

寒天平板による結核菌の迅速耐性検査法

第1報 迅速法の手技に関する基礎実験

齊 藤 直 蔵

北里研究所附属病院 (指導 小川辰次部長)

受付 昭和34年3月9日

I 緒 言

結核の治療に抗結核薬に対する耐性検査が必要なことはいうまでもない。現行標準法として広く使われている小川培地による方法では、直接法でも4週以上、間接法では8週以上の期間を必要とする。このように結果が分るまでに時がかかりすぎることは、適切な化学療法を行ううえに困却することが多い。

そこで、従来いろいろの迅速法が諸先進により試みられているが、大別すると Wright¹⁾ の Slide Cell Culture 法^{2)~5)}、Pryce⁶⁾ や Berry, Lowry ら⁷⁾ の Slide Culture 法^{8)~17)}、植田ら¹⁸⁾ の遠心管内培養法に基礎をおいたもの^{19)~21)}、小川 (辰次)²²⁾ の変法重層培地法、還元色素法^{23)~25)}、濾紙法²⁶⁾ を応用したもの²⁷⁾ 等々多々あるが、これらの方法はいずれも一長一短があり同一に論ずることはできないが、遠沈、染色等の手技の面倒なものが多く、濾紙法を除いては迅速判定後は培養を継続できないことは大きな欠点と思われる。

寒天平板に菌液あるいは喀痰を接種し早期に顕微鏡的集落を平板の裏から弱拡大で鏡検することは、Middlebrook ら^{28) 29)}、Dubos ら³⁰⁾、Roberts ら³¹⁾ が試みているが、高橋³²⁾ も氏のアルブミン寒天に菌液を接種し、間接法による迅速耐性検査法を発表している。しかし迅速に耐性を知りたい場合どうしても喀痰を直接に接種できる直接法が便利であり、耐性本来の意味からも直接法の方がより妥当と思われる。それで私はまず Felsen^{33) 34)} の4区画のシャーレに分注した寒天平板に喀痰を培養して、早期に顕微鏡的集落をみる方法を考案し、さらに菌液についても同様の実験を行い、ほぼ目的を達することができたので報告する。

II 実験方法

1) 培地

イ) 変法Ⅲキルヒナー寒天培地 (小川ら)^{35) 36)}

この培地は、本来カナマイシンの直接耐性検査用に考案されたもので、性能はほぼ3%小川培地に匹敵するものである。斜面のときは寒天は2%であるが、平板

では1.5%とした。

処 方

第一磷酸カリウム	1.0 g
第二磷酸ナトリウム	0.3 g
硫酸マグネシウム	0.06 g
クエン酸ナトリウム	0.25 g
アスパラギン	0.5 g
グリセリン	1.5 cc
0.1% マラカイト緑	0.25 cc
Bactoagar (Difco)	1.5 g
蒸溜水	100.0 cc

以上を溶解、コッホ釜で2時間滅菌し、約50~60°Cに冷えたところで馬血清を10%に加え、2.5cc宛4分画シャーレの1区画に分注する。pHは6.1~6.3で4% NaOH 0.05cc加えたのちはpH 6.7~7.0となる。薬剤を含ませるときは、加熱により力価の減少しないもの(PAS, INH)は滅菌前に、加熱により力価の減少するもの(SM)は分注前にあらかじめ調製した所要量を加えた。

ロ) キルヒナー寒天培地³⁷⁾

これは原著ではイ)の変法Ⅲキルヒナー寒天培地(以下変法Ⅲ培地と略)の第一磷酸カリが0.4g、グリセリンが2.0ccに変わり、マラカイト緑が除かれるだけでその他は全く変法Ⅲ培地と同様であるが、それに変法Ⅲ培地の場合と同量のマラカイト緑を混入して、主に菌液を接種する場合に用いた。

ハ) 1%³⁸⁾ および3%小川培地³⁹⁾

かたのごとく作り1%小川培地は菌液を接種する場合、3%小川培地は喀痰を接種する場合に使い、それぞれキルヒナー寒天培地および変法Ⅲ培地の対照として用いた。

2) 培養の方法

イ) 菌液

菌液は、磨砕コルベンによるいわゆる手振り法を用い蒸溜水で1mg/ccとし、これを基本として種々実験した。

ロ) 喀痰

まず4% NaOHで喀痰を5~10倍に稀釈し、十分

に均等化したものを基本として種々実験した。

3) 判定の方法

イ) 顕微鏡的集落

7日後に平板の裏から弱拡大(50倍)で鏡検し、培地の表面に発育している顕微鏡的集落(コード)をみて判定した。できるだけ培地の全面をみるようにして、少なくとも10視野以上を平均して、その表示は

