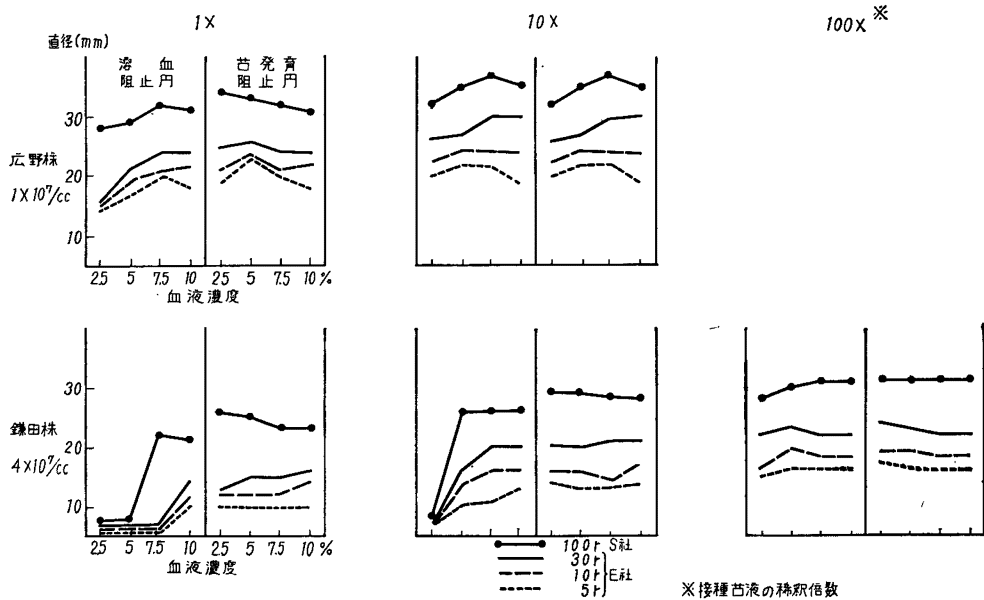


表8D 血液量の影響 (CP, 緑連苔)



後には室温、氷室放置のいずれの群にあつても  $10^3 \sim 10^5$  稀釈部位で極めて顕著に菌数の減少を認めた。この成績は生食稀釈が溶連菌にあつては大きく影響することを示すとともに、上記の実験成績をうらずけたといえる。従つて菌種によつては生食での稀釈、菌浮遊液の作製は嚴重に慎しむべきであると考えられた。

## 2) 添加血液についての検討

### 1) 血液量の影響

添加血液のディスク成績に及ぼす影響を、まず血液量の面から検討してみた。即ち馬血液を培地に 2.5%, 5%, 7.5%, 10% の割合に加え、これらの各種血液濃度培地での阻止円を混釈菌液別に比較検討した。

その結果、溶、緑連菌群とも表 8 A, B, C, D に示す如く、 $2 \sim 5 \times 10^7$ /ml 程度の培養菌液原液を用いた実

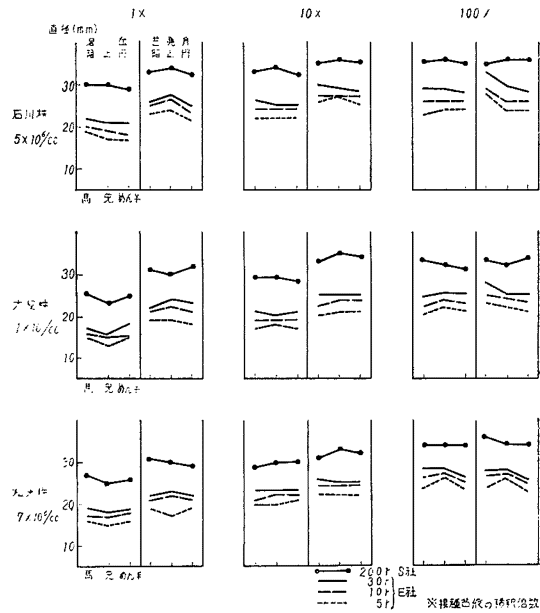
表9A 血液の種類の影響  
(Tc, 溶連菌)

表9B 血液の種類の影響 (CP, 溶連菌)

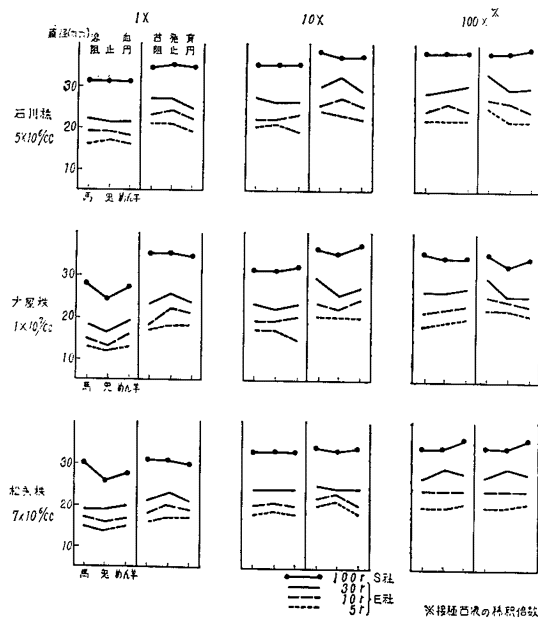




表9C 血液の種類の影響  
(T.C. 緑連菌)

