

Kanamycin 耐性検査の卵培地法と Kirchner 寒天培地法の比較

東村 道雄・河西 栄文・東村 純雄

国立療養所大府荘

受付 昭和 37 年 12 月 25 日

結核菌の Kanamycin (KM) 耐性検査法は、昭和 33 年に検査指針¹⁾および小川²⁾による Kirchner 寒天培地 (寒天培地) 法と東村^{3)~5)}による 1%小川培地 (卵培地) 法とが発表されて以来種々論議の対象となつている。これらの方法を実用するにさいしての KM 耐性の境界については、卵培地では東村など⁴⁾が“actual count 法”耐性検査によつて 50 $\mu\text{g/ml}$ を耐性の境界とした。しかし実用的には 50 $\mu\text{g/ml}$ を設けることはやや複雑なので、100 $\mu\text{g/ml}$ とすることを提唱した。また東村⁶⁾は臨床の実用には寒天培地や actual count 法でなくても、1%小川培地を用いる routine 法で十分事足りるとし、その臨床耐性の境界を 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。ただし、この 100 μg 耐性はいわゆる完全耐性ではなく、100 $\mu\text{g/ml}$ 培地にかなりの発育を示す線をとつている (原著参照)。この所見はその後、田坂⁷⁾により追試承認された。また東村⁸⁾は卵培地により KM 耐性出現形式や耐性の持続性などを検討している。一方、寒天培地を用いたさいの耐性境界については観察が乏しかつたが、最近五味など⁹⁾により KM 5 $\mu\text{g/ml}$ の線が考えられるにいたつた。

上述のごとく、KM 耐性検査には卵培地法と寒天培地法とがあるが、両者の比較研究が行なわれなかつたことは全く奇妙な現象であつた。東村⁹⁾は両者の簡単な比較を行なつて、卵培地法と寒天培地法の耐性度の比がおおよそ 10 : 1 になることを述べた。しかし系統的組織的な比較研究は昭和 37 年にいたつて、中井などの国立療養所特殊研究班¹⁰⁾によつて行なわれた。中井などの示す成績では手技の容易さや雑菌混入率の点で、卵培地法のほうがややすぐれている成績が示された。われわれはこれとはやや趣きを異にして、われわれが常用している渦巻白金耳法¹¹⁾¹²⁾を用いた卵培地法とピペット接種による寒天培地法とを比較したが、この両者は接種量や前処理法が異なるので、主たる目的を両者の耐性度の比較においた。

比較の方法

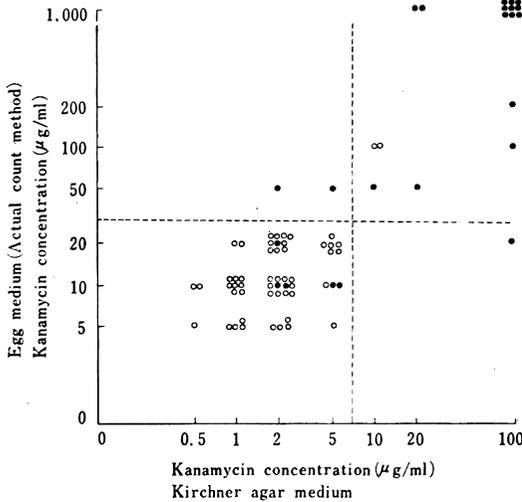
両者の比較は可及的同条件で行なうのが望ましい。こ

の点では中井など¹⁰⁾のごとく間接法で比較するのがよいかもしれぬが、ここでは直接法の比較を行なつた。このさいも、喀痰の処理法を同じにし、接種量も等しくするのが妥当と思われるが、ここでは実際に現在常用されている方法をとつたので、寒天培地は中和を行ないかつ接種量を 0.1 ml とし、卵培地は中和を行わずに接種量を 0.02 ml とした。すなわち、条件としては卵培地法にかなり不利な条件とした。これは寒天培地の操作がやや面倒なので、この条件の卵培地法で大差ない成績が得られれば操作の簡単な方法をとつてもよいと考えたからである。また主目的は両者の耐性度の比較にあるので、一方に不利な条件でも差支えない思つたからである。したがつて両者の優劣の判定のためには、さらに条件を同じくして、すなわち、中和した喀痰を等量ずつ両培地に接種して比較することが必要と思われる。