- +.....数視野中に平均1コ, 非常に少数のときは全視野をみてその数を記した。
- ++.....各視野に平均 1~3コ
- +++.....各視野に平均 4~12コ
- ++++.....各視野に平均 13~50コ
- +++++.....各視野に平均 51コ~無数

すなわち Gaffky 番号あるいは Brown 番号にほぼ準じて顕微鏡的集落数を記載した。

ロ) 肉眼的集落

寒天平板および小川培地とも4~5週で判定し、肉眼的集落数の表示は次のようにした。

- +.....集落の数えられる場合でおよそ200コくらいまでで、その数を記した。
- ++.....培地に生えた集落を全部あわせて、培地全面積の約1/2くらいになる場合。
- +++.....培地に生えた集落を全部あわせて、培地全面積の約1/3くらいになる場合。
- ++++.....培地全面に発育しているが、個々の集落は孤立している場合。
- +++++.....培地全面に融合した菌苔を生ずる場合。

III 実験成績

A. 方法決定のための基礎実験

1) 接種方法および接種後の培養

表1 接種方法の検討

患者番号・ ガフキー番号	接種方法		
	A	B	C
	4% NaOH 処理, その まま0.05cc 接種	4% NaOH 処理, 蒸溜 水で2倍に 希釈, 0.1 cc 接種	4% NaOH 処理, 蒸溜 水で4倍に 希釈, 0.2 cc 接種
(1) G 3号	++ 40μ	+++ 40μ	+++ 40μ
(2) G 1号	++ 60μ	++ 60μ	+++ 60μ
(3) G 7号	+++ 54μ	+++ 54μ	+++ 60μ
(4) G 7号	+++ 53μ	+++ 60μ	+++ 50μ
(5) G 6号	+++ 54μ	+++ 54μ	+++ 54μ
(6) G 7号	+ 23μ	+ 20μ	++ 25μ
(7) G 5号	+ 60μ	++ 60μ	++ 60μ

注: 欄中の +~+++は顕微鏡的集落数を, また数字はコードの長さを示す

変法III培地は本来培地 5 cc に対して, 4% NaOH で前処理した喀痰を 0.1 cc 接種するように作られた培地であるが, 迅速法の場合, シャーレの1区画は 2.5 cc 宛分注されているので, 4% NaOH 処理の喀痰を 0.05 cc 接種すればよいわけである(表1, A)。しかし, 0.05 cc では培地の1区画全面をうるおわずには少なすぎる。そこで4% NaOH 処理の喀痰を滅菌蒸留水で2倍に希釈してその0.1 cc を接種した場合(表1, B)と, 4倍に希釈してその0.2 cc 接種した場合(表1, C)を比較してみた。すると表1のように顕微鏡的集落数およびコードの大きさはA, B, C3つの処理法の間に著明の差はないが, (2)(3)(6)の例のようにCの方法すなわち0.2 cc 接種した場合, 顕微鏡的集落数もやや多く, コードも長くきれいであつたし, A, Bの場合は接種量が少ないために培地に均等にコードがひろがらないこともあるので, 0.2 cc 接種がもつとも適当と思われた。なおこの場合 NaOH の濃度は結局1%となるわけであるが, はじめから1% NaOH で処理するのは, 均等化および雑菌混入の点で難点がある。

表2 菌液を階段希釈した実験

菌株	観察日 稀釈 倍数	培地		1% 小川培地
		キルヒナー寒天培地	小川培地	
		7日 (顕微鏡的)	28日 (肉眼的)	28日 (肉眼的)
H ₃₇ Rv 株	10 ¹	+++	+++	+++
	10 ²	+++	+++	+++
	10 ³	+++	+++	+++
	10 ⁴	+	+++	+++
喀痰よりの 新鮮分離 菌株 (1)	10 ¹	++	+++	+++
	10 ²	++	+++	+++
	10 ³	+	++	++
	10 ⁴	-	120	59
喀痰よりの 新鮮分離 菌株 (2)	10 ¹	++	+++	+++
	10 ²	+	+++	+++
	10 ³	10	130	137
	10 ⁴	-	25	16
喀痰よりの 新鮮分離 菌株 (3)	10 ¹	++	+++	+++
	10 ²	+	+++	+++
	10 ³	3	110	103
	10 ⁴	-	25	15

