

カナマイシン耐性結核菌の検査について

第4報 血清寒天培地、保存全血液寒天培地、卵培地におけるカナマイシン耐性菌の検出率と耐性菌の相関について

北里研究所 小川辰次

(昭和41年3月29日受付)

1. 緒 論

我々は従来までカナマイシン（以下 KM と略す）の耐性検査には、変法Ⅲ KIRCHNER 寒天培地（以下変Ⅲ K培地と略す）を専ら使用していたし、また保存全血液を使用した保存全血液寒天培地によつても検査が可能であることを発表した。昭和39年に改訂されたわが国の“結核菌検査指針”では1%小川培地を使用する事になっている。これらの耐性検査培地における耐性菌の検出率および、耐性菌の相関の概念をつかんでおくことは、耐性菌の検査および整理にあつて必要である。そこで我々は KIRCHNER 寒天培地（以下 K培地と略す）を標準として、他の血清混入の寒天培地や保存全血液を混入した培地および卵培地における KM 耐性菌の検出率および耐性値の相関について検討したので御批判を仰ぎたい。

2. 実験方法

(1) 使用菌株：変Ⅲ K培地によつて KM の耐性検査の完了した株の中から、発育のよい感性および種々の程度の KM 耐性の結核菌をえらび、これを1%小川培地（以下1%小川培地と略す）に継代して、3~4週培養した発育のよい菌株を用いた。

(2) 使用培地および菌接種の方法：

使用培地は表1の様であつて、血清寒天培地、保存全血液寒天培地、卵培地の3種の4% NaOH 処理材料接種用、および3種の中和処理材料接種用の合計6種類である。

培地には、KM をそれぞれ1ml について、1r, 10r, 100r, 1,000r になる様に添加した。即ち血清寒

天培地、保存全血液寒天培地では KM を所定量になる様に添加し、滅菌した上で血清や保存全血液を無菌的に加え、5ml 宛、中試験管に分注、斜面にかためた。卵培地では凝固前に所定量の KM を添加し、5ml 宛、分注して加熱凝固した。したがつて、今回の実験では、何れの培地においても、添加濃度と表示濃度は同一であつて、培地による KM の吸着は考慮していない。

(3) 接種の方法：型の様に、まず蒸留水で1mg/mlの菌浮遊液を作り、これをフェノールレッドの0.04%に混入した4% NaOH で 10^{-1} mg とし、菌浮遊液の一部を別の中試験管にとつて8% HCl で中和し、NaOH の菌浮遊液には、中和に要した8% HCl の量だけの4% NaOH を加えて、中和した菌浮遊液と、4% NaOH 処理菌浮遊液の量を同一として、4% NaOH 処理の菌浮遊液は、それぞれ変Ⅲ K培地、全血液寒天培地Ⅱ（以下全血培地Ⅱと略す）および3%小川培地（以下3%培地と略す）で作つた1組の耐性検査培地に0.1ml 宛を接種し、中和した菌浮遊液は、それぞれ KIRCHNER 寒天培地（以下 K培地と略す）、全血液寒天培地Ⅰ（以下全血培地Ⅰと略す）および1%小川培地（以下1%培地と略す）で作つた1組の耐性検査培地に0.1ml 宛接種し、斜面全体に菌液をうるおし、斜面台に斜面を上にして水平にねかし、37°C に1~2日保存して、液のほぼ乾燥した時に、綿栓をゴムのキャップにとりかえ、たてて37°C に培養した。

(4) 判定：培養3~4週で読み、菌の発育した最高の表示濃度（大部分は不完全耐性、一部完全耐性）をもつて耐性値とした。対照培地に無数の集落を認めるの

表1 使用培地

	血清寒天培地		保存全血液寒天培地		鶏卵培地	
	名 称	KH ₂ PO ₄ の量	名 称	KH ₂ PO ₄ の量	名 称	KH ₂ PO ₄ の量
4% NaOH 用	変法Ⅲ KIRCHNER 寒天培地	1%	全血液寒天培地Ⅱ	0.5%	3% 小川培地	1%
中 和 用		0.4%	全血液寒天培地Ⅰ	0.1%	1% 小川培地	0.3%
感性菌の発育する最高濃度 (mcg/cc)	mcg		mcg		大部分は 一部は	10 mcg 100 mcg

に、KM 添加の培地には、集落数が 10 カ以下の時は、その表示濃度を耐性値にとらずに、10 カ以上の集落の発育した場合のみをもつて耐性値とした。

3. 成績

249 株実施したが、その中、実験に使用した全培地に同程度に発育を見たものは 183 株であつたので、この 183 株の耐性値について、K 培地を標準として、他の培地との相関を求めた。

