

1% 小川培地を用いる実用的な結核菌のカナマイシン耐性検査法

東 村 道 雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和34年9月8日

ま え が き

Kanamycin (KM) は卵黄により抗菌力を減じるといふ報告がある (Morikubo, 1958)¹⁾。この報告自体は事実であるが、一般に KM 耐性検査には卵培地は不適當であるかのごとく誤解され、KM 耐性検査には Kirchner 寒天培地が療研によつても採用された²⁾。しかし療研の方法は間接法であるため、間接法自体の含む欠点を有し、直接法耐性検査法の必要が痛感された。この目的のため、小川 (1958)³⁾ は直接法用の変法 Kirchner 寒天培地を発表し、東村 (1958)⁴⁾ は 1% 小川培地を用いる直接法耐性検査法を発表した。著者 (東村) の主なる論点は、(1) 卵培地における力価減少は KM に特有なものではなく、SM にも認められる。しかるにとくに KM のみをとあげて卵培地使用不能ということは矛盾している。(2) KM は発育遅延的に作用するため、抗菌力の判定は接種菌数および培養日数により著明に影響される (東村, 1958, 1959)^{4)~6)}。Patnode & Hudgins (1958)⁷⁾ は血清および培養日数の影響を報告しているが、それ以上に影響を与えるのは接種菌量であり、判定日数を一定にしても、接種菌数が大であれば高濃度まで発育が起り、小であれば低濃度ですでに阻止される⁴⁾。また著者は耐性検査は全部同じ培地で行なうほうが便利であるとの考えから、1% 小川培地を用い、接種菌数の大小による判定値動揺を除去するために、各培地当たり 20~150 集落数 (actual count 可能) を与えるごとき小接種菌数を用いる必要を報告した。そして、この方法 (actual count 法) により KM 耐性検査を行なつて臨床経過と一致することを確かめ、本法で KM 50 $\mu\text{g/ml}$ (以下 50 γ と記載) 以上耐性を示す菌は臨床的にも耐性菌とみなすべきことを報告した (東村ら, 1959)^{8)~10)}。

Kirchner 寒天培地法と 1% 小川培地法の比較

KM 耐性検査法には上述のごとく Kirchner 寒天培地を用いる方法と 1% 小川培地を用いる方法とがある。前者は現在では接種菌数を考慮しないで使用されており、後者は接種菌量を actual count 可能の小菌量とすることになっている。この両者を比較すると、(I) まず手技の繁雑さでは、前者は調製法がやや繁雑な Kir-

chner 寒天培地を必要とし、後者は喀痰の稀釈を行なう繁雑さがある。また Kirchner 寒天培地は小川培地に比して必ずしも発育がよくない欠点がある。(2) 耐性検査の正確度では、林ら (1959)¹¹⁾、立花ら (1959)¹²⁾、宮部 (1959)¹³⁾、宝来 (1959)¹⁴⁾ によつて報告された Kirchner 寒天培地または Dubos アルブミン寒天を用いる方法では、KM 未使用患者の耐性検査成績は 1:10 の動揺を示す (たとえば立花らによれば 0.625~5 γ 、宮部によれば 0.3~3 γ 、宝来によれば 0.5~5 γ で発育) のに対して、1% 小川培地法では 1:4 (大いの場合 10~20 γ で発育、まれに 5 γ 耐性のものがある) であつて、正確度の点では後者が優れている。もちろんこの原因は、1% 小川培地そのものの性質ではなく、接種菌数を一定化したためと考えられる。したがつて、Kirchner 寒天培地か Dubos アルブミン寒天培地でも接種菌数を揃えなければ正確な検査成績を得ることはできない。(3) KM 未使用患者の KM 耐性は上述のごとく、1% 小川培地で高い (抗菌力が弱い)。石山ら (1958)¹⁵⁾ によれば KM 1.5 g 筋注後の血中濃度は 80~100 $\mu\text{g/ml}$ であり、Wright ら (1959)¹⁶⁾ によれば、KM 1 g 筋注後の血中濃度は 30 $\mu\text{g/ml}$ であるから、血中濃度からみれば KM は SM 以上に生体内で効果があつてよさそうにみえるが、事実はそうではない。このことは、KM の生体内での抗菌力がかなり弱くなつていていることを示し、むしろ 1% 小川培地での成績のほうが生体内条件に近いことを暗示する。以上の考察から、接種菌数を考慮した 1% 小川培地法は接種菌数を考慮しない寒天培地法より優れている。また耐性成績が高くでることも欠点とはいえない。したがつて KM 耐性検査のみに小川培地は使用できないという理由はなんら見出だすことはできないのである。以上から 1% 小川培地は十分 KM 耐性検査に使用しうると考えられるが、問題は喀痰稀釈の面倒さであつて、この点を簡易化して実用的な耐性検査を行ないえないかと考えて既往の成績を観察したところ、喀痰原液接種だけを用いても十分実用に供しうることが発見された。

