

## *Legionella* に対する新しい薬剤感受性用培地 (B-SYE 寒天培地) について

猿渡克比孔・伊藤直美・長沢正夫・中里博子・古賀宏延  
渡辺謙一・田中光・藤田紀代・重野芳輝・山口恵三  
泉川欣一・斎藤厚・原耕平

長崎大学医学部第2内科

(昭和59年5月11日受付)

*Legionella* の薬剤感受性用培地としては、FG 寒天培地、B-CYE 寒天培地および YPH 寒天培地が報告されているが、私達の検討では、YPH 寒天培地では本菌の発育が悪く使用できないものと思われる。B-CYE 培地は現在最も優れている培地であるが、本培地には活性炭が添加されているために、ある種の抗生剤の抗菌活性が不活化されることが知られている。私達は B-CYE 培地を改良した薬剤感受性用培地 (B-SYE 寒天培地) を考案したので報告する。

B-SYE 培地の組成は、培地 1,000 ml 中 ACES buffer 10 g, KOH 2.6 g, 酵母エキス 10 g, レンズスティン塩酸塩 0.4 g, ピロリン酸第二鉄 0.25 g, L-グルタミン酸ナトリウム 5 g, 可溶性デンプン 15 g, 寒天 15 g, pH  $6.9 \pm 0.05$  である。レンズスティン塩酸塩およびピロリン酸第二鉄を除いた各成分を精製水 980 ml に溶解し、高圧滅菌後、それぞれ少量 (10 ml) の精製水に溶解したレンズスティンおよびピロリン酸第二鉄溶液を濾過滅菌し、基礎培地に加えて pH を  $6.9 \pm 0.05$  に調整する。

B-SYE 培地上で *Legionella* は B-CYE 培地とほぼ同等の発育を示し、さらに minocycline を除いた各種抗生剤の抗菌活性の阻害は B-CYE 培地より弱く、本菌の薬剤感受性用培地として使用できるものと考えられた。

*Legionella* がその発育に際して要求する栄養素はきわめて簡単なもので、レンズスティン、セリン、トリプトファン、酵母エキスなど、ごくありふれたものにすぎない<sup>1,2)</sup>。しかし、これらの栄養源が存在しても培地素材である寒天、ペプトン、酵母エキス中の不飽和脂肪酸、含硫黄アミノ酸の熱変性物質によってその発育が阻害されるために<sup>3)</sup>、普通一般に用いられている培地には発育することができない。そのために本菌の分離培地あるいは感受性用培地として活性炭<sup>4,5,6)</sup>あるいは血液などを加えた培地が考案され報告されている。

活性炭を含まない培地では、活性炭を添加した培地よりも本菌の発育は劣り、現在では分離培養および薬剤感受性用培地として、活性炭を添加した B-CYE 寒天培地<sup>7)</sup>が汎用されている。しかし、この活性炭はある種の抗生剤の抗菌活性を低下させることが報告されており、JOHNSON ら (1982) は<sup>8)</sup>活性炭を除いた YPH 寒天培地を報告した。しかし、本培地は寒天を除いた組成成分をすべて濾過滅菌するために多くの培地を要する MIC 測定用培地としては不向きな点がある。

今回、私達は B-CYE 培地とほぼ同等の発育を有し、抗生剤の抗菌活性にあまり影響を及ぼさない培地を考案したので報告する。

### I. 材料および方法

#### 1. B-SYE 寒天培地の組成および調製法

B-SYE 寒天培地 (Buffered starch-yeast extract agar) の組成を Table 1 に示した。本培地の作製は基礎培地の成分を蒸留水 980 ml に溶解し、121°C, 15 分間高圧滅菌後、約 50°C 内外に恒温槽にて保温し、これに濾過滅菌した レンズスティン塩酸塩およびピロリン酸第二鉄溶液を加え、pH を  $6.9 \pm 0.05$  に調整したのち、一定量 (約 15~18 ml) を滅菌プレートに分注した。