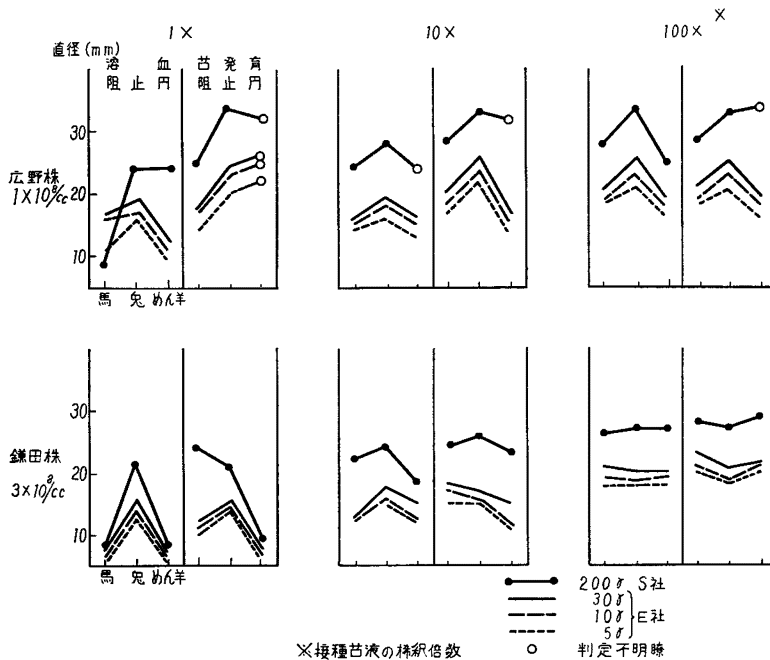
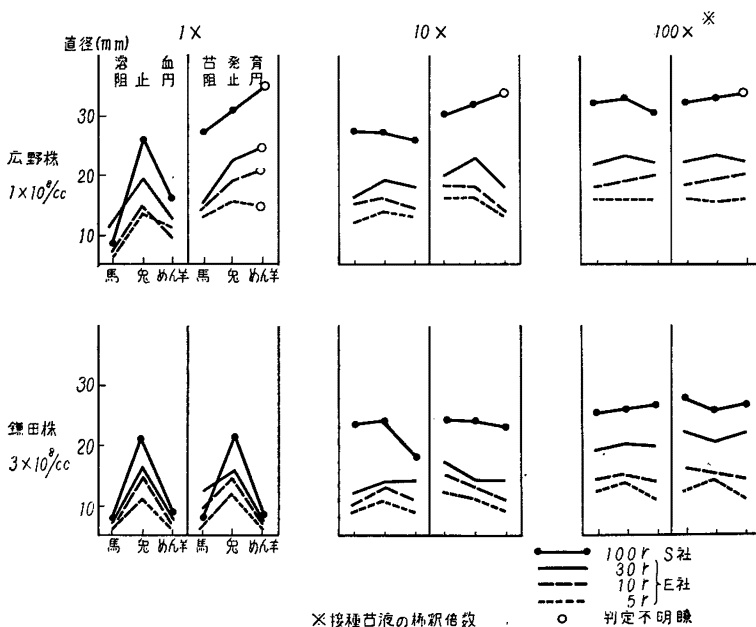


表9D 血液の種類の影響  
(C.P. 緑連菌)



験では菌発育阻止円は血液濃度によつて変動しなかつたが、溶血阻止円は2.5%血液添加培地で明らかに縮小した。しかしながら10倍、100倍稀釈菌液を用いた成績からは、かかる現象を認めなかつた。従つて高濃度菌液という条件においてのみ添加血液量が溶血阻止円に影響することを知り、血液添加培地作製にあつては添加血液量にも考慮を払うべきであるように思われた。

## 2) 血液新鮮度の影響

血液量の問題にひきつづき添加血液の新鮮度のディスク成績に及ぼす影響の有無を溶連菌を用いて、採血後氷室保存(4°C)3日目と11日目、3日目と17日目の馬血液でそれぞれ比較検討してみた。その結果いずれの実験成績からも阻止円に新鮮度が影響する傾向は認められず、氷室保存10日間程度以内なら血液の新鮮度によつてディスク成績が左右されることはないように思われた。

## 3) 血液種類の影響

ついで馬、兎、緬羊血液を添加血液に用いて、血液の種類がディスク成績に及ぼす影響を溶、緑連菌で観察してみた。その結果、兎血液を用いた際に馬、緬羊血液の場合に比し、溶血阻止円が溶連菌群では高濃度菌液群でやや縮小し、緑連菌群では増大する傾向を認め、血液の種類によつて溶血阻止円が影響を受けることが示された(表9A, B, C, D参照)。

## 4) ディスク設置後の氷室放置時間の影響

ディスク設置後、氷室に放置してから培養した場合、阻止円が増大することは既に指摘されている<sup>1-4)</sup>ところで、昭和ディスクでは設置後4時間氷室に保存するよう定められている。われわれは、この点について溶、緑連菌を用い

