

Kanamycin 耐性結核菌の検査について

第2報 Kanamycin 未投与の肺結核症患者の喀痰より分離した結核菌および

保存菌株による間接法の基礎実験と直接法と間接法の比較

小川 辰次・沢井 武・島田 英彦

北里研究所付属病院 (院長 宗武藤)

受付 昭和 35 年 7 月 24 日

I 緒 論

第 1 報においてわれわれ¹⁾は Kanamycin (以下 KM と略) の耐性結核菌の直接法の検査では、変法 Kirchner 寒天培地, Kirchner 寒天培地のような寒天培地が適当であり, 3% 小川培地, 1% 小川培地のような鶏卵培地は適当でないことを推定した。直接法で Kirchner 寒天培地が適当であり, 1% 小川培地が不適当であることは間接法においてもあてはまるであろうことは推定されるが, 当時なお KM が卵黄に吸着されることははつきりしておらず, 従来の慣習から鶏卵培地の使用にも希望がもてたので, 一応 Kirchner 寒天培地とともに 1% 小川培地について実験したので報告する。

II 方 法

1) 菌株: KM 感性の保存人型結核菌, H₃₇Rv 株, H₂ 株および肺結核症患者の喀痰より分離して間もない高野株と, 従来まで KM の投与をうけておらず主として SM, PAS, INH 等の投与をうけている患者から分離した菌株等で, これらはいずれも KM に対しては感性であろうと推定されている。

2) 喀痰: KM 以外の化学療法剤の投与をうけている肺結核症の患者のものを使用した。喀痰採取の前 1 日は化学療法薬の投与を中止したことはもちろんである。

3) 培地: 間接法では 1% 小川培地および Kirchner 寒天培地を用いた。また直接法では Kirchner 寒天培地とともに変法 III Kirchner 寒天培地を用いた。1% 小川培地は型のごとく作った。Kirchner 寒天培地および変法 III Kirchner 寒天培地に用いた寒天は Bacto-Agar (Difco) であつて, 2% になるように混入した。なお寒天培地には 0.1% マラカイト緑を 100 cc に対して 0.25 cc 宛加えた。なお血清は馬血清を用い 10% に混入した。

KM は培地 1 cc について, 1%, 2%, 4%, 8%, 16% あるいは 1%, 10%, 100% になるように加えた。

1% 小川培地では凝固滅菌する前に, また実験の一部では所定量の 50 倍のこの濃度の KM を作っておき, 5 cc 宛分注して滅菌凝固した 1% 小川培地の斜面に 0.1 cc 宛流しこんで, 1 晩 37°C の孵卵器に入れて乾かし, 前述の濃度のように混入した。

4) 培養の方法: 水晶玉入りの磨砕コルベで 1mg/cc の菌液を作り, これを滅菌蒸留水で稀釈して, メスピレットで 0.1 cc 宛接種した。接種菌量は 10⁻¹ ~ 10⁻⁵mg, あるいは 10⁻³mg のように実験によつて異なっている。接種したものは 1 晩 37°C で斜面台にねかし, 翌日ゴムのキャップにかえ, たてて培養した。なお水分の乾かないものでは 2 晩ねかしたのものもある。

5) 判定: 間接法はすべて 4 週で直接法は 5 週で判定した。そしてそのときの 1 系列の混入濃度の最高の濃度に発育したところをもつて耐性値とした。

III 成 績

A. 間接法の実験

a. 1% 小川培地による実験

1) 凝固する前に KM を混入した耐性検査培地に, 保存菌株, 患者より分離して間もない菌株の接種菌量を種々にして培養した実験。

1~16% まで 2 倍宛増量して混入した培地に 10⁻¹~10⁻⁵mg 接種した。成績は表 1 のようであつて H₃₇Rv と高野株ではほとんど同じであつて, 10⁻¹~10⁻⁴mg までは 8% であり, 10⁻⁵mg では 1 段下つて 4% である。次に H₂ 株では前 2 者と傾向が違つて, 接種菌量のいかんをとわず 16% である。

2) でき上つた培地に KM を流しこんで作った耐性検査培地に保存菌株, および肺結核症の患者の喀痰より分離して間もない菌株の接種菌量をいろいろにして培養した実験。