#### 2. 発育比較試験

##### i) 供試菌株

供試菌株は当教室保存の *L. pneumophila* serogroup 1-6, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*, および *L. jordanis* の標準菌株 12 株および臨床、環境分離 *L. pneumophila* 3 株, *L. bozemanii* 3 株, *Legionella-like organism* (L.L.O. と略

Table 1 Preparation of B-SYE medium for sensitivity test agar on *Legionella bacterium*

1) Base medium	
ACES buffer	10g
Yeast extract	10
L-glutamate monosodium	5
Potassium hydroxide	2.6
Starch, soluble	15
Agar	15
Distilled water	980ml
2) L-Cystein hydrochloride	
	0.4g
Distilled water	10ml
3) Ferric pyrophosphate	
	10.25g
Distilled water	10ml
4) Directions	
Suspend each ingredient of base medium in 980ml of distilled water.	
Sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes.	
Cool the sterile medium to 50°C in water bath.	
Add (2) and (3) solution sterilized by filtration to the base medium.	
Adjust pH 6.9±0.05	

す) 2株の計 20 株であった。

#### ii) 発育比較試験

本培地の発育性を検討するために用いた対照用培地は B-CYE 寒天培地である。試験方法は、被検菌株の B-CYE 寒天培地 24 時間培養菌を pH 7.2 の滅菌 PBS にて McFaland #5 ( $1.2 \sim 7.0 \times 10^9$  CFU/ml) の濃度に調整し、この菌液を滅菌 PBS を用いて  $10^{-1}$  から  $10^{-6}$  まで 10 倍希釈を行ない、それぞれの希釈液を本培地および B-CYE 寒天培地上にマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて 5.0  $\mu$ l 接種し、35°C、4 日間培養を行ない、両者の培地上での発育状態を比較検討した。

#### 3. 培地による各種抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響

##### i) 供試薬剤

検討した抗生剤は erythromycin (EM), josamycin (JM), lincomycin (LCM), chloramphenicol (CP), minocycline (MINO), amikacin (AKM), gentamicin (GM), tobramycin (TOB), dibekacin (DKB), ampicillin (ABPC), sulbenicillin (SBPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), cefoxitin (CFX), cefmetazole (CMZ), cefotiam (CTM), cefotaxime (CTX), cefoperazone (CPZ), cefmenoxime (CMX), cefotetan (CTT), cefbuperazone (CBPZ), cefpiramide (CPM), vancomycin (VCM) および Ro-139904 の計 24 薬剤であった。

##### ii) 抗生物質の濃度測定法

本培地および B-CYE 培地の組成から寒天を除いた液体培地に、上記の各抗生剤を最終濃度が 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml および 1.0  $\mu$ g/ml の濃度になるように加え、1~2 時間室温で作用させた後、残存する抗生剤の濃度を測定用培地として Mueller Hinton agar (Difco) を用い、*Micrococcus luteus* PCI-1001 および *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした薄層平板カップ法にて測定を行なった。各種抗生剤の標準曲線は、各抗生剤を pH 6.9, 1/15 M-リン酸緩衝液で希釈を行ない、同時に測定した。

## II. 結 果

### 1. 発育比較成績

本培地および B-CYE 寒天培地上での発育状態の比較を Table 2, 3 に示した。表中の発育状態は  $10^{-2}$  希釈液で発育したものを土,  $10^{-3}$  希釈液で発育したものを+,  $10^{-4} \sim 10^{-5}$  希釈液で発育したものを++,  $10^{-6}$  希釈液で発育したものを+++ で表わした。

標準菌株 12 株を用いた両培地上での発育状態の比較は Table 2 に示したように、*L. pneumophila* の 6 株, *L. micdadei*, *L. dumoffii* および *L. gormanii* の計 9 株は両者の培地間では、その発育状態にはほとんど差異は認