表10A 氷室保存時間の影響(TCP)溶連苜

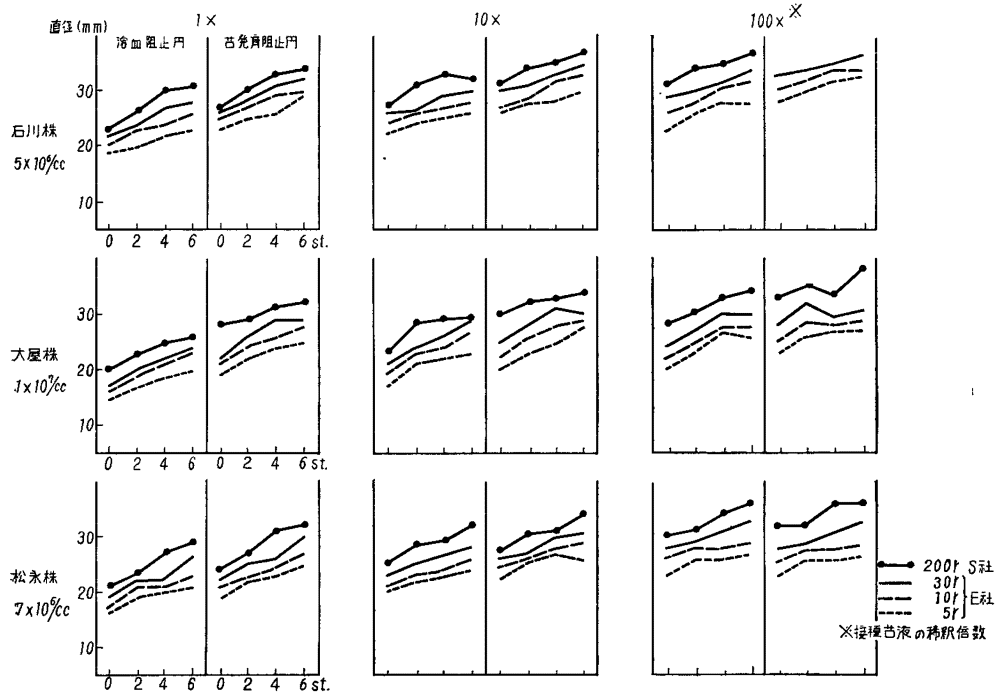


表10B 氷室保存時間の影響(Cp) 溶連苜

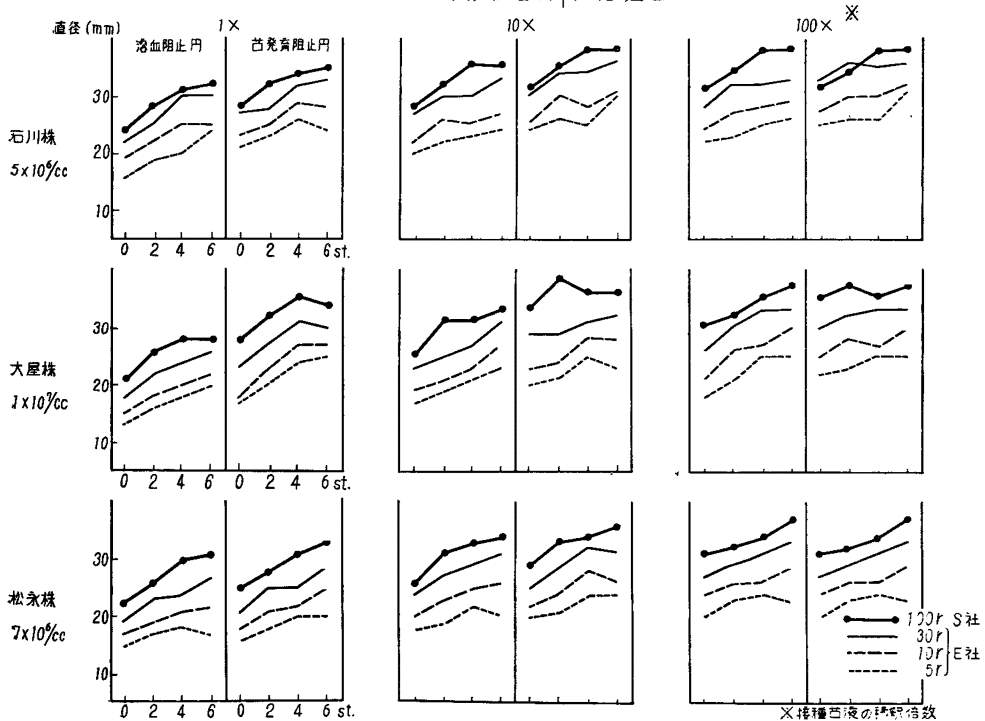