次に菌液を接種する場合、どのくらいの稀釈のところ
が迅速判定のさい適当かを、磨砕コルベンによる手振り
法で実験した。保存菌株および新鮮分離菌株を使い、蒸
溜水で 1 mg/cc の菌液を作りそれを階段稀釈し、シャ
ーレの1区画に 0.2 cc 宛接種したが、表2のように保
存菌株以外は 10³ 倍稀釈のものは、迅速法では顕微鏡
的集落数が少なすぎるし、10¹ 倍稀釈では、濃すぎて鏡
検のさい視野が汚くなるので、結局10²倍稀釈 (0.1mg/
cc のものを 0.2 cc 接種) のところが適当であると認め
た。なお手振り法では多少菌塊が混じることもときどき
あるが、判定に困ることは普通認められない。

次に、接種した培地を孵卵器中で乾燥しないように培
養を続けるために、初期の実験ではシャーレをセロテー
プあるいはビニールテープで閉じたりまた硝子の大標本
瓶にそのままシャーレを入れたりあるいは標本瓶の底に
水を入れておき瓶中が湿潤に保たれるよう等いろいろ試
みたが、いずれも乾燥したりあるいはかびによる汚染が
多く実用的でないので、ポリエチレンの袋^{29) 40)} を用
いた。すなわち、接種 1~2 日後に培地表面のほぼ乾い
たところで、シャーレを 4 ないし 8 枚一緒に、ポリエ
チレンの袋に逆さに置きゴムでしばり培養を続けたが、
この方法では汚染も少なく、4~5 週後まで培地も乾燥
せず保存でき、集落の発育もよい。

表 3 変法Ⅲキルヒナー寒天培地とキルヒナー
寒天培地の比較 (4% NaOH 処理)

患者番号・ ガフキー番号	培地		
	稀釈倍数	変法Ⅲ キルヒナー 寒天	
(1) G 6 号	10 ¹	冊	冊
	10 ²	冊	冊
	10 ³	冊	冊
	10 ⁴	冊	冊
(2) G 2 号	10 ¹	冊	冊
	10 ²	冊	冊
	10 ³	冊	冊
	10 ⁴	冊	冊
(3) G 5 号	10 ¹	冊	冊
	10 ²	冊	冊
	10 ³	冊	冊
	10 ⁴	冊	冊
(4) G 3 号	10 ¹	冊	冊
	10 ²	冊	冊
	10 ³	冊	冊
	10 ⁴	冊	冊

注：+~冊は顕微鏡的集落数を示し、数字は全視野みたコード数を示す

2) 迅速法の培地

イ) 4 % NaOH で処理したものを接種する培地の決
定

迅速法に使う寒天平板は少なくとも発育が従来の培地
に匹敵し、また鏡検判定するので透明でなくてはなら
ない。また喀痰をなるべく簡単な前処理で接種でき、作り
方も簡単なものが望ましい。それでキルヒナー寒天培地
と変法Ⅲ培地をえらび、迅速法で 4 % NaOH 処理の
場合、両培地でどのくらい差があるかを比較してみた。
塗抹陽性の喀痰を階段稀釈して接種し、7 日目と比較す
ると、表 3 のように変法Ⅲ培地の方が発育がよかつた。

ロ) 使用の寒天、血清の代用品としての血漿、全血、
および酸化還元色素剤の添加

ア) 混入する寒天

表 4 寒天の比較

患者番号・ ガフキー 番号	製品名 寒天の 混入濃度 稀釈 倍数	Bacto- agar (Difco)	A寒天 (邦製)	B寒天 (邦製)	
		1.5 %	1.5 %	1.5 %	1.0 %
(1) G 5 号	10 ³	+	(+)	+	(+)
	10 ⁴	+	(78)	+	(74)
(2) G 2 号	10 ¹	+	(6)	+	(6)
	10 ²	-	(1)	-	(0)
(3) G 6 号	10 ³	+	(+)	+	(+)
	10 ⁴	+	(75)	+	(96)
(4) G 6 号	10 ³	+	(80)	+	(62)
	10 ⁴	-	(4)	-	(3)