Table 2 Growth of *Legionella* stock strains on B-SYE and B-CYE medium

Organisms	No. tested	B-SYE medium			B-CYE medium		
		24hr.	48hr.	78hr.	24hr.	48hr.	78hr.
<i>L. pneumophila</i>	6	+	+++	+++	+	+++	+++
<i>L. micdadei</i> (Tatolok)	1	+	++	+++	+	++	+++
<i>L. bozemanii</i> (WIGA)	1	+	++	++	+	++	+++
<i>L. dumoffii</i> (Tex-KL)	1	+	+++	+++	+	+++	+++
<i>L. gormanii</i>	1	±	+++	+++	+	+++	+++
<i>L. longbeachae</i>	1	+	+	++	+	+++	+++
<i>L. jordanis</i>	1	±	++	+++	+	++	+++

+++ : Growth on  $10^{-6}$  dilution, ++ : Growth on  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  dilution,

+ : Growth on  $10^{-3}$  dilution, ± : Growth on  $10^{-2}$  dilution

Table 3 Growth of environmental and clinical isolates on B-SYE and B-CYE medium

Organisms	B-SYE medium			B-CYE medium			
	24hr.	48hr.	78hr.	24hr.	48hr.	78hr.	
<i>L. pneumophila</i>	1	+	++	+++	+	++	+++
	2	+	++	+++	+	++	+++
	3	+	++	+++	+	++	+++
<i>L. bozemanii</i>	1	+	++	+++	+	++	+++
	2	+	++	+++	+	++	+++
	3	+	++	+++	++	+++	+++
L. L. O	1	+	++	+++	+	++	++
	2	+	++	+++	+	++	++

+++ : Growth on  $10^{-8}$  dilution, ++ : Growth on  $10^{-4}$  to  $10^{-6}$  dilution,

++ : Growth on  $10^{-3}$  dilution, ± : Growth on  $10^{-2}$  dilution

めなかった。一方、*L. bozemanii*, *L. longbeachae* および *L. jordanis* の 3 菌種は B-CYE 寒天培地に比較して、本培地上での発育はやや劣る傾向であったが、48 時間培養では、*L. longbeachae* を除いては両者の培地間ではほとんど差は認められなかった。

臨床、環境分離株を用いた両者の培地上での発育状態は (Table 3), 24 時間培養後の判定では、*L. pneumophila* の全株、*L. bozemanii* の 2 株中 1 株および L. L. O. の 2 株は両培地間で差は認められず、48 時間培養後の判定では、全株とも両者の培地における発育は差を認めることはできなかった。

## 2. 培地による各種抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響

i) マクロライド系薬剤, CP, MINO に対する影響  
B-SYE 培地および B-CYE 寒天培地によるマクロライド系薬剤, CP および MINO の抗菌活性に及ぼす影響を検討し、その成績を Fig. 1 に呈示した。EM の各濃度における抗菌活性は両者の培地成分によってほとんど影響を受けなかった。しかし、JM, LCM および CP では両者の培地でわずかではあるが、抗菌力の低下がみられ、特に B-CYE 培地では、本培地に比較して、これらの薬剤における抗菌活性の低下は著明であった。MINO は他の薬剤に比較して、両者の培地によって影響を受け、その抗菌活性の低下は顕著であった。

## ii) 合成ペニシリンおよびアミノグリコシド系抗生剤に及ぼす影響

Fig. 2 に示したように、合成ペニシリン系抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響では、本培地に比較して B-CYE 培地の方が、これらの薬剤の抗菌力を低下させる傾向があり、特に SBPC の抗菌力の低下は顕著であった。AMK をはじめとするアミノグリコシド系薬剤の抗菌活性に対する両培地の影響は、ほとんどみられなかったが、TOB に関しては低濃度においても B-CYE 培地によってやや

Fig. 1 Comparison of antibacterial potency of macrolides, chloramphenicol and minocycline between B-SYE and B-CYE medium