表10C 氷室保存時間の影響 (TC) 緑連苔

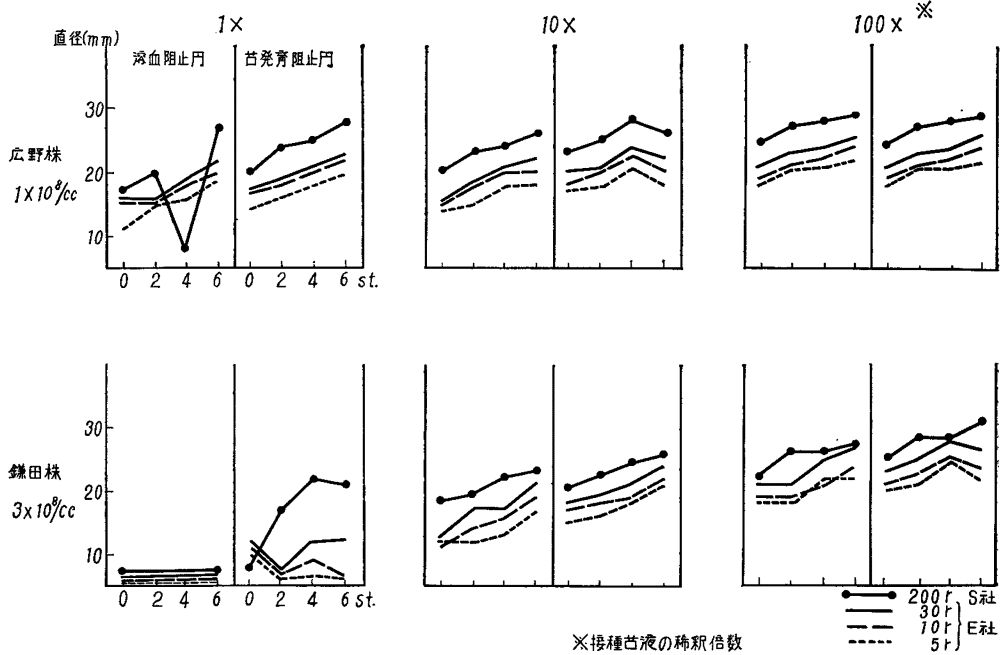
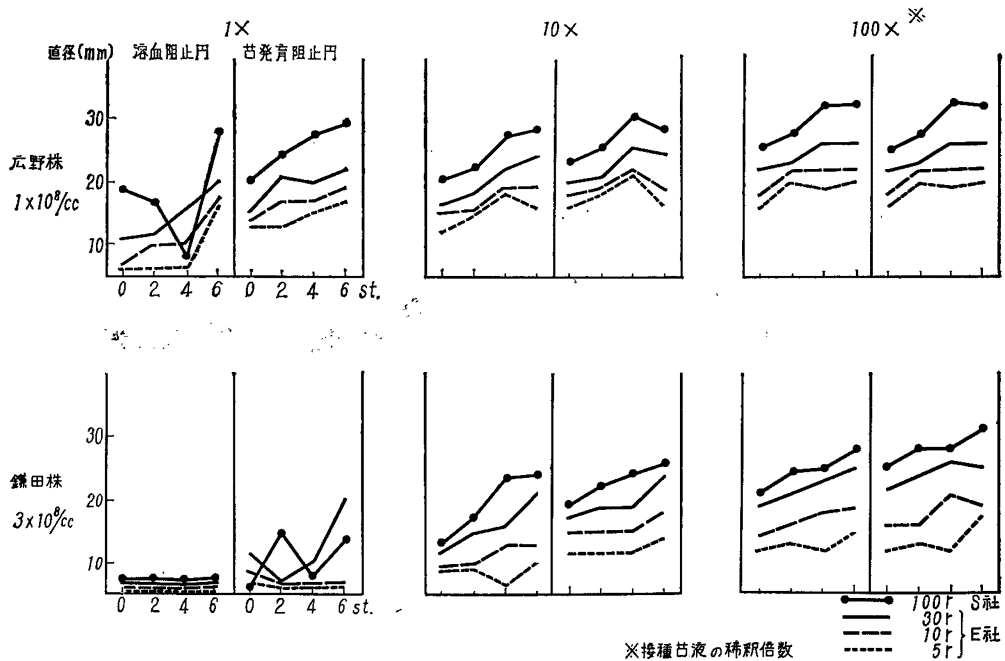
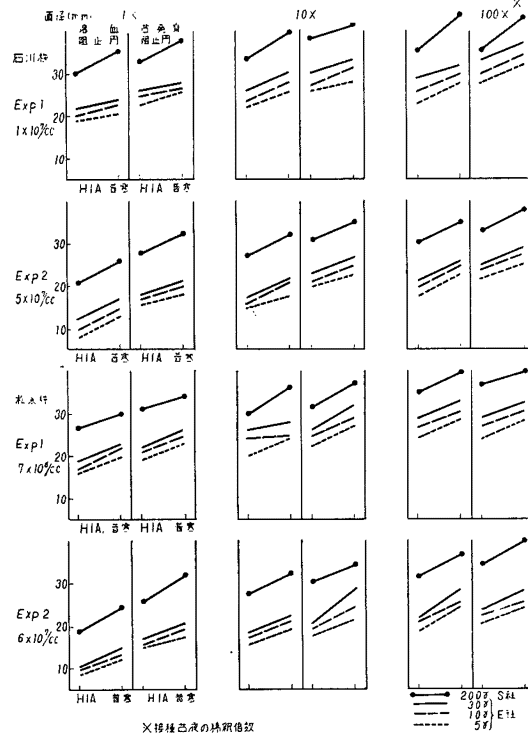