注：1) () 外は迅速法による集落数
() 内は 5 週後の肉眼的集落数を示す
2) * は微小集落を含むことを示す

寒天の濃度は Bacto-agar (Difco) では、斜面では
2 % であるが、平板の場合はさらに濃度を低くしても
使いうるものと思われたので、2.0 %、1.5 %、1.0%、
0.5 % と濃度を変え実験した結果、1.5 % が発育およ
び培地の固さから適当であると認めた。実験初期に本邦
製の寒天を 2, 3 使ってみたが、いずれも培地が不透明
でまた発育も悪かつたので、もつぱら Difco の Bacto-
agar を用いてきたが、最近本邦の製品でも 1, 2 Bacto-
agar (Difco) に匹敵する脱脂精製寒天ができてい
る。それで変法Ⅲ培地で Difco の寒天を標準として比較し
てみると表 4 のように、Difco のものとはほぼ匹敵する

成績であつた。なお A, B の寒天はともに固まりやすいので 1% でもよい。(2)(4)の例では 4~5 週目にごく小さい集落が多くみられた (*)。

b) 血清の代りとしての血漿あるいは全血の使用

血清が入手できない場合の代用品として血漿(血液銀行の保存血を遠沈した上清)が利用できないものかと考え、血漿を 10% に加えた平板を作つたが、培地がやや不透明となりまた発育も血清の場合に比べてやや劣り、コードの作り方もきれいではなかつた。また血清の代りに全血を 1%, 3%, 5%, 10% に加えて作つた平板では、3% 以上の濃度では培地が濁り不透明なので鏡検のさい顕微鏡的集落がみえず 1% でようやくみえるが、10% 血清添加に比べて発育は劣り、血球が邪魔となりコードの判定がむずかしく実際には使用できない。

表 5 酸化還元色素剤の影響



患者番号・ ガフキー 番号		混入濃度 γ/cc				
		0	25	50	75	100
N.T.C.	(1)G 7号	卍	卍	卍	卍	
	(2)G 8号	卍	卍	卍	卍	
	(3)G 2号	卍	卍	卍	+	
T.T.C.	(1)G 7号	卍 _{50μ}		-	-	-
	(2)G 5号	卍 _{25μ}		卍 _{25μ}	卍 _{20μ}	+ _{20μ}
	(3)G 7号	卍 _{50μ}		卍 _{20μ}	卍 _{18μ}	+ _{18μ}
	(4)G 6号	+ _{40μ}		-	-	-

注: 1) 欄中の数字はコードの長さを示す
2) +~卍は顕微鏡的集落数を示す

c) 酸化還元色素剤の添加

7 日目に判定するとき、あらかじめ酸化還元色素を培地中に含ませておき、顕微鏡的集落が着色してくれば判定に便利であろうと思ひ、General Chemical 社製の Neotetrazolium Chloride (N.T.C.) を変法Ⅲ培地で 25 γ/cc , 50 γ/cc , 75 γ/cc 宛含ませて実験したが、表 5 のように、対照に比べてこの濃度では発育抑制は軽度であるが、7 日の判定では紫色の着色は全く認められなかつた。また邦製の Triphenyltetrazolium Chloride (T.T.C.) では、キルヒナー寒天培地で 50 γ/cc , 75 γ/cc , 100 γ/cc と含ませて実験したが、表 5 のように発育抑制もつよく、また紅色着色は全く認められず、したがつてこの両者とも迅速法では実際には使えないことが分つた。

図 1 顕微鏡的集落の発育経過

培養日数	3-4	5-7	7-9	9-11
コードの長さ、 あるいは 集落の長径	20 μ	30~40 μ	40~50 μ	60~90 μ
形状	棒状、鈎状 — ^	屈曲 ~ ~	纏絡 	円盤状 

3) 顕微鏡的集落の発育経過と判定方法

塗抹陽性の喀痰を使い、変法Ⅲ培地上の発育経過を 3 日目から 9 日まで 50 倍で観察した。一般には図 1 のように、はじめは棒状あるいは鈎状のコードがみえるが、それが屈曲した蛇のようなコードとなり、さらに発育が進むとそれが、からみあつた状態となり丸くみえるようになり、その後四方に大きくなり円盤状の集落となるがこの時期になると肉眼でも平板の裏から微小集落としてみえることもある。また円盤状となつても、辺縁をみると凹凸がありコード構造がみられるので他の雑菌とは鑑別できる。