検査対象：国立療養所大府荘入院中の患者で過去に培養陽性の患者 90 名をとつた。うち 34 名は既往に KM を使用しているが、量および併用薬剤を異にしている。他の 50 名は問診で既往に KM 使用のないものであるが、両者の区別は厳密なものとはいえない。それは KM 未使用という者の中には、過去の KM 使用を黙秘するものがあるからである (検査後の耐性からこのような例を 1 例見出した)。

検査方法：喀痰の処理は原法とはやや異なる。すなわち、1 咳痰にはほぼ等量の 4% NaOH を加えて 10 分間均等化し、その原液を渦巻白金耳で 0.02 ml ずつ一連の KM 濃度を含む 1%小川培地に接種し、これを routine 法とした。次に、喀痰均等液を生理食塩水で 10 倍段階に希釈し、原液、100 倍希釈液、1,000 倍希釈液の 3 種から 0.02 ml ずつを渦巻白金耳で塗抹するのを、actual count 法とした。これら卵培地使用の 2 法ではただちにゴム栓を施して、30°C に 6 週培養した。一方、寒天培地法の方は、喀痰原液に 8% HCl を加えて中和し (アルカリ加喀痰液の約 1/4 量で中和される)、その 0.1 ml を寒天培地に流し込み、フラン器に 48 時間入れて培地面を乾燥させたのち、ゴム栓をつけて 6 週培養した。中

Fig. 2. Comparison between Egg Medium Method (Actual Count Method) and Kirchner Agar Medium Method



Open: Not treated with kanamycin; Closed: Treated with kanamycin.
Dotted lines indicate the limits of kanamycin resistance.

KM 未使用者の耐性度は両者共通の例外2例(卵培地で100 µg耐性, 寒天培地で10 µg耐性)を除けば, 卵培地法で5~20 µg耐性, 寒天培地法で0.5~5 µg耐性法の範囲に入る。actual count法とroutine法の間でバラツキの差が少ないのは前述の判定法をとつたため

で, ふつうの完全耐性をとると routine法では卵培地, 寒天培地ともバラツキがひどくなる。こうした判定法は少しなれば容易で, routine法の成績から actual count法の成績をほぼ的確に予言することが可能である。要は対照に比して発育が急激に減じる前の段階をとればよい。発育状態はかなりのフレがあるから, みかけ上の完全耐性にこだわるとかえつて誤りの原因となる。actual count法の利点は判定が明確で主観の入る余地がないことにあるといえよう。

(a) いま, 卵培地 routine法のKM耐性の定義を100 µg耐性ととり(東村⁶⁾), 寒天培地の耐性の定義を10 µg耐性ととれば, 図1から3例の例外を除いて, 耐性, 非耐性の判定は両者で一致する。一致率は74/77 (=96%)である。

(b) 卵培地 actual count法のKM耐性を50 µg耐性とし(東村³⁾⁴⁾, 寒天培地での耐性を10 µg耐性とすれば, 両者の一致率は同じく96% (74/77)となる。

すなわち, 卵培地法と寒天培地法の判定は非常によく一致する。

本報では耐性の段階を細かくとつたが, かんたんに卵培地でKM 100 µg/ml, 寒天培地で10 µg/mlをとつたとしても, 耐性の判定は両者でよく一致する。卵培地 routine法と寒天培地法の一致率は上述と同じく96% (74/77)である。KM 100 µg/mlのみをとつて, 50 µg/mlをとらないと, 卵培地 actual count法の判定はややきつくなるため, 一致率は94% (72/77)となる。な

Table 2. Comparison Between Egg Medium and Modified Kirchner Agar Medium for the Direct Method of Kanamycin Drug Resistance Test

Medium inoculation #	Egg medium routine method	Egg medium actual count method	Kirchner medium routine method
Rate of success in resistance test	$\frac{78}{90}$ *	$\frac{78}{90}$ *	$\frac{79}{90}$ *
Number of cases read as kanamycin resistance	$\frac{19}{77}$ x	$\frac{23}{77}$ xx	$\frac{22}{77}$ xxx
Ratio of agreement in reading	$\frac{74}{77}$ (96%)	$\frac{74}{77}$ (96%)	$\frac{74}{77}$ (96%)
Ratio of resistance level read (µg/ml) (Average in 64 cases)	8.2 0.94	8.7 1.0	1.0 0.15
Number of contaminated cases	$\frac{15}{90}$	$\frac{15}{90}$	$\frac{26}{90}$
Growth amount or colony number in control medium	$\frac{55}{90}$ (better in egg medium)		$\frac{15}{90}$ (between in Kirchner agar)

Egg medium method had a handicap in use of a less size of inoculum and in omission of neutralization of alkalinized sputum.