表10D 氷室保存時間の影響 (CP) 緑連苔



表IIA 培地の影響(TC) 溶連菌



表IIB 培地の影響(CP) 溶連菌

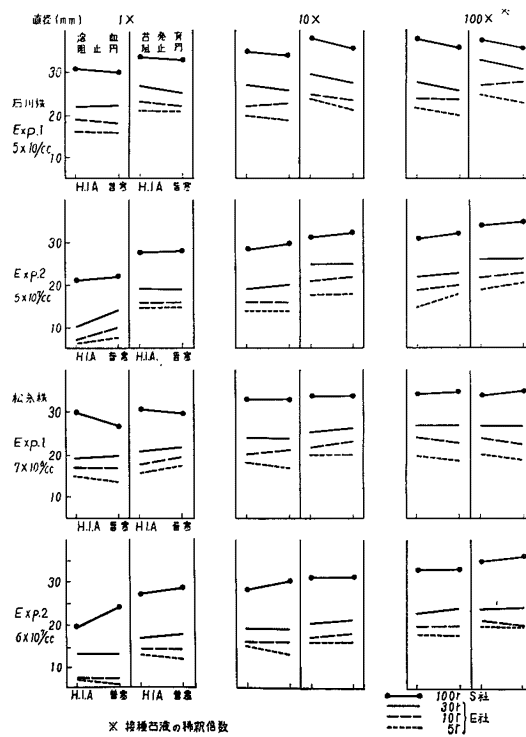


表11C 培地の影響(TC) 緑連苗

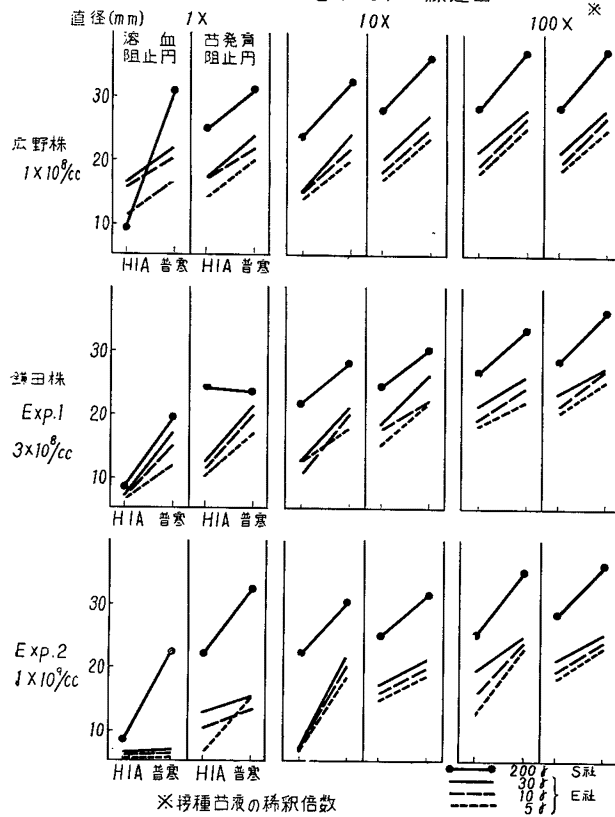


表11D 培地の影響(CP) 緑連苗

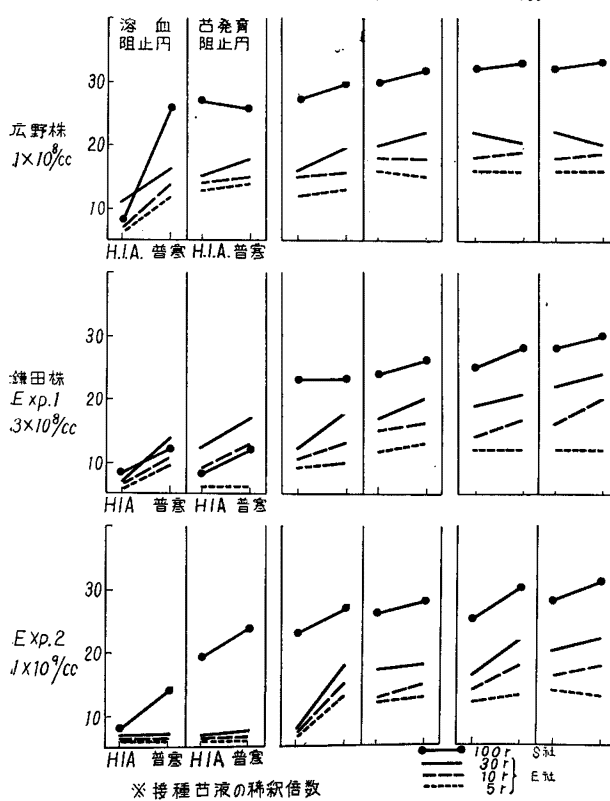
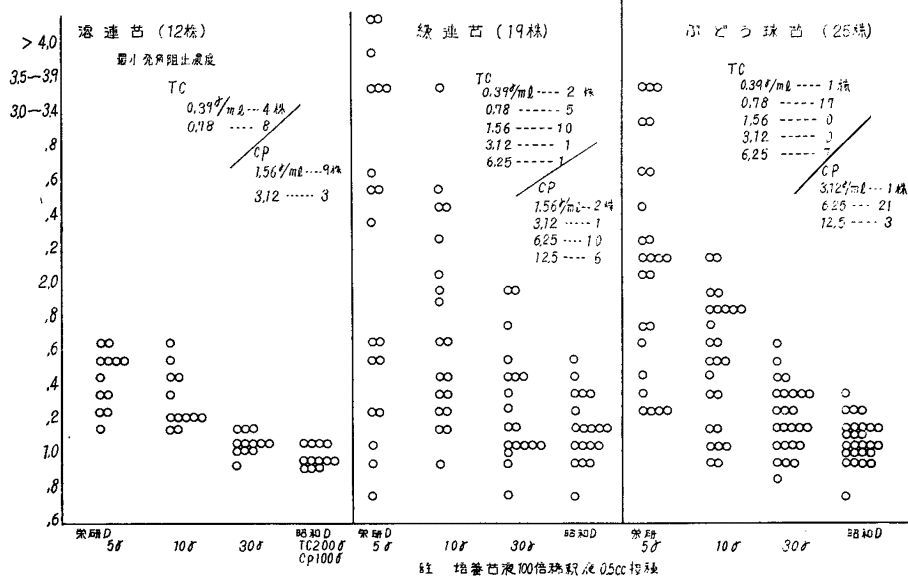


表 12 TC, CP ディスクの菌発育阻止円の面積比 (TC/cp)



て血液添加培地の立場から検討してみた。すなわちディスク設置後直ちに培養を始めた群と、2時間、4時間、6時間氷室放置群の4群について菌発育、溶血両阻止円の動態を観察した。その結果、栄研、昭和のいずれのディスクの場合も氷室保存時間の長い程、両阻止円が増大する傾向が接種菌量に関係なく明らかに認められて、この点に関する従来よりの規定は厳重に守られるべきであることを再確認した(表 10 A, B, C, D 参照)。

#### 5) 基礎培地の影響

基礎的検討の最後にディスクによつては種々の基礎培地(H.I.A., 普通寒天, ミュラーヒントン, 感性ディスク用培地等)の使用が許されているので溶連菌3株, 緑連菌2株, ぶどう球菌6株, 赤痢菌1株(表 1, 13 参照)でH.I.A.と普通寒天(栄研製)を基礎培地にした際の阻止円の関係を検討してみた。その結果CPディスクでは菌発育、溶血両阻止円とも、緑連菌の場合に普通寒天においてH.I.A.に比し若干増大するようであつたが、溶連菌で略々一致していた。しかるにTCディスクにあつては溶、緑連菌のいずれの被検菌種によつても普通寒天を用いた培地上での両阻止円は、H.I.A.を使用している場合にくらべて各接種菌液濃度群とも著しく増大し(表 11 A, B, C, D 参照), TCディスクでの阻止円が基礎培地によつて極めて大きな影響を受けることが明らかにされた。この傾向はぶどう球菌, 赤痢菌でも同様にみとめられ、ディスク法実施にあたり基礎培地の選択に充分留意する必要があることを強く示唆している。

#### B) TC, CP ディスクの阻止円と稀釈法による感受性

#### との関係

1) 溶連菌, 緑連菌, ぶどう球菌での TC, CP 両ディスクの菌発育阻止円の面積比に関する検討

溶連菌 12 株, 緑連菌 19 株, ぶどう球菌 25 株について TC, CP のディスク間における阻止円の面積比(TCでの阻止円直径<sup>2</sup>/CPでの阻止円直径<sup>2</sup>)を各種濃度ディスク毎に培養菌液の100倍稀釈液を用いて、H.I.A.を基礎培地として検討した。その結果をまず栄研ディスクからみると表 12 に示すごとく、CP ディスクに対するTC ディスクの面積比は5mcg ディスクでは溶連菌群で1.2~1.6, 緑連菌群, ぶどう球菌群で1.0~3.0程度であつた。然し10mcg ディスクでは前者で1.1~1.6, 後者で1.0~2.0程度, 30mcg ディスクでは前者で1.0~1.1, 後者で0.9~1.5程度であつた。一方、昭和ディスクではTC ディスク(200mcg 含有)がCP ディスク(100mcg 含有)の2倍の含有濃度を有しているにも拘らず、その比は前者で0.9~1.0, 後者で0.9~1.3程度で栄研ディスクでの成績と併せ考えるとディスクの薬剤含有濃度の高まる程、面積比が減少する傾向が明らかに認められた。これに加えて、これら被検菌株のTCに対する感受性(寒天平板稀釈法による)がCPの溶連菌では2~4倍, 緑連菌, ぶどう球菌で4~8倍(表 12 参照)であつたことよりみて感受性に比してTCディスクの阻止円発現がCPにかなり劣る印象をうけ、高濃度の場合ほどその傾向が増強して認められることを知つた。