(1) 変Ⅲ K 培地との相関

表 2 キルヒナー-寒天培地と変法Ⅲキルヒナー-寒天培地の耐性値の相関

		変法Ⅲキルヒナー-寒天培地					合 計
		0	1 mcg	10 mcg	100 mcg	1,000 mcg	
キ ル ヒ ナ ー 寒 天 培 地	0 mcg	24	38	2			64
	1 mcg		27	16			43
	10 mcg			10			10
	100 mcg				4	2	6
	1,000 mcg				4	56	60
合 計		24	65	28	8	58	183

94 (51.4%)

表 3 キルヒナー-寒天培地と全血液寒天培地 I の耐性値の相関

		全血液寒天培地 I					合 計
		0	1 mcg	10 mcg	100 mcg	1,000 mcg	
キ ル ヒ ナ ー 寒 天 培 地	0 mcg	10	52	2			64
	1 mcg	1	32	10			43
	10 mcg		1	9			10
	100 mcg				4	2	6
	1,000 mcg			1	3	56	60
合 計		11	85	22	7	58	183

87 (47.5%)

表 4 キルヒナー-寒天培地と全血液寒天培地 II の耐性値の相関

		全血液寒天培地 II					合 計
		0	1 mcg	10 mcg	100 mcg	1,000 mcg	
キ ル ヒ ナ ー 寒 天 培 地	0 mcg	1	60	3			64
	1 mcg		24	18	1		43
	10 mcg		1	8	1		10
	100 mcg				2	4	6
	1,000 mcg					60	60
合 計		1	85	29	4	64	183

97 (53.0%)

成績は表 2 に示した。K 培地では感性菌の発育する限度は 1 mcg どまりであるから 10 mcg 以上の表示濃度の培地に発育した菌株を細菌学的耐性菌とすると、耐性菌の検出率は 183 例中の 76 例即ち 41.5% である。変Ⅲ K 培地における感性菌の発育する限度は 2 mcg どまりであるから、この培地でも 10 mcg 以上の表示濃度に発育した菌を細菌学的耐性菌とすると、耐性菌の検出率は、51.4% (94 例) である。この相関をみると、高い耐性の 1,000 mcg, 100 mcg では、両培地における例数がほとんど一致しているが、低い耐性の 10 mcg では、変Ⅲ K 培地の方が多い。変Ⅲ K 培地で耐性を示しているものの中には、K 培地では感性を示している 18 例がある。

(2) 全血培地上との相関

成績は表 3 の様である。全血培地 I では、感性菌の発育する限度は 4 mcg であるから、10 mcg 以上の発育をしたものを細菌学的耐性菌とすると、耐性菌の検出率は 47.5% (87 例) である。これらの例の両培地における相関をみると、100 mcg, 1,000 mcg の様な高い耐性菌の例数は両培地で大差はないが、10 mcg の低い耐性菌では、全血培地 I が多い。この全血培地 I の 10 mcg の耐性菌の 22 例をみると、その中の 12 例が K 培地では感性菌である。

(3) 全血培地 II との相関

成績は表 4 に示した。全血培地 II の感性菌の発育する限度は 4 mcg どまりであるから、この場合も 10 mcg 以上に発育したものを細菌学的耐性菌とすると、耐性菌の検出率は 53% (97 株) である。これらの耐性菌の相関をみると、100 mcg, 1,000 mcg の高い耐性菌の検出数はほぼ同じである。低い耐性菌の 10 mcg は 29 例で K 培地に比して著明に多い。この 29 例中の 21 例は K 培地では感性菌である。

(4) 1% 培地との相関

成績は表 5 に示した。1% 培地における感性菌は KM の 1 mcg, 10 mcg, 100 mcg に添加では大部分は 100 mcg まで発育するのが限度であるが、100 mcg に発育するものも多少ある。この場合、100 mcg 以上に発育したものを細菌学的耐性菌とすると、1% 培地における耐性菌の検出率は 45.4% (83 例) である。この耐性菌の相関をみると、高い耐性の 1000 mcg では両培地ほぼ同数であるが、100 mcg では 1% 培地が著明に多い。そして 1% 培地で 100 mcg の耐性を示す 21 例中の 9 例が K 培地では感性菌の姿を示し

表5 キルヒナー寒天培地と1%小川培地の耐性値の相関

		1% 小 川 培 地					合 計
		0	1 mcg	10 mcg	100 mcg	1,000 mcg	
キ ル ヒ ナ ー 寒 天 培 地	0 mcg		27	35	2		64
	1 mcg		3	33	7		43
	10 mcg			2	7	1	10
	100 mcg				3	3	6
	1,000 mcg				2	58	60
合 計		0	30	70	21	62	183

