

## 結核培地としての半流動寒天培地に関する研究

## 第3報 0.1% 半流動 Dubos 寒天培地による薬剤耐性検査

大川日出夫

国立神奈川療養所

受付 昭和36年6月15日

## 緒言

3% 小川培地あるいは Kirchner 寒天培地による結核菌の薬剤耐性検査では最終判定に5ないし6週を必要とし、その期間の短縮が切望されている。この問題の解決法の一つとして既報した半流動寒天培地<sup>1)~4)</sup>を用いてストレプトマイシン(以下 SM)、パラアミノサリチル酸(以下 PAS)、イソニコチン酸ヒドラジド(以下 INH)、カナマイシン(以下 KM)、バイオマイシン(以下 VM)につき薬剤耐性検査を試みた。培養期間の短縮が可能で、検鏡などの操作を必要とせず、さらに定量的測定ができる点で優れた成績を得たので報告する。

## 実験方法および成績

まず詳細に基礎的実験を行ない、3% 小川培地使用の場合との最低発育阻止濃度(以下 MIC)の差をみてのち、Routineの方法に従って耐性検査を実施した。

## 〔実験I〕基礎実験(A)直接法

## 1. 実験方法

0.1% に寒天(Difco Bacto Agar)を加え、マラカイト緑20万倍添加、アルブミン(栄研)を10%に添加した半流動 Dubos 寒天培地(Difco Dubos Agar media without Tween 80)を用い、直接法にはpHを5.8とし、間接法には6.8としたものを使用した。対照として3% 小川培地による薬剤耐性培地を準備した。

SMについては半流動 Dubos 寒天培地にジヒドロストレプトマイシン(以下 DHSM)を1,000, 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0  $\gamma$ /ml になるように加え、3% 小川培地には所定の2倍量を加えた。

PASは1 ml 中100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16, 0  $\gamma$ とし、INHは1 ml 中に50, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16, 0  $\gamma$ とした。

ほとんど毎回塗抹陽性(螢光法)の重症肺結核患者略

痰5件を使用した。これらはSM, PAS, INHのうち1~3剤に耐性が証明されていたものである。前日抗結核剤投与を中止し採取した早朝喀痰を用いた。

それぞれ4% NaOH水で5倍希釈、20分間前処理し、Gaffky号数により、集落計数可能な2段階に適宜4% NaOH水で希釈し、おのおの0.1 mlを兩種培地に接種し37°Cに培養した。半流動寒天培地の判定は3~4週、3% 小川培地の判定は5~6週で行なつた。

## 2. 実験成績

成績は表1に示すごとくである。DHSM, PAS, INHとも比較可能のものは5件中3件であつた。他の2件は集落数少なく比較できなかつた。DHSMでは比較しうる3件とも兩培地における最低発育阻止濃度に差があり、3% 小川培地のMICが半流動寒天培地のMICより高値を示した。

PASについては3件中2件は兩培地の成績が一致し、1件は半流動寒天培地のMICが高かつた。

INHでは3件のうち2件が一致し、1件は半流動寒天培地のMICが高かつた。

## 〔実験II〕基礎実験(B)間接法

## 1. 実験方法

DHSM, PASおよびINHとも添加濃度は直接法の場合と同一とした。

培養後4~6週を経過した分離菌株を3種薬剤につきそれぞれ5株選び、ほぼ $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ の2段階の希釈菌液をつくり、その0.1 mlを接種した。37°Cに培養し5週まで毎週観察した。

## 2. 実験成績

間接法の成績も表1に示す。比較可能のものはDHSMで3件、PAS, INHは4件であつた。DHSMは3件とも3% 小川培地のMICが高値であつた。PASでは2件はほぼ一致し、1件は3% 小川培地で高く、1件は半流動寒天培地のMICが高かつた。INHでは4件中3件で一致し、1件は半流動寒天培地で高いMICを示した。

Table 1  
Comparison of MIC by Semi-Solid Dubos Agar Media  
and 3 % Ogawa's Media