2) TC, CP に同一感受性を有する菌株による TC, CP ディスクが示す阻止円の面積比についての検討

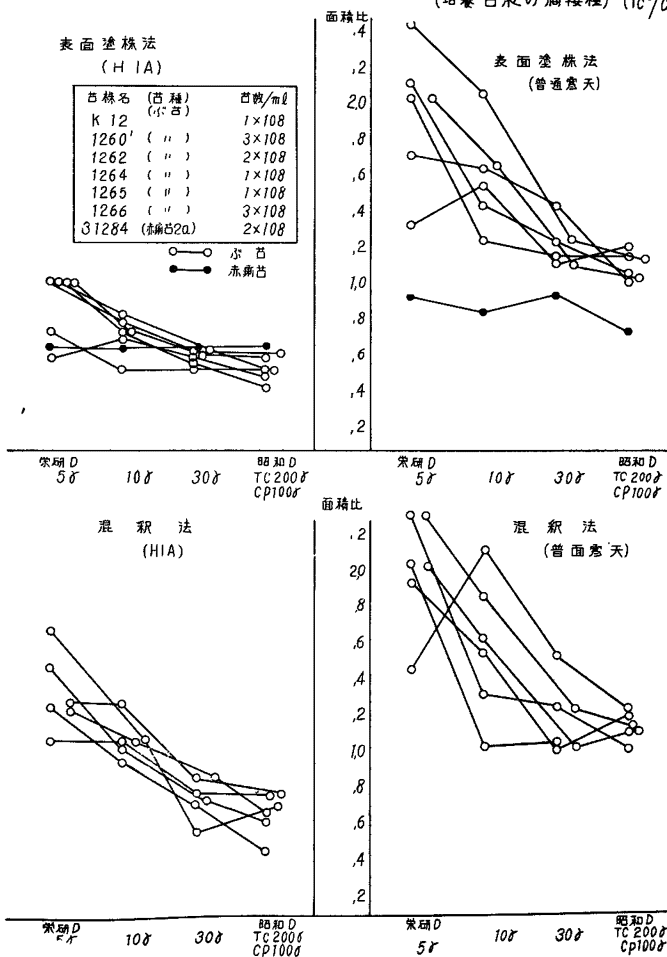
先の実験で感受性に比して TC ディスクによる阻止円発現が CP に比し劣る印象をうけたが、この点を追求する目的から、2 回にわたる 100 mcg/ml よりの寒天平板

表 13 被検菌の菌型並びに最小発育阻止濃度

菌種	菌株名	菌型	最小発育阻止濃度			
			寒天平板稀釈法		液体稀釈法	
			TC mcg/ml	CP mcg/ml	TC mcg/ml	CP mcg/ml
ぶどう球菌	1260	—	6.25	6.25	3.12	12.5
	1262	—	6.25	6.25	3.12	12.5
	1264	29/52/80*	6.25	6.25	6.25	12.5
	1265	29/52/80*	6.25	6.25	3.12	12.5
	1266	29/52 A/ 52/80*	6.25	6.25	6.25	12.5
	K 12	80*	6.25	6.25		
赤痢菌		<i>Sh. flex.</i> 2 a			0.78	0.78

\* ファージ型別

表 14 TC, CP に同一感受性の菌株におけるディスク発育阻止円の面積比  
(培養基液の滴接種) ( $TC/CP^2$ )



倍数稀釈法によつて TC, CP に最小発育阻止濃度がともに 6.25 mcg/ml であることを確認したぶどう球菌 6 株と、100 mcg/ml よりの液体倍数稀釈法で 0.78 mcg/ml であつた赤痢菌 1 株 (表 13 参照) を被検菌として栄研, 昭和の TC, CP ディスクが示す阻止円の面積比を培養菌液 1 滴を加えた表面塗抹法と混釈法で検討してみた。その結果を先づ基礎培地に H.I.A. を用いた場合についてみると表 14 に示す如くで、両薬剤の 5 mcg ディスクが示す阻止円の面積比 (TC での阻止円直径<sup>2</sup>/CP での阻止円直径<sup>2</sup>) は混釈法では 1.0~1.6 程度、表面塗抹法では 0.6~1.0 であつた。然しながら 10 mcg, 30 mcg とディスク薬剤含有濃度が増大するにつれて、いづれの術式によつてもその面積比は減少し、30 mcg ディスクでは両術式とも 0.6 前後、TC が 200 mcg, CP が 100 mcg 含有する昭和ディスクでは 0.5 前後を示すにすぎなかつた。この成績は前項でうかがわれた TC ディスクの阻止円発現が CP に比し著しく劣る傾向を端的

に示している。なお本実験に用いたぶどう球菌 6 株中 5 株の液体倍数稀釈法 (H.I.B.) の最小発育阻止濃度は表 13 の如くで CP にはいずれも 12.5 mcg/ml, TC には 3 株が 3.12 mcg/ml, 2 株で 6.25 mcg/ml で、この見地よりみれば更に TC ディスクによる阻止円発現は CP に劣るといえよう。

然しながら、ひるがえつて基礎培地を H.I.A. より普通寒天 (栄研製) にかえて検討してみると表 14 の如くで混釈法、表面塗抹法のいずれによつても栄研の各種濃度、並びに昭和の TC ディスクが示す阻止円は CP を上廻り、H.I.A. での概念は普通寒天ではあてはまらないようであつた。ただしディスクの薬剤含有濃度増加に伴う面積比 (TC/CP) の減少は普通寒天の場合にも同様に明らかに認められた (表 14 参照)。

