

# Kanamycin 耐性結核菌の検査について

## 第4報 血清の代りに全血液を使用した変法Ⅲ Kirchner 寒天培地, Kirchner 寒天培地による実験

小川 辰次・沢井 武・島田 英彦

北里研究所附属病院 (院長 宗武藤)

受付 昭和34年5月27日

### I 緒 論

われわれは Kanamycin (以下 KM と略) 耐性結核菌の検査には、変法Ⅲ Kirchner 寒天培地, Kirchner 寒天培地が使用できることを発表した<sup>1)</sup>。しかし、これらの培地に混入される血清は入手できないところが多い。われわれ<sup>2)</sup>はこれらの培地の血清の代りに血液銀行の保存全血液を使用してもほぼ同等の発育を示すのを見ていて、保存全血液なら手術をやっている病院ではたいてい手持ちがあると思われるし、小さな検査室でも1本の保存血液を冷蔵庫に保存しておけば適宜使用することができる。したがって保存血液を混入する培地なら作ることが容易である。そこで今回は耐性の検査をするのにこのように保存全血液を使用した培地が使用できるかどうかを検討したので報告する。

### II 実験方法

#### 1. 可検材料

喀痰であつて、主として塗抹陽性のものを選んだ。患者は KM の投与を受けていないものが大部分であるが、一部 KM を含む化学療法を受けているもの、あるいは KM の投与後のものもある。型のごとく喀痰の採取前日は化学療法薬の投与を中止した。

#### 2. 培地

変法Ⅲ Kirchner 寒天培地および Kirchner 寒天培地の血清の代りに、血液銀行の保存全血液を 10% の割合に加えてよくかきまぜ、KM を培地 1 cc について 1, 2, 4, 8%, あるいは 1, 10, 100% のように混入し、中試験管に 5 cc 宛分注して斜面に固めた。なお対照として馬血清の混入した培地を同時に作った。そしてこれらの濃度に混入された培地と薬剤の混入されない培地 1 本を加えたものを 1 組の耐性検査培地として使用した。

#### 3. 接種方法

イ. 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地に接種するとき: 4% NaOH を 5 cc 宛中試験管に分注して、その中に喀痰を約 1 cc 入れて手でよく振つて均等化しその 0.1 cc

宛を接種した。

ロ. Kirchner 寒天培地に接種するとき: フェノールレッドを 0.0004% に混入した 4% NaOH 液 5 cc をとつて喀痰約 1 cc を入れてよく均等化し、さらに 8% HCl を 1 滴宛加えて中和し、中和した液を 0.1 cc 宛接種した。

ハ. 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地と Kirchner 寒天培地に同時に接種するとき: フェノールレッドを 0.0004% に混入した 4% NaOH 液を 5 cc 宛中試験管に分注し、これに喀痰を約 1 cc 入れて均等化する。均等化したら滅菌中試験管に 2 cc 宛分注して、一方は 8% HCl で中和し、他の一方は中和に要した 8% HCl の量だけの 4% NaOH を加えて両方の試験管の喀痰液を同量とし、中和したものは Kirchner 寒天培地 (血清および全血液入り) に 4% NaOH 処理のものは変法Ⅲ Kirchner 寒天培地 (血清および全血液入り) に 0.1 cc 宛を培養した。

培養後は型のごとく全斜面をうるおし、斜面台に 2~3 日ねかして、液のほぼ乾燥したところで、ゴムのキャップにかえ、たてて 37°C の孵卵器に培養を継続した。

#### 4. 判定

大部分は 4 週で判定した。そして KM 混入の最高の濃度に発育したところをもつて耐性値とした。したがって耐性値には完全耐性も不完全耐性も含まれるわけである。

### III 成 績

#### 1. KM 投与前の喀痰を用いた実験

使用培地は、変法Ⅲ Kirchner 寒天培地, Kirchner 寒天培地で作った耐性検査培地で、KM の混入濃度は 1, 2, 4, 8% である。

表 1 は、同一材料について全血液を加えた変法Ⅲ Kirchner 寒天培地と、Kirchner 寒天培地および対照として血清を加えた培地の 4 種類の培地を使用した 3 例の症例を示したものである。患者 (1) ではこの 4 種の

表 1 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地（血清および全血液混入）と Kirchner 寒天培地（血清および全血液混入）の 4 種の培地を使用した症例の一部の成績

患者番号 ・ガフキー 番号	培地・組成 濃度 ( $\gamma/cc$ )	変法Ⅲ Kirchner 寒天培地		Kirchner 寒天培地	
		血清	全血液	血清	全血液
(1) G. 2号	8 $\gamma$	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	0	≡	≡	≡	≡
(2) G. 4号	8 $\gamma$	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	2	-	80	-	5
	1	≡	≡	-	44
	0	≡	≡	≡	≡
(3) G. 6号	8 $\gamma$	-	-	-	-
	4	-	2	-	≡
	2	≡	≡	≡	≡
	1	≡	≡	≡	≡
	0	≡	≡	≡	≡