Drugs	Media	M I C ( $\gamma/ml$ )					
		Direct method			Indirect method		
		Semi-solid	Comparison	3 % Ogawa's	Semi-solid	Comparison	3 % Ogawa's
S M		<0.31	<	0.62	5	<	50
		2.5	<	5	<0.31	<	10
		<0.31	<	1.25	10	<	100
P A S		100	>	50	50	<	100
		5	=	5	50	>	10
					50	=	50
		50	=	50	>100	≠	>100
I N H		50	=	50	20	=	20
		1.25	>	0.62	2.5	=	2.5
					1.25	>	0.6
		5	=	5	5	=	5

〔実験Ⅲ〕 KM および VM の耐性検査

1. 実験方法

pH 6.8 の 0.1 % 半流動 Dubos 寒天培地, Kirchner 寒天培地, 3 % 小川培地に KM および VM を添加して 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16, 0  $\gamma/ml$  の稀釈系列を調製した。供試菌株は Mycob. 607 ならびに H<sub>37</sub>Rv を用い, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 稀釈の 0.1 ml を各培地 2 本あてに接種し, 37 °C に培養, Mycob. 607 は 3 日および 5 日に判定, H<sub>37</sub>Rv は 1

週より 5 週まで判定した。

2. 実験成績

Mycob. 607 の成績のみを表 2 に示す。H<sub>37</sub>Rv の成績は Mycob. 607 と傾向を全く同じくしたので省略した。なお成績の比較は 50~150 程度の集落を発生した稀釈段階で行なった。

半流動 Dubos 寒天培地, Kirchner 寒天培地, 3 % 小川培地における Mycob. 607 に対する KM の抗菌力を MIC で検討すると, 半流動寒天培地では 0.31

Table 2  
Comparison of MIC by Semi-Solid Dubos Agar Media, Kirchner  
Agar Media and 3 % Ogawa's Media —KM, VM—  
(Mycob. 607, 10<sup>-4</sup>, 5 days)

Drugs	Media	Concentration										
		$\gamma/ml$	100	50	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.16	0
KM	Semi-solid agar media										31.0*	**C
	Kirchner agar media						9.5	68.5	99.5	99.0	97.5	
	3 % Ogawa's media			79.0	97.0	101.0	87.0	75.5	94.0	109.0	85.5	
VM	Semi-solid agar media								C	C	C	C
	Kirchner agar media				10.5	32.0	34.5	41.5	40.0	47.5	55.0	
	3 % Ogawa's media			111.0	110.5	103.5	115.0	101.5	129.5	109.0	85.5	

\* Mean colonial count of two tubes.

\*\* C means the state of pH 6.8 Semi-solid Dubos agar media cultured 18 days, in which H<sub>37</sub>Rv 10<sup>-4</sup> mg was inoculated<sup>3)</sup>.

$\gamma/ml$ , Kirchner 寒天培地では  $2.5 \gamma/ml$ , 3% 小川培地では  $50 \gamma/ml$  であつた。

VM の場合は半流動寒天培地では  $1.25 \gamma/ml$ , Kirchner 寒天培地では  $10 \gamma/ml$ , 3% 小川培地では  $50 \gamma/ml$  であつた。

〔実験Ⅳ〕 Routine としての耐性検査—直接法—

実験ⅠおよびⅡで半流動寒天培地による MIC は DHSM を除き, PAS, INH では 3% 小川培地のそれとはほぼ一致する結果を得たので, さらに Routine の方法に従つて耐性検査を行つた。

1. 実験方法

上記同様の半流動寒天培地ならびに 3% 小川培地に, PAS は 100, 10,  $1 \gamma/ml$ , INH は 5, 1,  $0.1 \gamma/ml$  を添加した。DHSM は半流動寒天培地に 100, 10,  $1 \gamma/ml$  添加し, 3% 小川培地には所定の 2 倍量加えた。

塗抹で常に Gaffky 2 号以上の排菌を認める肺結核患者喀痰 30 件を使用した。4% NaOH 水で 5 倍希釈, 20 分間前処理し, その  $0.1 ml$  を兩種培地に接種し培養した。