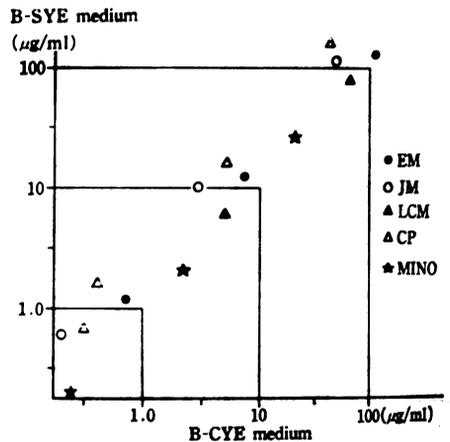


Fig. 2 Comparison of antibacterial potency of penicillins and aminoglycosides between B-SYE and B-CYE medium

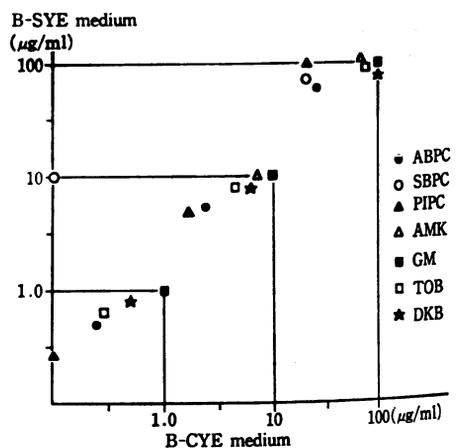
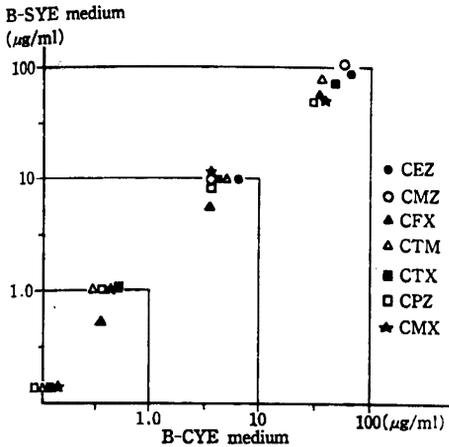


Fig. 3 Comparison of antibacterial potency of cepheids between B-SYE and B-CYE medium



影響がみられた。

### iii) セフェム系抗生剤および Vancomycin に及ぼす影響

両培地によるセフェム系抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響を Fig. 3, 4 に呈示した。両培地の比較では、CFX を除いてほとんどすべてのセフェム系抗生剤に対して本培地よりも B-CYE 培地によって抗菌活性が低下させられる傾向であった。CFX に対しては両培地とも影響を及ぼし、抗菌力の低下がみられた。

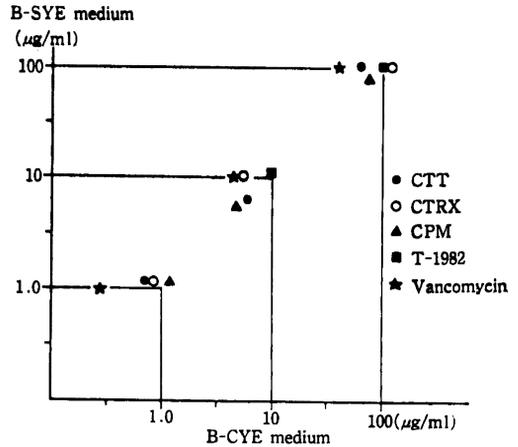
Vancomycin に対しては、本培地は各濃度 (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1.0 µg/ml) とも影響はみられなかったが、B-CYE 培地では抗菌力の低下がみられた (Fig. 4)。

### III. 考 案

*Legionella* は元来土壌あるいは水中のアメーバを natural host として棲息しているが<sup>9)</sup>、大気中の粉塵と共に冷却水を汚染し、飛散した冷却水の微粒子をヒトが吸引することによってヒトに発症させることが報告され<sup>10)</sup>、今日、我国においても注目されている菌種の一つである。