注：表中の記載は集落数を示すがその記号は次のようである  
 ≡……斜面一杯に菌膜のように發育  
 ≡……斜面一杯にはえているが個々の集落が孤立しているもの  
 ≡……斜面の 2/3 程度に發育しているもの  
 ≡……斜面の 1/2 程度に發育しているもの  
 ≡……集落が 1/2 程度以下のもの  
 数字は集落数を示す  
 - 陰性を示す

表 2 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地における血清と全血液混入培地の耐性値の相関関係

	血清混入の変法Ⅲ Kirchner 寒天培地					
	0	1 $\gamma$	2 $\gamma$	4 $\gamma$	8 $\gamma$	合計
全寒 血液 培地 混入 の変 法Ⅲ Kirchner	0	16	1			17
	1 $\gamma$	7	10			17
	2 $\gamma$	2	2	1		5
	4 $\gamma$			1		1
	8 $\gamma$					0
	合計	25	13	2	0	0

注：1) 表中の数字は例数を示す  
 2) □の中は一致例を示す

培地の間には、耐性値の差はなく、(2) および (3) では全血液の混入された培地はいずれも 1 段あるいは 2 段高い耐性値を示している。

次に変法Ⅲ Kirchner 寒天培地において、血清と全血液の混入した 2 種の培地を使用して比較した 40 例の相関成績を表 2 に示した。

すなわち同じ耐性値を示したものは 27 例 (67.5%) であつて、不一致の例をみると血清混入の培地が全血液の入った培地よりも耐性値の高いのは 1 例のみであるのに反して、全血液の混入した培地が耐性値の高いのは 12 例 (30%) である。

表 3 Kirchner 寒天培地における血清と全血液混入培地の耐性値の相関関係

	血清混入の Kirchner 寒天培地					
	0	1 $\gamma$	2 $\gamma$	4 $\gamma$	8 $\gamma$	合計
全血 液混 入の Kirchner 寒天 培地	0	23				23
	1 $\gamma$	3	2	1		6
	2 $\gamma$	1		1		2
	4 $\gamma$			1		1
	8 $\gamma$					0
	合計	27	2	3	0	0

注：表 2 に同じ

表 4 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地（血清および全血液混入）と Kirchner 寒天培地（血清および全血液混入）の 4 種の培地を使用した全例の成績

混入 濃度 ( $\gamma/cc$ )	変法Ⅲ Kirchner 寒天培地		Kirchner 寒天培地	
	血清	全血液	血清	全血液
8 $\gamma$	0	0	0	0
4	0	1	0	1
2	2	5	2	1
1	6	11	1	5
0	16	9	23	19
合計	26	26	26	26

注：表 2 に同じ

次に Kirchner 寒天培地においての 32 例の成績を表 3 に示した。

すなわち同じ値を示したのは 26 例 (81.3%) であつて、血清混入の培地のほうが耐性値の高いものは 1 例のみであつて、全血液混入の培地が耐性値の高いものは 5 例 (15.6%) である。

次に 4 種類の培地を同時に使用した 26 例についての成績を表 4 に示した。

1  $\gamma$  以上の耐性を示した例数をみると、変法Ⅲ Kir-

表5 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地に血清と全血液を混入して作った耐性検査培地に投与前、投与中、投与後の喀痰を接種して比較した成績

患者番号	培地・濃度 (γ/cc)	投与前		患者番号	培地・濃度 (γ/cc)	投与前	投与中			患者番号	培地・濃度 (γ/cc)	投与前	投与中	投与中後				
		53g	77g				24g	32g	71g					33g	3カ月	4カ月		
																	g	g
(1)	血清	100γ	-	##	(2)	血清	100γ	-	-	##	(3)	血清	100γ	-	##	##	2	
		10	-	-			##	##	##	##			##	##				
	1	##	52	##		##	##	##	##	##		##	##	##	##	##	##	##
	0	##	##	##		##	##	##	##	##		##	##	##	##	##	##	##
(1)	全血液	100γ	-	-	(2)	全血液	100γ	-	-	##	2	(3)	全血液	100γ	-	##	1	1
		10	-	8			##	##	##	##	##			##	##	##	##	##
	1	##	##	##		##	##	##	##	##	##		##	##	##	##	##	##
	0	##	##	##		##	##	##	##	##	##		##	##	##	##	##	##