2. 実験成績

兩種培地による耐性検査成績の比較は表 3 に示す。

Table 3

Test for Drug-resistance by Semi-Solid Dubos Agar Media and 3% Ogawa's Media (Direct Method)

Media	Semi-solid agar media				
	Concentration $\gamma/ml$	0	1	10	100
S	0	1			
	1	2			
	10	2	5		
	100	1	1	7	11
M	0	2			
	1				
	10			11	2
	100				14
P		0	0.1	1	5
	0				
	0.1		2	1	
	1		1	5	2
H	5			1	17

DHSM については基礎実験におけると同様に, 3% 小川培地の耐性値が高く, 一致したものは兩培地とも  $0 \gamma/ml$  のもの 1 件,  $100 \gamma/ml$  のもの 11 件のみであつた。 $0 \gamma/ml$  と  $100 \gamma/ml$  には見かけ上の一致も含まれていると思われる。他の 18 件ではすべて 3% 小川培地の耐性値が高く 1 ないし 3 段階の差を示した。

PAS については汚染のため 1 件が判定不能で 29 件と比較すると, うち 27 件において兩培地の耐性値は一致している。2 件は半流動寒天培地の耐性値が高かつたが, 差はいずれも 1 段階であつた。

INH も汚染のため 1 件判定不能で, 29 件を比較した。29 件中 24 件が一致し, ほかに 5 件のうち 3 件は半流動寒天培地の耐性値が高く, 2 件は 3% 小川培地の耐性値が高かつたが, PAS と同様, 差はいずれも 1 段階であつた。

〔実験Ⅴ〕 Routine としての耐性検査—間接法—

1. 実験方法

添加薬剤は直接法と同濃度とし, 半流動寒天培地は pH 6.8 のものを用いた。新鮮分離菌株 20 件よりほぼ  $10^{-2}$  希釈の菌液をつくり, その  $0.1 ml$  を半流動, 小川兩培地に接種し培養した。

Table 4

Test for Drug-resistance by Semi-Solid Dubos Agar Media and 3% Ogawa's Media (Indirect Method)

Media	Semi-solid agar media				
	Concentration $\gamma/ml$	0	1	10	100
S	0	1			
	1	4			
	10	2	5		
	100		1	2	5
M	0	4			
	1			1	
	10		1	8	1
	100			1	4
P		0	0.1	1	5
	0				
	0.1		7	1	
	1			5	
H	5			1	5

2. 実験成績

成績は表4に示すごとくで、DHSMでは両培地0 $\gamma/ml$ のもの1件、100 $\gamma/ml$ のもの5件で一致したが、ほかはすべて3%小川培地の耐性値が高値を示した。不一致例は1~2段階の差であつた。PASは20件中16件で一致し、2件で3%小川培地の耐性値が高く、2件で半流動寒天培地の耐性値が高かつた。INHは20件中18件が一致し、1件で3%小川培地の耐性値が高く、1件で半流動寒天培地の耐性値が高かつた。PAS、INHとも不一致例の差は1段階であつた。

〔実験VI〕半流動寒天培地による耐性検査一簡便法一

1. 実験方法

半流動寒天培地5mlを分注したのち、処理喀痰あるいは菌液を接種し、その後に50倍の濃度に調製した薬剤を0.1ml加える耐性検査簡便法を試みた。

2. 実験成績

簡便法の成績を培地分注前に薬剤を加えておく原法と比較したのが表5である。DHSMについては直接法12件を行ない、1件が耐性値の不一致を示した。間接法は11件を行ない、2件の不一致例をみた。PASは

Table 5

Test for Drug-resistance by "Simple Method"

Media	Semi-solid agar media				
	Concentration $\gamma/ml$	0	1	10	100
Semi-solid agar media "simple method"	S	0	○ ○ ○ ○		
		1	●	● ● ● ●	
	M	10		●	○ ○
		100			○
P	0				
	1			●	
	10			○ ○ ● ● ● ● ● ●	
	100				○ ○ ○ ○ ● ● ● ●
I	0				
	0.1		● ● ● ●	●	
	1			○ ○ ○ ○ ● ● ● ●	
	5				○ ○ ○ ○ ● ● ● ●
N	0				
	0.1		● ● ● ●	●	
H	1			○ ○ ○ ○ ● ● ● ●	
	5				○ ○ ○ ○ ● ● ● ●