* Success in three methods: 77 cases.

x Resistance more than 100 µg of kanamycin per ml.

xx Resistance more than 50 µg of kanamycin per ml.

xxx Resistance more than 10 µg of kanamycin per ml.

お、五味ら⁹⁾のいうごとく KM 5 μg 耐性を耐性と判定すると卵培地との不一致がかなりふえる。したがって卵培地の成績から考えると、KM 5 μg を耐性とするのはやや甘い定義であるように思われる。

上述のごとく、卵培地法と寒天培地法の判定ははなはだよい一致率を示すのであるが、少数の例外が経験される。たとえば卵培地 actual count 法で KM 20 μg 耐性のものが、寒天培地で 100 μg 耐性とできるものがあり、また卵培地で 50 μg 耐性でありながら寒天培地で 2 μg 耐性にすぎぬものもある。これらの不一致は実験のエラーかもしれないが、卵培地と寒天培地とでその態度を異にする菌の存在の可能性も否定できない。この点向後の検討を要する。

2. 耐性測定の成功率

成功率は表2のごとく、卵培地 78/90、寒天培地 79/90 で後者が1例多いが、この1例は寒天培地で5集落を示す例であつた。他に寒天培地でのみ1~2集落を対照培地に示した例が2例ある。一方、卵培地でのみ60集落以上を示し、寒天培地で全然発育のないものが1例あつた。また逆の場合も1例あつた。寒天培地で1~5集落のものが3例あつたのは、寒天培地の接種量が約4倍(量は5倍であるが、中和のさいの希釈を補正すると約4倍となる)であつたためと、中和を行なつたためと思われる。このような条件で寒天培地が有利であつたとはいえ、精製寒天と血清を用いた寒天培地の発育は意外によかつたことは注目される。しかし発育量や集落数の点では卵培地に劣つた。

前に著者は粉末寒天(検査指針の指定は粉末寒天)とアルブミンを用いた寒天培地を用い、その発育量、検出成績が卵培地にはるかに劣ることを経験した。したがって、寒天培地を用いるさいには寒天の種類に細心の注意を払い、かつ血清を使用することが必要と思われる。こうした寒天培地が優秀なものであることは疑いないが、一方では操作が繁雑で経費を要する。しかしなぜ操作がかんたんな卵培地を用いないのか(検査指針によれば)ということも同時に起こる疑問である。

なお卵培地(われわれの処では最近 Löwenstein 変法培地¹⁴⁾を用いている)と寒天培地との優劣は同一処理を行なつた喀痰液(中和したもの)を同量接種して比較検討する必要がある。

3. 卵培地と Kirchner 寒天培地の耐性度の比

各例について両者の耐性度の比を出し、これを平均(64例)すると(ただし卵培地 1,000 μg 耐性、寒天培地 100 μg 耐性の例は除外した)、卵培地 actual count 法: 寒天培地=8.7、卵培地 routine 法: 寒天培地法=8.2 で、卵培地の耐性度は寒天培地のその8~9倍である。

4. 発育量

発育量および集落数は卵培地(routine法)のほうが寒天培地より多い。この結果は、卵培地のほうに接種量1/4、中和なしのハンディキャップをつけたにもかかわらず、この成績が得られた。ただし検出率は接種量の多い寒天培地のほうがやや大きい傾向を示した。(5%危険率では差は有意でない)

5. 雑菌混入率

雑菌混入率は各例9本(actual count法では27本)の中で1本でも汚染したものを数えた。前処理を4% NaOH 等量としたためか、雑菌混入率はやや高かつたが卵培地のほうが明らかに寒天培地より少なかつた。(表2)

総 括

以上の成績から、卵培地法と寒天培地法の KM 耐性検査成績の判定は非常によく一致することが判明した。卵培地 routine 法で KM 100 $\mu\text{g/ml}$ 耐性以上、卵培地 actual count 法で KM 50 $\mu\text{g/ml}$ 耐性以上、寒天培地法で KM 10 $\mu\text{g/ml}$ 耐性以上を KM 耐性と定義すれば、判定は96%の一致率を示した。雑菌混入率は卵培地のほうが少なく、菌の発育量、集落数も卵培地のほうがまさつた。したがって卵培地による KM 耐性検査は寒天培地法にまさるとも劣るものではないと考えられ、臨床実用の目的には卵培地 routine 法で十分事足りると思われる。