次に表 6 にみるように、発育がよく集落数の多いときは、(2)(4)の例のように 3 日目にすでに棒状あるいは鈎状のコードを認めることもある。5 日目でみると 12 例中 10 例 (83%) が陽性となり、7 日目には全例陽性となつている。また纏絡したコードは () 内に示したが、早いものは 6 日目よりあらわれ、その後増加し、9 日目になると、定型的なコードの状態のものは少なくなりこの纏絡して丸くなつた顕微鏡的集落が非常に多くなる。(2)(3)(4)の例のように発育のよく集落数の多い場合は、9 日目に平板の裏からみると肉眼的にも霜のように微小集落がみえる。

以上のことから 7 日目に判定すれば菌数の少ないときも検出しやすいし、またコードも判定しやすいので 7 日目に判定することにした。

なお、位相差顕微鏡も使つてみたが、とくに判定しやすくなることもないので普通の顕微鏡で十分と思われる。また非病原性の抗酸性菌はコード形成がほとんどないか、あつたとしても結核菌に比べて粗であるので鑑別できる。

B. 迅速法による検出限界と、SM, P.A.S., I.N.H. に対する保存結核菌株の感受性

小川培地あるいは寒天平板での肉眼的集落の大体何コくらいのところから迅速法で陽性にあらわれるかを、喀痰あるいは菌液 (H₃₇Rv 株、黒野株、H₂ 株等の保存菌株と、新鮮分離菌株) で階段稀釈して実験した。その喀痰および菌液の 1 例宛を表 7 に示した。このように実験した喀痰 6 例、菌株 12 例について迅速法で陽性を示す最高稀釈と、陰性を示す最低稀釈と同じ稀釈のところ、3% あるいは 1% 小川培地に接種し発育し

表 6 顕微鏡的集落の発育経過

患者番号 ・ガフキー 番号	培養日数					
	3	4	5	6	7	9
(1) G 9号	-	++ 20 μ	++ 32 μ	+++ 36 μ	+++ 40 μ (+) 30 μ	+++ 45 μ (+) 45 μ
(2) G 7号	+ 20 μ	+++ 30 μ	+++ 45 μ	+++ 45 μ (+)	+++ 45 μ (+) 60 μ	+++ 45 μ (+) 90 μ
(3) G 7号	-	+++ 20 μ	+++ 36 μ	+++ 50 μ (+)	+++ 54 μ (+) 54 μ	+++ 54 μ (+) 60 μ
(4) G 7号	++ 20 μ	+++ 36 μ	+++ 42 μ	+++ 54 μ (+)	+++ 54 μ (+) 54 μ	+++ 54 μ (+) 90 μ
(5) G 5号	-	-	+ 25 μ	+ 30 μ	+ 36 μ (+) 36 μ	+ 36 μ (+) 40 μ
(6) G 5号	-	++ 25 μ	++ 40 μ	++ 40 μ	++ 40 μ	++ 40 μ
(7) G 5号	-	-	++ 25 μ	++ 40 μ	+++ 45 μ (+) 40 μ	+++ 45 μ (+) 50 μ
(8) G 4号	-	-	++ 30 μ	+++ 54 μ (+)	+++ 54 μ (+) 54 μ	+++ 54 μ (+) 60 μ
(9) G 3号	-	-	-	+ 36 μ	+ 36 μ	+ 36 μ
(10) G 3号	-	-	++ 30 μ	++ 45 μ	+ 54 μ (+) 60 μ	+ 54 μ (+) 60 μ
(11) G 2号	-	-	+++ 26 μ	+++ 36 μ	+++ 36 μ	+++ 40 μ (+) 40 μ
(12) G 2号	-	-	-	-	+ 30 μ	+ 40 μ
陽性率 (平均 コード長)	17% (20 μ)	42% (26 μ)	85% (34 μ)	92% (42 μ)	100% (44 μ)	100% (45 μ)

注: 1) + ~ +++ はコード数を示す
() 内は纏絡した顕微鏡的集落数を示す
2) 欄中の数字はコードの長さ, 纏絡したときは長径を示す
3) * は肉眼でもみえることを示す

た集落数の平均を比較し, また寒天平板ではさらに 28 日後に同じ稀釈のところを肉眼的にみて発育した集落数を平均したのが表 8 である。すなわち喀痰の場合 3% 小川培地で 7 コ以下, 変法 III 培地で 20 コ以下は迅速法ではみえないが, 3% 小川培地で 53 コ, 変法 III 培地で 77 コ以上では陽性にあらわれる。