#### IV. 考 按

A 群溶連菌での TC 耐性株が昭和 37 年度よりわが国でも出現<sup>9)</sup>、その後増加の傾向がみとめられている<sup>9)</sup>。このことはリウマチ熱、急性腎炎との関係もあつて極めて憂慮すべき事態と考えられ、治療の実際にあたる我々にとってはその感受性を速やかに知る必要性が高められた。したがつて血液添加培地での感受性ディスク法は一層その価値を増したといえる。しかし従来かか

る培地、菌種に基づいてのディスク法は殆ど検討されていない。そこで我々は使用書に準拠した術式の範囲内で混釈法により種々の基礎的検討を行ない、これに基づき TC, CP ディスクの示す阻止円関係に解析を試みてみた。

先ずディスク法では接種菌量の問題が既に多くの学者によつて指摘されているので<sup>1-5)</sup>、接種菌液量からまず基礎的検討を始めてみた。その結果、培養菌液の稀釈倍数の高い程、菌発育、溶血両阻止円が増大し、菌液量が両阻止円に大きな影響をもたらすことが明らかにされた。このことは他方接種菌量の一定化を計らない以上本法に定量的意義を求むることにはかなりの問題があることを指摘していよう。更に菌発育と溶血両阻止円との関係についてみると 100 倍あるいは 1,000 倍 T. H. 培地稀釈菌液 0.5 cc を混釈の際に加えた培地においては菌発育、溶血両阻止円は一般に略々一致した。しかるに高濃度の培養菌液 ( $5 \times 10^7$ /ml 程度以上) 0.5 cc を加えた培地上には菌発育阻止円にみられる縮小を遙かに上廻る溶血阻止円の縮小、時にはその存在を認めえない事態さえ生じることが明らかにされた。このことは菌発育、溶血両阻止円が平行関係にないこと、高濃度菌液を用いた際には判定上にときに誤解と困難を生じることを示し、血液添加培地での溶血阻止円に対する認識に誤りのないよう強く示唆している。

ここにおいて、かかる菌発育、溶血両阻止円の関係をひきおこす要因を解明する目的から、培養菌液を菌体成分とそれ以外の成分、即ち培養菌液遠沈上清とに分離してそれぞれの溶血との関係を追求してみた。その結果、培養菌液遠沈上清は溶血阻止円に関係しないことが明らかにされ、接種生菌量のみが溶血阻止円の消長に関係していると解される成績をえた。従つて先述の菌液量が阻止円に及ぼした影響は、菌発育阻止円はもとより、溶血阻止円にも生菌数のみが関与することが明らかにされるとともに、菌発育、溶血両阻止円の平行関係は最早望みえないと考えられた。

次いで我々は菌液の稀釈や菌浮遊液の作製に一般に用いられている生食の影響を検討したところ、生食稀釈が生菌数に著しく影響した溶連菌群では菌液の生食稀釈により両阻止円の増大を認めた。然し生菌数に著明な影響をみなかつた緑連菌では両阻止円に変化を認めなかつた。この成績は先述の生菌量とディスク成績との関係を思えば自ずからその説明が求められ、且つ菌種の如何によつては生食での稀釈、菌浮遊液の作製に慎重を促すものと解された。

以上は菌液量の問題についてであるが、次いで未だ報告の少ない添加血液の問題にふれてみた。その結果、血液量、血液の種類が溶血阻止円に影響のあることが明ら

かにされた。即ち溶、緑連菌のいずれの菌種によつても高濃度の培養菌液を添加した際、低血液量群 (2.5% 添加) での溶血阻止円が 5% 以上添加群にくらべて著しく劣つていた。一方、血液の種類の影響を、従来より馬血液添加培地では混釈法の場合馬血液中に Antistreptolysin O が存在するため溶血現象に影響をうけることが指摘されているので、馬、兎、緬羊の 3 種の血液を用いて観察してみた。その結果、兎血液添加培地では馬、緬羊群に比し、溶連菌の場合には縮小して前述の Antistreptolysin O の問題に基づく影響を思わせ、緑連菌では溶血阻止円では逆に増大した。これら添加血液における諸因子の関与は、ともに先に判定上認識を改めるべきであるとした溶血阻止円に対してであるが、一応かかる点を考慮して血液の添加量のみならず種類も一定化しておくべきであろうと思われた。

なお、血液の新鮮度の影響についても検討したが、今回の検討範囲内 (11, 17 日間、氷室保存) では新鮮度による影響は認められずに終り、氷室保存 10 日間程度以内なら新鮮度による影響を考慮する必要のないことを知つた。

ディスク設置後の氷室放置時間については従来より嚴重に使用書に規定されているが、血液添加培地でも放置時間の長いほど菌発育、溶血両阻止円が増大する傾向が従来の報告同様<sup>1-4)</sup>明示された。このことは氷室放置中におけるディスク含有薬剤の滲透に基因していると考えられ、この点に関する規定は必ず守られるべきであることを再確認した。

基礎的検討の最後に基礎培地による阻止円変動の有無を H. I. A., 普通寒天培地を基礎培地に用いて検討してみたところ、溶、緑連菌、ぶどう球菌、赤痢菌のいずれの菌種によつても TC ディスクにおいて普通寒天使用による著しい阻止円の増大を認めた (CP ディスクではかかる現象を認めなかつた)。このことは従来より種々の培地 (H. I. A., 普通寒天, ミューラーヒントン, 感性ディスク培地等) の使用が一部ディスクで容認されているのみならず、一般にはかなり種々の培地が適時用いられることを思う時、一日も早くかかる面に対する認識が深まり、その一定化が強く望まれる。この原因については両培地間の成分の差異、即ち H. I. A. では牛心臓浸出液であるのに対し普通寒天では肉エキスであることによるのか、TC が酸性側で阻止円の増大をみる<sup>2-5)</sup>ことから、その pH の違いに基因しているのか (H. I. A.:  $7.4 \pm 0.2$ , 普通寒天  $7.0 \pm 0.2$ )、その他にその原因を求めえるかについては今後の検討に待ちたいと考えている。