1% 小川培地を用いて簡単に行なう臨床的 Kanamycin 耐性検査法

著者は持論として、耐性検査は研究用の正確な方法と

臨床用のやや不正確であつても簡単な方法の2つに分けるべきものとする。耐性復帰などを研究する目的には、面倒でも正確な方法が採用されるべきである。少なくとも接種菌量の影響を除外した actual count 法が採用されるべきである (Middlebrook, 1954; 東村, 河西, 1956)^{17) 18)}。しかし臨床的には簡単な方法で見当づけができればよい。そこで KM 耐性検査についても簡単な方法を得たいと思つて既往の検査成績を再検討する間に簡単な方法で、これを実行しうることが分かつた。著者ははじめ喀痰原液とその 100 倍および 1,000 倍稀釈液を 1% 小川培地に接種して、対照培地で 20~150 集落の発育を与える接種菌量で発育可能な最高 KM 濃度を耐性度としてきたのであるが、これらの成績を通覧すると、KM 未使用患者では喀痰原液接種 (常用検査法と同じ) で KM 50 γ 培地に発育しうることがあつても、KM 100 γ 培地に発育するものはないことが分かつた。一方、KM 投与を行なつた患者で KM の臨床効果と KM 100 γ 培地の発育との関係を調べると、臨床的に KM 耐性と思われるときには KM100 γ 培地になんらかの発育が認められることを見出だした。したがつて実用的には、喀痰原液を KM 100 γ 培地に接種して、発育を認めなければ臨床的 KM 感性と認めてよいし、なんらかの発育を認めれば臨床的 KM 耐性またはその前状態と認めてよいと考えられた。

臨床的 Kanamycin 耐性検査法

培地: KM 100 $\mu\text{g/ml}$ を含有する 1% 小川培地 (KM 100 γ 培地) および薬剤なしの対照培地の 2 種を用いる。

接種: 喀痰に等量の 5% KOH を加え、15~20 分間パンピングを行ない、均一化した喀痰液を渦巻白金耳 (1回の接種で 0.02~0.025 ml すくい接種しう) で対照培地および KM 100 γ 培地に塗抹接種し、ただちにゴム栓を施して 37°C に培養し、6 週後に判定する (もちろん 4 週後にも判定して KM 100 γ 培地に発育があれば耐性とする)。

判定: KM 100 γ 培地に多少とも発育を認めれば臨床的には KM 耐性またはその前時期と考えてよい。KM 100 γ 培地に数百以上の集落を認めれば、たとえ対照培地より発育が少なくても、臨床的に KM 耐性 (KM ほとんど無効) と考えてよい。KM 100 γ 培地に発育を認めなければ臨床的に一応 KM 感性と考えてよい。

(注1) 培地分注量は中試験管 (170×17~18 mm) に 8 ml とする。5 ml 分注では検査成績が劣る (東村野田, 中村, 1957, 1958)¹⁹⁾。(注2) KM は有機塩基であるから、pH が酸性の 3% 小川培地より中性に近い 1% 小川培地で作用が強い。(注3) 1% 小川

培地使用のさいは、ピペットで 0.1 ml 接種するよりも渦巻白金耳法によるほうが成績がよい。これは 1% 小川培地ではアルカリ中和能力が劣るためと思われる。3% 小川培地での 0.1 ml 接種法と 1% 小川培地での渦巻白金耳接種法 (0.02 ml 接種) の間には僅少の差しかない。これは 0.1 ml 接種では、接種菌が試験管壁に吸着したり、培地上で凝集するためと思われる (別報)。(注4) 1% 小川培地での渦巻白金耳接種法は次の利点をもつ。(i) 渦巻白金耳は焼灼滅菌により何回でも連用できる。(ii) 渦巻白金耳法では接種量が少ないため、ただちにゴム栓をして孵卵器に納めうる。ピペットで 0.1 ml 接種すれば乾くまで待つて、ゴム栓をしなければならぬ。(iii) 測定誤差 (集落数の % 標準偏差) は両方で差がない。(iv) 検出率は渦巻白金耳法がごくわずかに劣るにすぎない。

臨床的 Kanamycin 耐性検査法の基礎

(1) KM 未使用患者の KM 耐性検査成績

喀痰に等量の 5% KOH を加えて均一化し、これを渦巻白金耳で 1 白金耳ずつ、KM 0 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, および一部では 1,000 $\mu\text{g/ml}$ を含む培地に接種し 6 週後に成績を判定した。KM 0 γ 培地 (対照培地) と同等の発育を示す KM 最高濃度を完全耐性度、多少とも発育を示した KM 最高濃度を不完全耐性度とすると、成績は表 1のごとくであつた。KM 未使用患者 33 例 (いずれも常時排菌者) の耐性度は不完全耐性度をとつても、KM 50 γ 不完全耐性以下であつて、KM 100 γ 培地に発育を示したものは 1 例もなかつた。