菌液の場合でも, 喀痰と大差はなかつた。

次に人型結核保存菌株 (H₃₇Rv 株, 黒野株, H₂ 株) を使つて, SM, PAS, INH に対する感受性を 7 日目で見ると表 9 のように, SM では H₃₇Rv 株, 黒野株はキルヒナー寒天培地で 1 γ/cc , H₂ 株はキルヒナー寒天培地および変法 III 培地でともに 2 γ/cc で発育が阻止された。PAS では, H₃₇Rv 株, 黒野株はキルヒナー寒天培地で 0.1 γ/cc , H₂ 株ではキルヒ

表 7 階段稀釈による比較実験の例

材料	稀釈倍数	培地		
		観察日		
		7日	28日	28日
喀痰 G 5号	10 ¹	++	+++	+++
	10 ²	+	++	++
	10 ³	9	120	87
	10 ⁴	-	26	16
喀痰よりの 新鮮分離菌株	10 ¹	++	+++	+++
	10 ²	+	+++	+++
	10 ³	3	110	103
	10 ⁴	-	25	15

表 8 迅速法の検出限界

処理液	材料	例数	培地		
			観察日		
			7日	28日	28日
4% NaOH	喀痰		変法 III あるいは キルヒナー寒天	3% ある いは 1% 小川培地	
			7日	28日	28日
蒸溜水	保存菌株ま たは新鮮分 離菌株	12	+	67	69
			-	26	14

注: 欄中の数字は集落数の平均を示す

ナー寒天培地, 変法 III 培地ともに 0.05 γ/cc で発育が阻止された。INH では 3 株ともキルヒナー寒天培地で 0.04 γ/cc , H₂ 株は変法 III 培地でも同じく 0.04 γ/cc で発育が阻止された。なおこの実験では, 変法 III 培地の方は 1% NaOH で処理した菌液を 0.2 cc 接種した。

C. 迅速培地保存の影響

培地作製後の保存日数により発育にどの程度差があるかをみるため, 変法 III 培地を作製後 3 日, 17 日, 24 日, 30 日とそれぞれ氷室保存のものと, 室温保存 (5 月) 30 日のものとを喀痰と比較してみると, 表 10 のように 17 日目までは影響がないが, 24 日保存のものでは (3) の例ではやや菌数も減り, また (2)(4) の例のようにコードの発育の劣るものもあらわれてくる。30 日保存 (氷室) でも同様の傾向があるが, 新しい培地に比べて著明に発育が悪くなることはなかつた。これを要するに大体 4 週以内なら使用には影響ないものと考えてよい。なお保存にはポリエチレンの袋に入れておくのが乾燥および汚染

表9 SM, PAS, INHに対する保存菌株の感受性

薬剤名	混入薬剤 (γ/cc)	培地			
		キルヒナー寒天培地			
		H ₃₇ Rv株	黒野株	H ₂ 株	H ₂ 株
	0	+++	+++	+++	+++
S M	1 γ	-	-	+	+
	2 γ	-	-	-	-
	4 γ	-	-	-	-
P A S	0.05 γ	+	+	-	-
	0.1 γ	-	-	-	-
	0.2 γ	-	-	-	-
I N H	0.02 γ	+	+	+++	++
	0.04 γ	-	-	-	-
	0.08 γ	-	-	-	-

注: +~+++は顕微鏡的集落数を示す

表10 培地保存による影響

患者番号・ ガフキー番号	場所 保存日数	氷 室				室温 (5月)
		3日	17日	24日	30日	
		(1) G 4号	+++ 36μ	+++ 36μ	+++ 36μ	+++ 36μ
(2) G 8号	+++ 54μ	+++ 54μ	+++ 40μ	+++ 40μ	+++ 40μ	
(3) G 3号	+++ 50μ	+++ 50μ	+++ 50μ	+++ 40μ		
(4) G 2号	+++ 30μ	+++ 30μ	+++ 20μ	+++ 20μ		