83 (45.4%)

表6 キルヒナー寒天培地と3%小川培地の耐性値の相関

		3% 小 川 培 地					合 計
		0	1 mcg	10 mcg	100 mcg	1,000 mcg	
キ ル ヒ ナ ー 寒 天 培 地	0 mcg		15	48	1		64
	1 mcg		2	25	16		43
	10 mcg			1	9		10
	100 mcg				1	5	6
	1,000 mcg				1	58	60
合 計		0	17	75	28	63	183

91 (49.7%)

ている。一見してわかる様に1%培地の耐性値はK培地に比して高いものが多いがこれはKMの吸着によるものと推定されている。しかしK培地の10倍量のKMを1%培地に添加しても、K培地の耐性値とは必ずしも一致していない。即ちK培地1mcgで1%培地10mcgのものは33例で、これは1%培地10mcgの70例中の47%であり、K培地10mcgで1%培地100mcgのものは、1%培地100mcgの21例中の7例で33%に過ぎない。

(5) 3%培地との相関

成績は表6に示した。3%培地における感性菌の発育する限度は1%培地同様、大部分は10mcgどまりであるが、一部100mcgに発育するものもある。そこで100mcg以上に発育するものを細菌学的耐性菌とすると、その検出率は49.7% (91例)である。これらの耐性菌の相関をみると、高い耐性の1,000mcgでは両培地はほとんど同じ例数であり、低い耐性の100mcgでは、K培地に比して3%培地が著明に多い。3%培地で100mcgの耐性を示す28例中の17例はK培地では感性菌の姿を示している。

4. 総括および考察

我々がK培地を基準にえらんだのはK培地ではKM

の力価が殆んど減少しないこと、そして“結核菌の検査指針”の改訂以前においてはK培地が用いられていた為である。我々の今回の実験はKMの培地による吸着を考慮しないで、添加濃度と表示濃度を同じと仮定し、1mcg, 10mcg, 100mcg, 1,000mcgの通常検査的な表示濃度段階でKM感性菌の発育する限度を土台にして得た細菌学的耐性菌の検出率を比較するとともに、その相関をみたのであるが、標準にえらんだK培地に比して、その他の培地における耐性菌の検出率は何れも多い。

最も多かつたのは全血培地IIの53%であり、これにつづくのは変III K培地の51.4%、3%培地の49.7%、全血培地Iの47.5%、1%培地の45.4%であつて、標準のK培地では41.5%である。更にその相関をみると、高度の耐性菌の検出数は何れの培地でも殆んど差がなく、低い耐性菌の検出において差を見た。このことは一部誤差があるとしても、大部分はK培地では検出できない様な低い耐性菌が他の培地では検出できたことによると推定されるし、また卵培地では、感性菌の一部が耐性菌にまぎれこんでいることも推定される。この様なことは当然のことながら、一口に云

えば、培地組成の異なること、したがって感性菌のKM耐性検査培地における発育濃度の違いが、そのまま反映されているものと思われる。即ち0mcg, 1mcg, 2mcg, 4mcg, 8mcgの表示濃度段階では、感性菌の発育する最高の濃度は、標準のK培地¹⁾では2mcgどまり、変¹⁾III K培地も2mcgどまりではあるけれども、1mcg, 2mcgに発育する菌株はK培地に比して多いから、発育濃度は前者に比して高い。保存全血液培地²⁾における感性菌の発育する限界は両培地とも4mcgどまりであるので変III K培地に比して更に高いし、全血培地Iと全血培地IIの比較では、1mcgから4mcgまでに発育する菌株は後者が多いから、全血培地IIが全血培地Iに比して高いと考えてよい。これらの培地における細菌学的耐性の限界を10mcg以上としたのであるから、当然、耐性菌の検出率はこれらの培地では、K培地に比して多い。1%¹⁾培地、3%培地における感性菌の発育は、大部分は10mcgどまりであるが、一部100mcgに発育するものがある。前3者の培地に比して更に高い濃度に発育することがわかる。KMの力価が卵培地では1/10に減少すると仮定しても、感性菌は卵培地ではK培地に比して高い濃度に発育する。