表 1 の実験と並行して実施した。この実験は KM が卵黄により吸収されることはわかつていながつたときになされたものであつて, 鶏卵培地で耐性値の高くなるの

表 1 1% 小川培地に Kanamycin を混入して作った耐性検査培地に、接種菌量を種々にして実験した成績

菌株	接種菌量 混入濃度 (γ/cc)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
		mg	mg	mg	mg	mg
H ₃₇ Rv	16 γ	-	-	-	-	-
	8	■	■	■	1	-
	4	■	■	■	94	32
	2	■	■	■	128	10
	1	■	■	■	121	11
	0	■	■	■	118	20
H ₂	16 γ	■	■	■	34	2
	8	■	■	■	94	5
	4	■	■	■	84	17
	2	■	■	■	68	17
	1	■	■	■	92	14
	0	■	■	■	118	8
高野	16 γ	-	-	-	-	-
	8	■	■	+	+	-
	4	■	■	■	96	15
	2	■	■	■	154	31
	1	■	■	■	128	32
	0	■	■	■	126	28

注：菌の発育は次のようである
 ■……斜面全体に集落が菌膜様に融合したもの
 ■……斜面全体に発育しているが集落の孤立しているもの
 ■……斜面の 2/3 程度の集落数
 ■……斜面の 1,2 程度の集落数
 +……発育しているが集落が小さくて数えられないもの
 数字…集落の数を示す
 -……陰性

は、あるいは加熱によるのではないかと想像されたので実施した。成績は表 2 にみるようである。がいて耐性値の高いことは、①の実験と同様である。すなわち、H₃₇Rv では 10⁻³mg まで 16 γ、10⁻⁴mg、10⁻⁵mg では 8 γ である。高野株では 10⁻¹mg で 16 γ、10⁻²~10⁻⁴mg で 8 γ、10⁻⁵mg では 4 γ である。このように H₃₇Rv と高野株とは、耐性値に多少の差があるが、両株とも接種菌量の少なくなるとともに耐性値は低くなる傾向にある。次に H₂ 株は接種菌量のいかんにかかわらず 16 γ を示している。これを表 1 と比較すると、H₃₇Rv 株と高野株では接種菌量の多いところでは、前者に比して 1 段と高い耐性を示していることは違点であるが、接種菌量の少なくなるとともに耐性値が低くなる傾向は表 1 の成績と全く同様である。次に H₂ 株では表 1 とほとんど差がない。このように滅菌凝固して作った KM 混入の耐性培地の耐性値が流しこみで作った耐性培地に比して高くなく、むしろ差がないことは、培地中に混入された KM が加熱によつてもその力価が低下しないと解釈してよいであろう。

表 2 1% 小川培地に Kanamycin を流しこんで作った耐性検査培地に、接種菌量を種々にして実験した成績

菌株	接種菌量 混入濃度 (γ/cc)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
		mg	mg	mg	mg	mg
H ₃₇ Rv	16 γ	■	+	6	-	-
	8	■	■	145	1	3
	4	■	■	■	65	6
	2	■	■	■	48	5
	1	■	■	■	64	10
	0	■	■	■	71	20
H ₂	16 γ	■	■	52	8	1
	8	■	■	84	8	4
	4	■	■	156	36	5
	2	■	■	162	42	7
	1	■	■	180	44	6
	0	■	■	204	72	10
高野	16 γ	+	-	-	-	-
	8	■	■	■	+	-
	4	■	■	■	32	3
	2	■	■	■	42	5
	1	■	■	■	76	20
	0	■	■	■	98	21

注：表 1 に同じ

b. Kirchner 寒天培地による実験

1) 保存菌株および分離して間もない菌株の接種菌量を種々にして培養した実験。

この実験も表 1, 2 の実験と並行して同時に実施されたものである。

成績は表 3 にみるように、H₃₇Rv 株では 10⁻¹ mg では 1 γ であるが、10⁻²~10⁻⁵mg では 1 γ 以下であり、高野株では接種菌量のいかんにかかわらず 1 γ 以下である。すなわちこの両株はほぼ同じような傾向を示す。次に H₂ 株では、10⁻¹ mg、10⁻² mg では 16 γ、10⁻³mg では 2 γ、10⁻⁴ mg、10⁻⁵ mg では 1 γ である。このように菌株によつて耐性値の現われ方に違いがあるが、鶏卵培地に比して耐性値はかいて低い。