注: 1) 投与中の下欄に記したg数はKMの用量である  
 2) 表中の記載は集落数を示すがその記号は表1に同じである

chner 寒天培地の全血液を混入した培地が 65.4% であつてもつとも多く、次に Kirchner 寒天培地の全血液を混入した培地の 36.8%, 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地の血清を混入した培地の 30.8% であつて、Kirchner 寒天培地の血清混入の培地では 11.5% であつてもつとも少ない。

以上の成績から全血液を混入した培地と血清を混入した培地とでは、変法Ⅲ Kirchner 寒天では 70%, Kirchner 寒天では 80% において一致するが、不一致例をみると全血液の入つた培地のほうが高い耐性値を示すものが多く、とくにその傾向は変法Ⅲ Kirchner 寒天培地において著明である。

2. KM 投与前、投与中、投与後の喀痰による成績  
 使用した培地は変法Ⅲ Kirchner 寒天培地であつて、KM の混入量は 1, 10, 100 γ である。

成績は表 5 に示すように、患者(1)と(2)は投与前と投与中、患者(3)は投与前、投与中、投与後のものである。これらの患者は KM と同時に、PAS や INH を使用している。KM は週 2 回、1g 宛あるいは週 2 回 2g 宛使用しているが、対象がいずれも重症肺結核症であるせいか KM 投与後はかなり迅速に耐性値の上昇をみているが、1, 10, 100 γ のように 10 倍宛の混入濃度では全血液と血清の混入培地とでは、耐性値のうえにほとんど差を認めない。なお、さらに 12 例の KM 使用の喀痰の菌の耐性値をみると 10 例 (83.3%) が一致したが、残りの 2 例は全血液混入培地が 1 段高い耐性値を示した。

IV 総括および考察

血清の代りに保存全血液を用いた変法Ⅲ Kirchner 寒天培地および Kirchner 寒天培地で KM 投与前の喀痰中の結核菌の耐性値をみると、70~80% は一致する。不

一致の例をみると、大部分は全血液を混入した培地が高い耐性値を示している。しかしもつとも高い耐性値のもので 4 γ どりであるから、通常検査のように、混入の濃度を 1, 10, 100 γ にすると、1 γ あるいは 1 γ 以下を示すから、全血液を使用した培地と血清を使用した培地とではほぼ同じ耐性値を示すことになる。

以上のようなことから保存全血液を血清の代用にしても KM の耐性結核菌の検査は可能と思われる。このことは Kirchner 寒天培地による間接法においてもあてはまるものと推定される。なお保存全血液は血清などと違って、コッホ釜やオートクレーフよりとりだして間もない高温の寒天に加えても、結核菌の発育および耐性値は 55°C ~ 60°C に温度を下げて加えた場合と差はない。したがつてこのようにすれば寒天培地を作る場合の煩雑さをある程度除くことができることが分かつた。

これを要するに、全血液を混入した培地は血清を加えた培地に比して作り方が容易であり、全血液そのものも簡単に入手できるし、しかも発育や耐性値は血清を加えた培地と差がない。伊藤<sup>3)</sup>らは Kanamycin の耐性結核菌の検査に Tarshis の全血液を加えた培地を使用しているが、この培地でなければいけないかどうかは別問題としてもわれわれの実験成績から推定すれば Tarshis の培地は使用できるかもしれない。ただし血液を混入した培地は血清混入の培地に比して、雑菌の侵入が多少多いようであるから、慎重に培養を実施しなければならない。

V 結 論

変法Ⅲ Kirchner 寒天培地および Kirchner 寒天培地の血清の代りに血液銀行の保存全血液を 10% に加えた培地が、KM 耐性結核菌の検査に使用できるかどうかを血清の入つた培地を対照として直接法により比較

し次のような成績を得た。

- 1) 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地（全血液および血清混入）Kirchner 寒天培地（全血液および血清混入）に KM を 1, 2, 4, 8  $\gamma$  と混入して作った耐性検査培地に、KM未投与の患者の喀痰を用いて、全血液を加えた培地と血清を加えた培地との耐性値を比較すると 70~80% において一致する。不一致の例では全血液を加えた培地が多少高い耐性を示すが 4  $\gamma$  どまりである。
- 2) 変法Ⅲ Kirchner 寒天培地（全血液および血清混入）に KM を 1, 10, 100  $\gamma$  に入れて作った耐性検査培地に KM 投与前, 投与中, 投与後の喀痰により全血液を混入した培地と血清を混入した培地の耐性値を比較

するとほとんど一致する。

- 3) 以上の成績から血清の代りに全血液を使用した培地でも KM 耐性結核菌の検査には使用できそうに思われる。

#### 文 献

- 1) 小川・沢井・島田：結核, 33:749, 昭33.
- 2) 小川・島田・遠山・本庄：日本細菌学雑誌に投稿中.
- 3) 伊藤・大川・杉山・亀崎・綾部：結核, 34 (特別号):27, 昭34.