本菌は、その発育に際してのエネルギー源あるいは炭素源として L-cysteine, L-serine および L-methionine などのアミノ酸類、鉄などを必要とし、その中でも L-cystein は必須栄養素として不可欠である。しかし、本菌は寒天、ペプトンあるいは酵母エキス等の培地素材中に含まれるクエン酸塩などの有機酸塩、オレイン酸などの脂肪酸によって発育が阻害されることが明らかとなり<sup>3)</sup>、さらに熱を加えることによって生じる含硫黄アミノ酸の変性によっても発育が阻害されるものと考えられる。そのために今日までに考案されている分離用培地または薬剤感受性用培地には活性炭あるいは血液などの吸

Fig. 4 Comparison of antibacterial potency of cepheids and vancomycin between B-SYE and B-CYE medium



着物質を加えるか、培地成分を濾過滅菌して作製する培地が報告されている。これらの培地は、本菌の発育支持力に優劣があり、特に培地成分を濾過滅菌して作製する YPH 培地は私達の検討では、ほとんどの *Legionella* が発育しないために使用できないものと思われる。

活性炭を加えた培地には CYE 培地<sup>4)</sup>、B-CYE 培地<sup>5)</sup> および B-CYE<sub>a</sub> 培地<sup>6)</sup> が報告されており、特に B-CYE<sub>a</sub> 培地は本菌の発育支持力あるいは分離用培地として最も優れているが、私達の検討では B-CYE<sub>a</sub> 培地は B-CYE 培地に比較して各種抗生剤の抗菌活性を低下させる傾向があり、この抗菌活性の低下は本培地に加えられている α-ketoglutaric acid によるものと考えられる。このような理由により、薬剤感受性用培地としては今日では B-CYE 培地が汎用されているが、本培地に加えられている活性炭は、tetracycline, polymyxin の抗菌活性を低下させる作用があることは既に報告されており<sup>11)</sup>、私達は各種抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響を少なくした培地を考案し、本菌に対する発育支持力、抗菌活性に及ぼす影響等について B-CYE 培地と比較検討を行なった。

*Legionella* 7 菌種 20 株を用いた本培地および B-CYE 培地における発育性の検討では、*L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* および *L. gormanii* では両者間に優劣はなかったが、*L. bozemanii*, *L. longbeachae* および *L. jordanis* の 3 菌種では B-CYE 培地に比較して本培地上での発育はやや劣る傾向ではあったが、48 時間培養では両者間にほとんど差を認めなかった。

本培地による各種抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響を B-CYE 培地のそれと比較検討したが、マクロライド系薬剤の中で、EM は両培地によってそれほど抗菌力の低

下はみられなかった。しかし、JM および LCM には本培地は B-CYE 培地に比較して抗菌活性を低下させる作用は少なく、さらにペニシリン系薬剤および cephem 系薬剤でも同様な傾向であった。B-CYE 培地でこれらの薬剤の抗菌活性が低下することは培地に含まれる活性炭の作用と考えられるが、特に SBPC、PIPC および VCM の抗菌力を低下させる作用は顕著であった。MINO では、両培地ともに抗菌力の低下がみられ、このことは発育支持剤として加えられているピロリン酸第二鉄による鉄イオンの影響と考えられる。

*Legionella* は細胞内増殖菌という特性をもち、*in vitro* の抗菌力と *in vivo* での結果とは一致しない場合が多い。しかし、これは薬剤の細胞内移行性に関係があり、このような細胞内増殖菌の *in vitro* での抗菌活性の測定には、好中球あるいは単球を用いた細胞培養内での抗菌力を測定することが望ましいが、通常の検査の過程では、これらの手技が煩雑であるために現在応用することは非常に困難なことでありとされる。そのために現時点では本菌の薬剤感受性測定は、従来一般細菌で行なわれている寒天平板希釈法あるいは液体培地希釈法による MIC 測定を行なわざるを得ないものと考えられる。私達が考案した B-SYE 培地は B-CYE 培地とほぼ同等の本菌の発育を維持し、さらに B-CYE 培地に比較して各種抗生剤の抗菌活性に及ぼす影響も少なく、*Legionella* の薬剤感受性用培地として使用できるものと考えられる。