2) 肺結核症患者の胃液、喀痰より分離した多数例の菌株の実験。

保存菌株の H₂ 株のような非定型的な菌株に類するものがはたして存するかどうか？存するとすればどの程度に出現するものかと思ひ実験した。まず 8% 水酸化ナトリウム液を喀痰に等量加えて 3% 小川培地で分離した初代の菌株で菌液を作り 10⁻³ mg を 0.1 cc に含ませて、1 γ、10 γ、100 γ に混入して作った耐性培地に培養した。成績は表 4 のようである。

合計 50 例実施したがそのうちの 42 例すなわち 84

表3 Kirchner 寒天培地に Kanamycin を混入して作った耐性検査培地に、接種菌量を種々にして実験した成績

菌株	接種菌量 混入濃度 (γ/cc)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
		mg	mg	mg	mg	mg
H ₃₇ Rv	16 γ	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	1	卅	-	-	-	-
	0	卅	卅	卅	84	8
H ₂	16 γ	+	1	-	-	-
	8	+	1	-	-	-
	4	卅	42	-	-	-
	2	卅	46	24	-	-
	1	卅	48	25	1	2
	0	卅	卅	卅	114	18
高野	16 γ	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	0	卅	卅	卅	168	24

注：表1に同じ

表4 肺結核症患者の胃液、喀痰より分離した多数例の菌株の実験

培地	対照に 混入濃度 (γ/cc)	発育した集落数			合計
		1~100	101~200	無数	
Kirchner 寒天培地	100 γ	0	0	0	0
	10 γ	0	0	0	0
	1 γ	1	0	7	8
	0	16	13	13	42

注：欄中の数字は例数を示す

% は 1 γ 以下であり、8 例すなわち 16 % は 1 γ であつて、10 γ、100 γ の耐性値を示したものは 1 例もない。すなわち 50 例の少数ではあるが H₂ 株のように耐性値の高くできるものは 1 例もなかつた。このことは接種菌量が 10⁻³mg であつたためかもしれない。なお 10⁻³mg の接種にもかかわらず、対照に 1~100 のように少ない集落の発育したのは、継代せずにやつたことや、検査までの期間が長いものがあつたことや、あるいは分離された菌株そのものの生活力が弱かつたためかとも思われる。

以上 2 つの成績から間接法に Kirchner 寒天培地を用いることは妥当のように思われる。

B. 間接法と直接法の比較

表5 同一患者についての直接法と間接法の比較

患者番号	方法 培地	直接法		間接法	
		変法 III Kirchner 寒天培地	Kirchner 寒天培地	Kirchner 寒天培地	Kirchner 寒天培地
(1)	実施あるいは分離の日 濃度 (γ/cc)	2/V 30/V	2/V 30/V	23/XII 1957	27/II
	100 γ	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-
	1 γ	卅	-	-	6
	0	卅 卅	108 卅	53 卅	(2) 卅 (卅)
	実施あるいは分離の日 濃度 (γ/cc)	6/III 2/V	2/V	21/I	24/II
(2)	100 γ	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-
	1 γ	卅	170	-	卅
	0	卅 卅	160	24 (75)	卅 (卅)
	実施あるいは分離の日 濃度 (γ/cc)	6/III 2/V	2/V	24/II	
	100 γ	-	-	-	-
(3)	10 γ	-	-	-	-
	1 γ	卅 卅	卅	+	-
	0	卅 卅	卅	卅	卅 (卅)
	実施あるいは分離の日 濃度 (γ/cc)	2/V	2/V	24/III	
	100 γ	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-
(4)	1 γ	卅	+	卅	
	0	卅	卅	卅	卅 (卅)
	実施あるいは分離の日 濃度 (γ/cc)	50/V	50/V	29/I	
	100 γ	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-
	1 γ	-	-	-	-
(5)	0	卅	卅	63 (32)	
	実施あるいは分離の日 濃度 (γ/cc)	30/V	30/V	24/I	
	100 γ	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-
	1 γ	-	-	-	-
	0	11	5	84 (卅)	

	実施あるいは分離の日					23/XII 1957
	濃度 (γ/cc)	6/III	9/IV			
(7)	100 γ	-	-			-
	10 γ	-	-			-
	1 γ	3	30			-
	0	4	65			32 (20)
	実施あるいは分離の日					24/II
	濃度 (γ/cc)	6/III	4/IX			
(8)	100 γ	-	-			-
	10 γ	-	-			-
	1 γ	-	+			16
	0	9	+			+

- 注: 1) 集落の記号は表 1 に同じ
- 2) 実施, あるいは分離の日の実施は直接法, 分離の日は間接法で用いた被検菌株の分離された日を示す
- 3) 間接法の対照のところの () の中には分離された集落の数を示す