以上、我々は基礎的条件について種々検討を加え多くの知見を提示してきたが、これらに基づく厳重な規制下で TC, CP 両ディスクが示す菌発育阻止円の面積比を



観察してみた。即ち H. I. A. を基礎培地に用いて溶、緑連菌、ぶどう球菌を被検菌種として CP ディスクでの阻止円に対する TC ディスクでの面積の割合をみてみるといずれの菌種でもディスク薬剤含有濃度が高まるにつれ面積比が減少した。これに加えてこれらの菌種では TC の感受性が CP にくらべて著しく高いのに (表 12 参照)、高濃度含有ディスクが示す阻止円は TC、CP 略々同様で、TC ディスクでは阻止円の出現が CP にくらべて著しく劣ることが明らかにされた。

そこでさらに寒天平板法で同一感受性を示した菌株について検討をつづけてみたところ、TC の高濃度含有ディスクにあつては CP の約 6 割程度の阻止円を示したに過ぎず、TC ディスクでの阻止円出現が CP に比し劣ることが再確認された。しかし普通寒天を基礎培地に用いると高濃度ディスクでは TC 阻止円は CP のそれを上回る成績がえられて、基礎培地によつてかかる関係が大きく支配をうけることが知られた。ただしこれら平板稀釈法で同一感受性を示した菌株も液体稀釈法によれば CP に比し TC が 2~4 倍高い感受性を有していた。したがって液体稀釈法の見地よりみれば、この普通寒天の成績も TC ディスクでの阻止円の出現状況がさらに CP に劣ることを示しているといえそうである。かくの如く、CP に対する TC の面積比がディスク薬剤含有濃度によつて、また培地によつて変動をみることは両者の阻止円を判断して行く上に重要な示唆を与えていると考えられる。

以上要するに、感受性ディスク法を主として血液添加培地の立場から検討し、生菌量が菌発育、溶血両阻止円に大きな影響をもたらし、とりわけ溶血阻止円への影響が顕著であること、両阻止円が平行関係にないこと、ディスク設置後の氷室放置時間が両阻止円に影響すること、血液量、血液の種類が溶血阻止円に関係する場合のあること等ディスク成績に影響を及ぼす多くの諸因子を明らかにした。これに加えて基礎培地を H. I. A. に代えて普通寒天を用いた際には、TC ディスクの示す菌発育溶血両阻止円が著るしく増大する事実を認めて、本法に定量的意義を求めることには可成りの困難が伴うと考えられた。他方、これに基づき TC、CP 両ディスクでの阻止円の関係を追求して、TC ディスクの阻止円はディスク薬剤含有濃度が高まっても CP ほどには増大しないことを明らかにするとともに、H. I. A. を基礎培地に用いた場合、TC ディスクでの阻止円出現が CP に著るしく劣る傾向を確かめて、本法実施上、判定上に資する多くの知見を提示したと信ずる。

## V. 結 論

主として血液添加培地の立場から市販の栄研、昭和の両ディスクを用い、溶、緑連菌、ぶどう球菌、赤痢菌を被検

菌種として TC、CP 両ディスクを用いて感受性ディスク法に基礎的検討を加え、その結果に基づき両薬剤ディスクが示す阻止円の面積関係を追求し、次の結果をえた。

(1) 接種菌量の減少に伴い菌発育、溶血両阻止円の著るしい増大をみた。

(2) 菌発育、溶血両阻止円は平行関係になかつた。

(3) 溶連菌では生食稀釈により T. H. 培地稀釈の場合に比し、菌発育、溶血両阻止円がやや増大する傾向を示した。

(4) 高濃度菌液、低血液濃度の培地では溶血阻止円の出現が阻害された。

(5) 兎血添加培地での溶血阻止円は馬、綿羊血液添加群に比べて溶連菌では縮小し、緑連菌では増大する傾向をみとめた。

(6) ディスク設置後の氷室放置時間の長い程、菌発育、溶血両阻止円が増大した。

(7) 基礎培地に普通寒天を使用すると、TC ディスクでの阻止円が H. I. A. を用いた場合に比し著るしい増大を示した。

(8) H. I. A. を基礎培地に使用した際に、TC ディスクが示す阻止円は CP に著るしく劣つたが、普通寒天を用いてはかかる現象は認められなかつた。

(9) TC ディスクでは CP ディスクほど薬剤含有濃度上昇に伴う阻止円の増大をみとめなかつた。

## 参 考 文 献

- 1) 鳥居敏雄、村山蒨助：抗生物質療法における感性検査法について。総合臨床 6：2056~2066, 1957.
- 2) 金沢 裕：細菌の化学療法剤感受性測定法としての感受性ディスク法。Chemotherapy 9：50~67, 昭 36.
- 3) 金沢 裕：化学療法を行う指標としての感性ディスク法ならびに体内薬剤濃度。日本臨床 14：635~647, 1956.
- 4) 村山蒨助、大竹喜彦、鳥居敏雄：Sensitivity disk による感性検査について。最新医学 11：2178~2191, 1956.
- 5) 金沢 裕：感受性測定の基準化 (I ブドウ球菌)。Chemotherapy 10：352~357, 1962.
- 6) 金沢 裕：感性ディスク法の細菌接種方法について。臨床検査 3：178~179, 1959.
- 7) RANTZ, L. A. & RANDALL, E.: A modification of the technic for determination of the anti-streptolysin titer. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 59：22~25, 1945.
- 8) 平石 浩、飯村 達：昭和 37 年猩紅熱患者から分離した溶連菌の菌型と薬剤感受性について。日伝染会誌 37：123~124, 昭 38.
- 9) 三方一沢、富岡 一：第 10 回化療東日本地方支部会、第 12 回日伝東日本地方合同シンポジウム口演より。
- 10) SWIFT, H. F.: The Streptococci in "Bacterial and mycotic infections of man" edited by DUBOS, R. J., 2nd ed., B. Lippincott Co., 1952, p. 281 より。