注: 1) 欄中の数字はコードの長さを示す
2) +~+++は、顕微鏡的集落数を示す

をさけるうえからも便利である。

IV 総括および考察

私は前述のように、喀痰を前処理してうえるいは菌液をうえて、簡単にそのまま顕微鏡的集落をみる方法を種々実験した。これらに関して、断片的にはいろいろの記載があるが、これを系統的に実験したのはみあたらない。まず4区画シャーレ (Felsen plate) であるが、これは Felsen^{33) 34)} がはじめ腸内細菌で使ったものである。それを Middlebrook²⁹⁾ が普通法の耐性検査のスクリーニングに用いたものであるが、それを私はそのまま応用した。

次に培地であるが、透明な寒天培地は Dubos³⁰⁾, Mid-

dlebrook^{29) 41)}, Kirchner³⁷⁾, 高橋³²⁾, 山根⁴²⁾らのものがあるが、これらのうちでもつとも組成の簡単なものは Kirchner 寒天培地である。キルヒナー寒天培地については、わが国では BCG の検定用として検討⁴⁵⁾され、ほぼ 1% 小川培地と匹敵する発育を示しているし、最近の小川ら⁴⁴⁾の実験でもほぼ同様の成績を示している。菌液の接種あるいは中和した喀痰の接種にはこのキルヒナー寒天培地を用いることにした。次に 4% NaOH で処理したものを直接接種するのには小川ら³⁵⁾の変法Ⅲキルヒナー寒天培地を用いることにした。4% NaOH で前処理した喀痰をキルヒナー寒天培地と変法Ⅲ培地に接種して迅速法と比較してみると変法Ⅲ培地の方がすぐれた発育を示した。

次に、この培地の応用の範囲を広めるために、あるいは迅速法としての性能を高めるために種々実験したが、その中で陽性成績を示したのは、わが国の脱脂寒天でも使用できることをみただけであつて、血漿や全血は血清の代用品としては使えなかつたし、顕微鏡的集落の判定を容易にしようと思つて用いた酸化還元色素剤はその効果がなかつた。

接種培養手技については、喀痰では 4% NaOH で処理したものをさらに滅菌蒸留水で 4 倍に稀釈したものを、菌液では 0.1 mg/cc のものを、それぞれ 0.2 cc 宛を 1 区画に接種し、培地表面のほぼ乾いたところでポリエチレンの袋に入れ培養を継続すると、乾燥を防げまた汚染も少なく、迅速法とともに普通法としても観察できることを知つた。また顕微鏡的集落の判定は 7 日目にみるのが適当であると認めた。

この迅速法の喀痰よりの結核菌の検出域は、従来の小川ら²²⁾の迅速法とほぼ同様であつて、大体 50 コロニー以下の少ない菌数の場合は検出できない。したがつて塗抹陽性のものを対象とした方がよい。またこの迅速法における保存結核菌株 (H₃₇Rv 株、黒野株、H₂ 株) の SM, PAS, INH による阻止力は、SM では、H₃₇Rv 株、黒野株は 1 γ/cc, H₂ 株は 2 γ/cc で、PAS は H₃₇Rv 株、黒野株は 0.1 γ/cc, H₂ 株は 0.05 γ/cc で、INH は全株 0.04 γ/cc で発育が阻止されたが、この値は肉眼的集落でみる普通法に比べやや低かつた。

また変法Ⅲ培地は氷室に保存して約 1 ヶ月は使える。以上のようなことから、はたして耐性結核菌の迅速判定が可能かどうかについて、さらに検討するつもりである。

V 結 論

寒天平板鏡検による迅速耐性検査法の基礎実験として種々検討した結果、次の結論を得た。

1) 喀痰の場合、塗抹陽性の喀痰を 4% NaOH

で約 5~10 倍に稀釈よく均等化し、さらにこの処理液を滅菌蒸留水で 4 倍に稀釈し、その 0.2 cc 宛を変法Ⅲキルヒナー寒天培地を 2.5 cc 宛分注した 4 分画シャーレの 1 区画に接種する。シャーレは水平に孵卵器に放置、培地表面のほぼ乾いた 1~2 日後にポリエチレンの袋に逆さに入れ培養する。7 日目に袋より出し、平板の裏から弱拡大 (50 倍) で鏡検し、培地表面の顕微鏡的集落 (コード) をみて判定する。その後はまた袋に入れて培養を続けられ、4~5 週後に肉眼的集落をみて普通法として判定できる。

2) 菌液の場合は、キルヒナー寒天培地を使い、手振り法により蒸留水で 0.1 mg/cc のものを作り、その 0.2 cc 宛接種する。その後は喀痰の場合と全く同様である。