直接法では変法 Kirchner 寒天培地, Kirchner 寒天培地が適当と思われるし, 間接法では Kirchner 寒天培地が適当のように思われた。従来の成績から KM 投与前の検査では, 直接法と間接法とでは大差がないものと推定されたが, 今後の研究の基ともなることと思ひ, 同一患者について, 日を異にして直接法, 間接法を実施した 8 例の成績を表 5 にあげてみた。方法は直接法では 4% 水酸化ナトリウムで処理したものは変法 Kirchner 寒天培地に, 中和したものは Kirchner 寒天培地に, 間接法では 10⁻³mg を Kirchner 寒天培地に接種した。

成績は予期されたように大差はない。すなわち(4), (5) では全く差がない。その他のものではいずれも差があるが, あつたとしても 1 γ か 1 γ 以下という程度の差にすぎない。直接法, あるいは間接法を同一の患者で 2 回実施したのものについて比較してみると, この程度の差がある。したがつてこの程度の差は誤差の範囲と考へてもよいのではなからうか。

IV 総括および考察

1% 小川培地に保存菌株あるいは分離して間もない菌株を接種した実験では, 比較的耐性値が高く, しかも接種菌量に比例して耐性値が高くでる傾向がある。このことは, 第 1 報の直接法における 1% 小川培地と全く同様であつて, 直接法における 1% 小川培地の欠点はそのまま間接法にあてはまるといえる。1% 小川培地では KM の耐性値が高くでることは, 加熱による力価の減退でないことはわかつたが, このことは後で梅沢²⁾によつて卵黄による吸着であると説明されている。以上のことで間接法においても鶏卵培地を耐性検査に用いることは妥当ではない。Kirchner 寒天培地における耐性

値は H₃₇Rv 株, 高野株はともに接種菌量が多くとも 1 γ どりまで, 厚生省の検査指針で指示している 10⁻³ mg の接種では 1 γ 以下である。H₂ 株は H₃₇Rv 株, 高野株とは異なり, 10⁻¹mg の接種では 16 γ の耐性を示し, 接種菌量の減少とともに耐性値は急速に 1 γ にまで低下している。これは特殊の例であつて, あるいは KM 自然耐性菌とよんでもよいかもしれない。このような特異の菌株がどの程度に存在するものかと思ひ, 50 例の新鮮分離株で検査してみたがこれに類する菌株はみつかつていない。今後さらに多数例について検査する必要があるが, これは今後の問題として, さしあつては間接法に Kirchner 寒天培地を用いることはよいと思ふ。これは第 1 報における直接法においてもほぼ同様の成績を得たことでも妥当のように思われる。次に KM の投与前の耐性の検査は直接法と間接法とではほとんど差がないが, しかし投与後の成績についてはさらに検討する必要があるし, 間接法自身についても同様に KM 投与後の菌株について検討する必要がある。

V 結 論

KM に感性であると思われる保存菌株, および KM を投与したことの無い患者喀痰よりの新鮮分離菌株について, 間接法の耐性の検査方法について検討するとともに, 直接法と間接法を比較して次のような成績を得た。

1) Kirchner 寒天培地では, H₂ 株を除けば保存菌株でも新鮮分離菌株でも 100 γ, 10 γ の耐性のものは 1 例もなく, 大部分は 1 γ 以下であつて, 1 γ のものはわずかである。このように耐性値が低く, しかも接種菌量の多少によつても耐性値に変化はない。したがつて間接法においては, さしあつては Kirchner 寒天培地を用いることは妥当である。H₂ 株は菌量が多いと耐性値が高くでるが, この菌株に類する結核菌株の研究は今後の問題である。

2) 1% 小川培地では KM を凝固滅菌の前に混入しても, でき上つた培地に流しこんで作つた培地を使用しても, 耐性値は Kirchner 寒天培地に比して高い。しかも接種菌量の多少による耐性値の差が著明である。したがつて 1% 小川培地を間接法に用いることは妥当でない。このように耐性値の高いのは加熱による力価の減退によるのではない。

3) 直接法と間接法を同一の患者について実施比較してみるとほとんど差がない。

文 献

- 1) 小川・沢井・島田: 結核, 33: 749, 昭33.
- 2) 梅沢: 文部省科学研究費「化学療法による結核治療機構の研究」7 班, 昭和33年 5 月報告.