○..... Direct method      ●..... Indirect method

直接法5件はすべて一致し、間接法11件中10件が一致した。INHは直接法6件がすべて一致し間接法8件中7件が一致した。この結果耐性検査簡便法も使用可能であることを認めた。

考 察

化学療法の長期化ならびに内科的、外科的治療の進歩に伴い、薬剤耐性検査の重要度はますます高まり、耐性成績を「早く」知り、治療に応用する必要性が痛感される。このために各種の耐性検査迅速法が試みられているが<sup>5)~8)</sup>、Routineとして用いられるためには「迅速性」以外に「操作が簡単であること」、「定量的測定が可能であること」、「現行耐性検査法と耐性値が一致すること」などの諸条件をみとすことが要望されている。またその反面では現行耐性検査法においてとくに塩基性抗生剤に対する耐性値のゆがみが指摘されている<sup>9)~12)</sup>。半流動寒天培地は固型培地に比して集落初発が早く発育も良好で、「迅速性」の面で条件の一つをみたしており、染色、検鏡などの操作を要せず、扱いやすさの点では寒天培地より上であり、3%小川培地に近い。集落計数の点も数に制約はあるが可能である。では3%小川培地による耐性値とどの程度一致するであろうか。

PASおよびINHについては、両培地による耐性値の差は少なく、あつてもわずかでありとくに問題とならない。

DHSMについては両培地でMICに差がみられ、この原因に関してはすでに亀崎<sup>10)11)</sup>が報じたごとく、DHSMが3%小川培地中に含有される磷酸塩により拮抗作用を受けること、ならびに培地中の鶏卵に吸着されることが大きな要因であると考えられる。そして前述のごとくDHSMの抗菌力が明らかに減少すると分かっている培地を用いて耐性検査を行なつてきていることに大きな疑問をもたざるをえない。一方ではさらにまた磷酸塩を増量した寒天培地を推奨するむきもあつて複雑な様相がみうけられる<sup>8)13)</sup>。過去十余年にわたり小川培地をSM耐性検査に使用してきた成績を一さい反古にして改めることも困難であり、それまでの必要もあるまいが、再検討さるべき問題と思われる。

これはさらにKMおよびVMの耐性検査培地を決定するうえにも念頭におかなければならない。KMおよびVMについては詳細はわれわれ<sup>9)</sup>および杉山<sup>12)</sup>が既報したが、DHSMと同じく鶏卵への吸着ならびに磷酸塩の影響が認められている。半流動Dubos寒天培地中にKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>は0.1%、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>は0.25%含まれ、Kirchner寒天培地にはKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>は0.4%、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>は0.3%に含有され、3%小川培地にはKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>は1.0%含まれている。KMのMICは半流動寒天培地で0.31 $\gamma$ 、Kirchner寒天培地では2.5 $\gamma$ 、

3% 小川培地で 50  $\gamma$  で、それぞれ半流動寒天培地の 8 倍、64 倍であつた。寒天の影響がほぼ 2 倍、鶏卵への吸着は 8 倍と推定されるので<sup>12)</sup>、3 種培地間で磷酸塩の濃度の増加に比例して MIC が上昇している。VM の MIC は半流動寒天培地で 1.25  $\gamma$ 、Kirchner 寒天培地で 10  $\gamma$  で 8 倍、3% 小川培地では 50  $\gamma$  で 16 倍となつていて KM とおおむね傾向を一にしている（小川培地での差が KM に比し少ないが、添加濃度が 10  $\gamma$  の次が 50  $\gamma$  で、20  $\gamma$ 、40  $\gamma$  が欠けていたことがその原因であろう）。