(2) KM 使用に伴う KM 耐性度の推移

表 1 の成績から、喀痰の稀釈を行わずに、routine 法と同じく接種した場合、KM 50 γ 培地までは少数の集落が発生しても KM 100 γ 培地に発育を示すものはなかつたので、耐性判定の問題点は KM 100 γ 培地の発育にあると思われた。そこで KM 使用例中、KM 耐性発現 (actual count 法で KM 50~100 γ 以上耐性菌の出現した例)¹⁰⁾ を認めた例 6 例について本報の γ 臨床的 KM 耐性検査法 γ による結果 (KM 100 γ 培地の発育) をまとめると表 2のごとくであつた。これらの例はいずれも SM-PAS-INAH 3 重耐性菌をもつ例で、これらの耐性薬剤とともに KM 1 日 1 g 1 週 2~3 日を投与した (他に KM 注射日に cycloserine 1 日 0.5 g または viomycin 1 日 1 g の 1 または両者を併用した)。

KM 開始時には、KM 100 γ 培地に発育を示す例はなかつたが、KM 使用 40~70 日後には KM 100 γ 培地に発育を認めるようになった。そして、これと同時にまたは少し遅れて、一たん減少していた 1 日排菌数が治療

表1 Kanamycin 未使用患者喀痰中結核菌の Kanamycin 耐性度
(1% 小川培地使用, 喀痰原液接種, 渦巻白金耳接種法)

Kanamycin 耐性度	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	計
完全耐性	7	16	10	0	0	33
不完全耐性	1	11	11	10	0	33

表2 「臨床的 Kanamycin (KM) 耐性検査法」による KM 耐性の推移 (1958~1959年)

日/月	症例1. ■■■ ♀			日/月	症例2. ■■■ ♀			日/月	症例3. ■■■ ♀		
1/7	0	↑	■	1/7	0	↑	■	15/10	0	↑	-
18/7	0		+	18/7	0		■	27/10	0		89
27/7	0		+	27/7	0		+	12/11	0		171
12/8	0		+	12/8	0		+	25/11	1 (0.04%)		+
20/8	0		+	20/8	2 (0.008%)		+	9/12	0		+
27/8	3 (0.05%)		+	27/8	7 (0.03%)		+	23/12	59(0.17%)*‡		+
16/9	32(0.1%)		+	16/9	25(0.08%)		+	6/1	+(46%)		+
30/9	+(2%)		■	30/9	13(0.02%)		+	20/1	+(100%)		+
15/10	51(0.12%) ↓		■	15/10	74(0.14%)		■	3/2	+(40%)		+
27/10	63(0.1%)*		■	27/10	+(35%)*		+	17/2	+(100%)		+
12/11	37(0.01%)		■	25/11	+(27%)* ↓		+	30/3	+(67%)		+
23/12	0		■	9/12	+(100%)		+	25/4	62(50%)		124
6/1	+(34%)		■	23/12	+(44%)		+	4/5	+(72%)		■
20/1	+(31%)		■	6/1	+(65%)		+	13/6	+(57%)		+
3/2	3 (0.01%)		+	20/1	■(53%)		■	10/7	■(97%)*‡		■
17/2	2 (0.003%)		+	3/2	+(94%)		+		(KM投与続行中)		
13/6	0		■	13/6	+(20%)		■				
10/7	■(44%)		■	10/7	■(36%)		■				
日/月	症例4. ■■■ ♀			日/月	症例5. ■■■ ♂			日/月	症例6. ■■■ ♀		
25/10	0	↑	+	6/11	0	↑	+	30/3	0	↑	74
12/11	0		+	25/11	0		+	25/4	0		153
26/11	0		+	9/12	0		+	4/5	0		+
9/12	1 (0.013%)		■	23/12	0		+	13/6	1 (1%)		96
23/12	1 (0.016%)		+	6/1	21(0.48%)		+	10/7	+(26%)*		+
6/1	0		+	20/1	+(20%)*		+		(KM投与続行中)		
20/1	+(28%)		+	3/2	0	↓	+				
3/2	21(0.84%)		+	17/2	0		+				
17/2	45(0.16%) ↓		+								

各症例の左項は「KM 100 γ 培地」、右項は対照培地の結核菌発育を示す。数字は集落数, +は数百の集落, ++は一部融合, +++は全面融合の膜状発育を示す。