本研究は 1984 年度厚生科学研究の一環として行われた。

#### 文 献

- 1) FEELEY, J. C.; G. W. GORMAN, R. E. WEAVER, D. C. MACKEL & H. W. SMITH: Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *J. Clin. Microbiol.* 8: 320~325, 1978
- 2) PINE, L.; J. R. GEORGE, M. W. REEVES & W. K. HARRELL: Development of chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 9: 615~626, 1979
- 3) WARREN, W. J. & R. D. MILLER: Growth of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.* 10: 50~55, 1979
- 4) FEELEY, J. C.; R. J. GIBSON, G. W. GORMAN, N. C. LANGFORD, J. K. RAHHEED, D. C. MACKEL & W. B. BARINE: Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 10: 437~441, 1979
- 5) PASCULLE, A. W. et al.: Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. *J. Infect. Dis.* 141: 727~732, 1980
- 6) EDELSTEIN, P. H.: Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* 14: 298~303, 1981
- 7) GREAVES, P. W.: New methods for the isolation of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 581~584, 1980
- 8) JOHNSON, S. R.; W. O. SCHALLA, K. H. WONG & G. H. PERKINS: Simple, transparent medium for study of Legionellae. *J. Clin. Microbiol.* 15: 342~344, 1982
- 9) ROOBOTHAM, T. J. et al.: Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for fresh water and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33: 1179~1183, 1980
- 10) DONDERO, T. J. et al.: An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *New Eng. J. Med.* 302: 365~370, 1980
- 11) PASCULLE, A. W.; J. N. DOWLING, R. S. WEGANT, J. M. SNIFFEN, L. G. CORDES, G. M. GORMAN & J. C. FEELEY: Susceptibility of pittsburgh pneumonia agent (*Legionella micdadei*) and other newly recognized members of the genus *Legionella* to nineteen antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 793~799, 1981

NEW SUSCEPTIBILITY TESTING MEDIUM  
(B-SYE AGAR) FOR *LEGIONELLA*  
AND *LEGIONELLA*-LIKE ORGANISMS

KATSUHIKO SAWATARI, NAOMI ITOH, MASAO NAGASAWA,  
HIROKO NAKASATO, HIRONOBU KOGA, KOICHI WATANABE,  
HIKARU TANAKA, KIYO FUJITA, YOSHITERU SHIGENO,  
KEIZO YAMAGUCHI, KINICHI IZUMIKAWA, ATSUSHI SAITO  
and KOHEI HARA

2nd Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

F-G agar, buffered charcoal-yeast extract agar (B-CYE agar), or YPH agar has been used as susceptibility testing media for *Legionella*. The result of our examination showed that YPH agar was not able to support the growth of *Legionella* species and *Legionella*-like organisms, and therefore this agar could not be used for susceptibility testing. Also, it has been well known that activated charcoal in the B-CYE agar could inactivate some antimicrobial agents.

Buffered starch-yeast extract agar (B-SYE agar) is newly devised medium for the susceptibility test for *Legionella* and *Legionella*-like organisms. This agar was modified from B-CYE agar. A base medium of B-SYE agar was prepared as follows; ten grams of N-[2-acetamide]-2-aminoethansulfonic acid (ACES) buffer, 2.6 g of potassium hydroxide, 10 g of yeast extract, 5 g of monosodium glutamate, 15 g of soluble starch and 15 g of agar were dissolved altogether in 980 ml of distilled water, and sterilized by autocleaving at 121°C for 15 minutes. And then, 10 ml of each filter-sterilized solution of L-cysteine hydrochloride (40 mg/ml) and ferric pyrophosphate (25 mg/ml) was added. The medium was adjusted to pH 6.9±0.05 with each of filter-sterilized solution of 1 N KOH or 1 N HCl.

B-SYE agar supported the growth of all of the 20 strains of *Legionella* and *Legionella*-like organisms which were isolated from clinical and environmental sources. According to the comparison of B-SYE agar and B-CYE agar, B-SYE agar did not inactivate the antimicrobial agents except minocycline than that of B-CYE agar. Minocycline inhibited by B-SYE agar probably because of binding of the antibiotics to Fe<sup>++</sup> in the medium.