要するに DHSM, KM, VM に関する問題は今後の耐性検査分野の課題として残るであろうが、耐性検査培地としての半流動 Dubos 寒天培地は Knox<sup>14)</sup>、渋田<sup>15)</sup>、松崎<sup>16)</sup> が半流動 Kirchner 寒天培地を用いて発表していると同様に成績は良好であり、Routine として使用される可能性と長所を有しているといえよう。

また簡便法は耐性培地が準備されていなくとも、培地と薬剤があれば常時耐性培地が作られる点で利用価値を有している。

## 結 論

0.1% 半流動 Dubos 寒天培地の薬剤耐性検査培地としての使用可能性を検討し、次の結論を得た。

1) PAS および INH については半流動寒天培地、3% 小川培地の耐性値に著明な差を認めなかつた。

2) DHSM, KM, VM については 3% 小川培地による耐性値と半流動寒天培地による耐性値とに差を認めた。この主な原因は培地内の磷酸塩が DHSM, KM, VM と拮抗し抗菌力を減弱させること、およびこれら薬剤の培地内鶏卵への吸着も影響を及ぼすことにある。DHSM の耐性検査培地は再検討の要があり、また KM, VM 耐性検査培地を決定するさい、同様にこのことを考慮しなければならない。

3) 最終判定までの期間を約 2 週間短縮することが

できるし、操作も簡単で、定量的測定も可能であるので、Routine の耐性検査に使用しうる。

4) 接種後に薬剤を加える簡便法も使用でき、耐性培地の準備のない場合も利用できる。

慶大細菌学教室牛場大蔵教授の御指導、御校閲に深謝し、あわせて伊藤忠雄博士の御指導に謝意を表します。

本論文の要旨は第 36 回結核病学会総会において発表された。

## 文 献

- 1) 伊藤忠雄・亀崎華家・朝倉宏・杉山育男・綾部和三郎・大川日出夫：診断と治療，46：1349，昭33.
- 2) 伊藤忠雄・大川日出夫・杉山育男：呼吸器診療，14：813，昭34.
- 3) 大川日出夫：結核，35：630，昭35.
- 4) 大川日出夫：結核，36：13，昭36.
- 5) 厚生省：衛生検査指針，細菌血清学的検査指針(VI)改訂，25，昭34.
- 6) 高橋昭三：日本細菌学雑誌，12：669，昭32.
- 7) 伊藤忠雄・杉山育男・亀崎華家・大川日出夫：結核，33(増刊号)：336，昭33.
- 8) 斉藤直蔵：結核，34：640，昭34.
- 9) 伊藤忠雄・亀崎華家・杉山育男・大川日出夫・綾部和三郎：結核，34(増刊号)：118，昭34.
- 10) 亀崎華家：結核，34(増刊号)：277，昭34.
- 11) 亀崎華家：結核，35：153，昭35.
- 12) 杉山育男：結核，35：179，昭35.
- 13) 小川辰次・沢井武・島田英彦：結核，33：749，昭33.
- 14) Knox, R., Swait, E. & Woodroffe, R.: J. Gen. Microb., 15: 359, 1956.
- 15) 渋田七郎：福岡医学雑誌，45：521，昭30.
- 16) 松崎武寿：胸部疾患，4：826，昭35.

## Studies on Semi-Solid Agar Media for Cultivation of Tubercle Bacilli. 3rd Report. Semi-solid dubos agar media for determining the susceptibility of tubercle bacilli. Hideo OKAWA (National Kanagawa Sanatorium)

In this report, semi-solid Dubos agar media were used for routine susceptibility test of tubercle bacilli to DHSM, KM, VM, PAS and INH.

### Methods and Result

#### 1st Experiment :

0.1% semi-solid Dubos agar media (Difco

Bacto agar media without Tween 80), added with albumin in 10% (EIKEN), containing 5  $\gamma/ml$  malachite green, were used. In the direct method, media were adjusted to pH 5.8, and in the indirect method, were adjusted to pH 6.8. 3% Ogawa's media were prepared as control. Drugs were added as follows ( $\gamma/ml$ ).

DHSM	1000, 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0
KM	} 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31,
VM	
PAS	
INH	50, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16, 0