左項の () 内は population 構成分析によって得た KM 100 γ 耐性菌含有率を参考に示した。

* 1日排菌数が治療開始時の水準に復帰したことを示す。

‡ シューブ症状の発現

↑ KM 投与開始

↓ KM 投与中止

症例1~5の SM, PAS, INH 耐性および化学療法については, 東村・安保・勝沼: 結核, 34 625, 昭34参照。

症例6. 1922年生. 治療開始時 SM 2,000 γ , INH 10 γ 耐性, PAS 耐性なし(いずれも actual count 法による)。CoKx2, SM-KM-C-- PAS-INH 5 者併用療法施行。

前の水準に復帰した。また症例2および3では, KM 100 γ 培地に発育をみたのち, 発熱, 咳嗽喀痰の増加, 水泡音増加, 空洞出現などシューブ様症状が発現した。以

上の結果は, 本検査法における KM 100 γ 培地の発育 (KM 100 γ 不完全または完全耐性の発現) が臨床的变化と一致または先行することを示している。

考 察

前報¹⁰⁾に述べたごとく KM 耐性出現の様相は、KM 50 γ 耐性菌出現は一過性であつて、ただちに KM 100 γ 耐性菌集団に移行するから、KM 100 γ 培地の菌発育の有無が耐性判定点と考えられた。ただ問題はいわゆる偽耐性⁵⁾のために感性菌の集団が KM 100 γ 培地に発育しないかと心配されたが、本報の成績は KM 未使用患者の菌 (KM 感性菌) は KM 100 γ 培地に発育しえないことを示した。したがつて KM 100 γ 培地の発育は耐性と考えてよいと思われたが、観察結果もこれを裏がきするものであつた。

本法の検査法と前報の actual count 法とでは、接種菌数の多い本法のほうが早く KM 100 γ 培地の発育を示すのが当然である。換言すれば、本法は KM 100 γ 不完全および完全耐性を意味し、前報の方法は完全耐性を意味するといつてよい。両者で KM 100 γ 耐性出現が一致したのは第 1, 3, 5, 6 例で、本法が先行したのは第 2 および 4 例 (40 日先行) である。また、KM 100 γ 培地の少数集落発生と多数集落発生とが意味を異にするのは当然であつて、第 2 例および第 3 例のごとく KM 100 γ 培地に多数の発育を示した例は、のちにシェーブ様悪化をきたしたことは注目される。

なお、KM 100 γ 耐性の場合には大部分 KM 1,000 γ 耐性であることが最近の成績で明らかとなつたことおよび KM 耐性菌は表にみられるごとく、KM 中止後も安定であることを付記しておく。

結 論

実施方法が簡単でしかも十分実用しうる臨床的 Kanamycin (KM) 耐性検査法を記載した。本法は、喀痰に等量の 5% KOH を加えて 15~20 分間パンピングして均一化し、これを渦巻白金耳 (1 回の接種量 0.02

~0.025 ml) で、薬剤なしの 1% 小川培地 (対照培地) と KM 100 $\mu\text{g/ml}$ 含有 1% 小川培地とに接種し、4 および 6 週後に判定する。KM 100 $\mu\text{g/ml}$ 培地に多少とも発育が認められれば、KM 耐性出現またはその前状態と考えてよい。KM 100 $\mu\text{g/ml}$ 培地に対照培地と同等またはそれに近い程度の発育を示すときは、KM は臨床的にほとんど無効と考えてよい。

文 献

- 1) Morikubo : J. Antibiotics, A, 11 : 181, 1958.
- 2) 昭和33年度療研研究課題, カナマイシンの治療効果に関する研究.
- 3) 小川・沢井・島田 : 結核, 33 : 749, 807, 昭33.
- 4) 東村 : 医学と生物学, 49 : 87, 昭33.
- 5) 東村 : 結核, 33 : 815, 昭33.
- 6) 東村 他 : 遺伝学雑誌, 34 : 205, 昭34.
- 7) Patnode & Hudgins : Am. Rev. Tuberc., 78 : 138, 1958.
- 8) 東村 : 医学と生物学, 51 : 55, 昭34.
- 9) 東村 : 医学と生物学, 51 : 218, 昭34.
- 10) 東村・安保・勝沼 : 結核, 34 : 625, 昭34.
- 11) 林・染谷・大竹 : 結核病学会総会演説, 昭34.
- 12) 立花・河村・伊藤 : 化学療法学会総会演説, 昭34.
- 13) 宮部 : 結核, 34 : 581, 昭34.
- 14) 宝来 : 結核病学会総会演説, 昭34.
- 15) 石山 : カナマイシン・シンポジウム演説, 昭33.
- 16) Wright, Renzetti, Lunn & Bunn : Am. Rev. Tuberc., 79 : 72, 1959.
- 17) Middlebrook : Am. Rev. Tuberc., 70 : 922, 1954.
- 18) 東村・河西 : Chemotherapy, 4 : 227, 1956.
- 19) 東村・野田・中村 : 結核, 32 : 639, 昭32 ; 33 : 43, 昭33.