文 献

- 1) 衛生検査指針, I. 細菌・血清学的検査指針 (IV) p. 22, 昭 33.
- 2) 小川辰次・沢井武・島田英彦: 結核, 33: 749, 昭 33.
- 3) 東村道雄: 医学と生物学, 49: 87, 昭 33.
- 4) 東村道雄・安保孝・勝沼六朗: 結核, 34: 625, 昭 34.
- 5) 東村道雄: 衛生検査, 9: 134, 昭 35.
- 6) 東村道雄: 結核, 35: 109, 昭 35.
- 7) 田坂章吾: 医療, (増) 15: 107, 昭 36.
- 8) 東村道雄: 日本胸部臨床, 21: 533, 昭 37.
- 9) 五味二郎・熊谷敬: 結核, 30: 58, 昭 36.
- 10) 中井毅(国立療養所特殊研究班): 結核, 37: 568, 昭 37.
- 11) 東村道雄: 結核, 35: 397, 昭 35.
- 12) 東村道雄・河西栄文: 結核, 36: 38, 昭 36.
- 13) 安保孝・東村道雄: 結核, 36: 129, 昭 36.
- 14) 東村道雄: 結核, 37: 278, 昭 37.

Comparison Between Egg Medium and Kirchner Agar Medium for the Direct Method of Kanamycin Resistance Test

“Routine method” (Tsukamura, M.: *Kekkaku*, 35: 109~112, 1960) and “actual count method” (Tsukamura, M.: *Med. & Biol.*, 49: 87~90, 1958; Tsukamura, M., Abo, T., and Katsunuma, R.: *Kekkaku*, 34: 625~633, 1959) of kanamycin resistance test by egg medium proposed by the authors were compared with the Kirchner agar method proposed by the Committee for Resistance Tests (Eiseikenshishin, 1958). Some modification in method was made to use the same sputum specimen for these two media. Some handicap was given to the egg medium method to compensate for a smaller size of inoculum and omission of neutralization of sputum.

Sputa were added with about one volume of 4% NaOH and homogenized. The resulting alkaline sputum fluid was inoculated to Ogawa's egg medium with a spiral loop delivering 0.02 ml (routine method). The sputum fluid was then diluted to give 10^{-2} and 10^{-3} dilutions. Each 0.02 ml sample of these dilutions and the original sputum fluid (10^0 , 10^{-2} and 10^{-3}) were inoculated with the spiral loop to egg medium containing graded concentrations of kanamycin (see Figures). The media inoculated were stoppered with rubber cap immediately and incubated at 37°C for 6 weeks. On the other hand, a series of Kirchner agar medium were inoculated with 0.1 ml sample of the original sputum fluid neutralized by the addition of 8% HCl (phenol red was used as an indicator). The tubes were incubated for 48 hours to dry up the medium surface and then stoppered. Thereafter the incubation was made at 37°C for 6 weeks.

Determination of resistance levels was made as follows: (Routine method in egg medium and Kirchner agar medium) If growth was totally or par-

tially confluent in control medium, the highest concentration of drug on which many discrete colonies grew was taken as the resistance level. If growth was consisted of many discrete colonies in control medium, the highest concentration on which more than 150 colonies grew was taken as the resistance level, and if growth was less than 150 colonies in control medium, the highest concentration on which any growth took place as the resistance level. (Actual count method) Resistance level was expressed as the highest concentration on which small inocula as will produce 10 to 150 colonies can give any growth. According to our experience previously described (Abo, T., and Tsukamura, M.: *Kekkaku*, 36: 129~131, 1961), the above method of determination was adopted so as to obtain, by routine methods, the results as similar as possible to those by the actual count method.

The results are shown in Figures 1 and 2 and Table 2.

The resistance tests agreed well among these three methods only when the above criterion was applied, but not in the case when the usual “complete resistance level” was employed, the latter having been proved as indicating no real complete resistance level by the actual count method. Data regarding resistance determination agreed at a rate of 96 per cent between the egg medium method and the Kirchner agar method. Resistance level of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by the egg medium method, which was described by the authors previously as the resistance level from the clinical view points, was regarded as equivalent to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ level by the Kirchner agar method. The egg medium showed less contamination rate (Table 2).

Since the egg medium method is readily utilizable, the routine method by egg medium is suitable for clinical purposes.