3) この迅速法の喀痰よりの検出域は、3% 小川培地で約 50 コロニー以下の場合には検出できない。

4) この迅速法において、保存結核菌株 ($H_{37}Rv$ 株、黒野株、 H_2 株) の SM, PAS, INH による阻止力は、SM では、 $H_{37}Rv$ 株、黒野株は 1 γ/cc 、 H_2 株は 2 γ/cc で、PAS は、 $H_{37}Rv$ 株、黒野株は 0.1 γ/cc 、 H_2 株は 0.05 γ/cc で、INH は全株 0.04 γ/cc で発育が阻止された。

終りに臨み御指導、御校閲を賜わった慶大石田二郎教授ならびに終始御指導、御教示を賜わった小川辰次部長に深甚の謝意を表します。

本論文の要旨は、昭和 34 年 2 月第 50 回日本結核病学会関東地方学会において発表した。

文 献

- 1) Wright : Lancet, 206 : 218, 1924.
- 2) 佐伯 : 結核, 25 : 567, 昭25.
- 3) 藤村 : 日結, 10 : 97, 昭26.
- 4) 芦野 : 抗研誌, 7 : 242, 昭26.
- 5) 河盛・堀本・弘末 : 臨床, 4 : 395, 昭26.
- 6) Pryce : J. of Path. & Bact., 53 : 327, 1941.
- 7) Berry & Lowry : Amer. Rev. Tuberc., 60 : 51, 1949.
- 8) 清水 : 医療, 8 : 585, 昭29.
- 9) " : " , 8 : 672, 昭29.
- 10) " : " , 8 : 739, 昭29.
- 11) 山本 : 名古屋医学, 67 : 499, 昭28.
- 12) " : " , 68 : 133, 昭29.
- 13) 山本 : 京大結研紀要, 3 : 57, 昭29.
- 14) 小沢・滝井・川本 : 結核, 30 : 14, 昭30.
- 15) " : " , 30 : 86, 昭30.
- 16) 広谷 : 医学と生物学, 45 : 241, 昭32.
- 17) Pierce et al. : Amer. Rev. Tuberc., 75 : 331, 1957.
- 18) 植田・上坂 : 日結, 11 : 112, 昭27.
- 19) 小川 (政敏) : 日結, 12 : 81, 昭28.
- 20) 馬場・二村・斎藤 : 最新医学, 9 : 190, 昭29.
- 21) 馬場 : 臨床病理, 4 : 332, 昭31.
- 22) 小川・長田・小関 : 結核, 31 : 302, 昭31.
- 23) 河合 : 結核, 30 : 621, 昭30.
- 24) Wintersheid et al. : Amer. Rev. Tuberc., 68 : 625, 1953.
- 25) Pital et al. : Amer. Rev. Tuberc., 78 : 111, 1958.
- 26) Hoyt et al. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 916, 1954.
- 27) 伊藤他 : 診断と治療, 46 : 95, 昭33.
- 28) Middlebrook et al. : J. of Exper. Med., 86 : 175, 1947.
- 29) " : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 852, 1954.
- 30) Dubos et al. : Amer. Rev. Tuberc., 56 : 334, 1947.
- 31) Roberts et al. : Amer. Rev. Tuberc., 61 : 563, 1950.
- 32) 高橋 : 日本細菌学雑誌, 12 : 669, 昭32.
- 33) Felsen : Amer. J. Clin. Pathol., 19 : 289, 1949.
- 34) " : Arch. of Int. Med., 88 : 406, 1951.
- 35) 小川・沢井・島田 : 結核, 33 : 749, 昭33.
- 36) " : " , 33 : 807, 昭33.
- 37) 小川 : 結核菌検索の基礎と応用, 71頁, 昭26.
- 38) " : 結核, 24 : 45, 昭24.
- 39) " : " , 25 : 403, 昭25.
- 40) 小川 (政敏) : 臨床病理, 4 : 341, 昭31.
- 41) Middlebrook et al. : Amer. J. of Pub. Health, 48 : 844, 1957.
- 42) Yamane et al. : Fukushima J. Med. Sci., 2 : 35, 1955.
- 43) 室橋・橋本・金井 : 結核, 27 : 344, 昭27.
- 44) 小川他 : 日本細菌学雑誌, 14 : 94, 昭34.