1%培地と3%培地を比較すると、3%培地において、より高い濃度で発育する傾向を示す。したがって耐

性菌を 100 mcg の濃度に発育するもの以上とすれば、耐性菌の検出率はK培地に比して多いし殊に1%培地よりも3%培地において多くなることは当然である。

以上の様な成績をみると、KMの耐性の検査は、何れの培地でも可能であり、これらの培地の使用にあつては、その培地の特徴を念頭におき、その培地の臨床的耐性の限界を決定すればよい。従来までは卵培地^{4,5,6,7,8)}では力価が減少する為に、卵培地よりはK培地を用いることがよいとされていたが、東村^{9,10,11,12,13,14)}およびその協同研究者達は、接種量を規定すれば、1%培地でも使用可能であると唱え、これに^{15,16,17,18)}賛同する学者もあつた。今回の結核菌検査¹⁹⁾指針の改訂では、実際面を考慮して1%培地に決定した。1%培地では力価の減少を考慮して10倍量のKMを添加することにしたが、これはあくまでも約束であつて、必ずしも10倍量の添加によつてK培地と同様な耐性値を示さないことはつとに証明^{5,8)}された所であり、我々の成績もこの事実を示している。

5. 結 論

我々はカナマイシンの耐性検査にあつて血清寒天培地(キルヒナー寒天培地、変法Ⅲキルヒナー寒天培地)、保存全血液寒天培地(保存全血液寒天培地ⅠおよびⅡ)、卵培地(1%小川培地、3%小川培地)の6種類の培地にカナマイシンを培地1mlについて、1mcg、10mcg、100mcg、1,000mcgに添加して作った1組の耐性検査培地に、249株のカナマイシン感性および種々の程度の耐性結核菌を材料として、4%NaOHで処理してキルヒナー変法Ⅲ培地、保存全血液寒天培地Ⅰ、および3%小川培地に、またそれを中和してキルヒナー寒天培地、保存全血液寒天培地Ⅱおよび1%小川培地に、 10^{-2} mg宛接種し、これらの培地にほぼ同等に発育した183株について、寒天培地では10mcg以上、卵培地では100mcg以上の濃度に発育した菌株を耐性菌とし、耐性菌の検出率を比較すると共に、キルヒナー寒天培地を標準にして、検出された耐性菌の相関をみた結果、次の様な成績を得た。

(1) 耐性菌の検出率 耐性菌の検出率の多い順から記してみると、全血培地Ⅲ……53%、変ⅢK培地……51.4%、3%小川培地……49.7%、全血培地Ⅰ……47.5%、1%小川培地……45.4%、K培地……41.5%であつた。

(2) 検出された耐性菌の相関：100mcg(血清および保存血を混入した寒天培地)1,000mcg(血清、保存血培地および卵培地)の様な高い耐性菌においては、培地の異なることによつても、株数の上にほとんど差はない。検出率の上に差ができたのは、10mcg(血清および保存全血液混入の寒天培地、100mcg(卵培地)の様な低い耐性菌の検出株数が多いからであつて、このことはK培地では検出できない様な低い耐性菌が、K培地以外の培地において検出されたためであろう。

主要文献

- 1) 小川, 沢井, 島田 結核, 33 : 749, 1958.
- 2) 小川, 沢井, 島田 : 結核, 34 : 797, 1959.
- 3) 東村(道) : 医学と生物学, 49 : 87, 1958.
- 4) 伊藤, 大川, 杉山, 亀崎, 綾部 : 結核, 34 (増刊号) : 118, 1959.
- 5) 熊谷, 柳沢(厚生省結核療法研究協議会) : 日本医事新報, 1838 : 3, 1959.
- 6) 杉山 : 結核, 35 : 179, 1960.
- 7) 小川(政) : 結核, 37 : 565, 1962.
- 8) 林, 小山, 根橋, 大竹 : 結核, 37 : 565, 1962.
- 9) 東村(道) : 医学と生物学, 51 : 55, 1959.
- 10) 東村(道) : 安保, 勝沼 : 結核, 34 : 625, 1959.
- 11) 東村(道) : 安保, 山中 : Chemotherapy, 7 : 213, 1959.
- 12) 東村(道) : 結核, 35 : 109, 1960.
- 13) 東村(道), 今津, 東村(純), 河西 : 日本胸部臨床, 22 : 844, 1963.
- 14) 東村(純) : 結核, 39, 60, 1964.
- 15) 小森, 石橋, 竹崎, 森, 田坂, 三田村 : 結核, 35 : 66, 1960.
- 16) 河西, 亀頭 : 衛生検査, 10 : 49, 1961.
- 17) 中井 : 結核, 37 : 568, 1962.
- 18) 小川(政) : 結核, 37(特別号) : 105, 1962.
- 19) 厚生省監修, 結核菌検査指針, 財団法人日本公衆衛生協会発行, 1964.