

以上の通り、#10を除いて他の株は5種の T. O. に対して同様の抗菌スペクトルを持つているが、#10は、他の9株より広いスペクトルを有し、Sar. lutea に対して僅かに抑制物質を産している。

### 結論及び考按

1) 採集地の金武村は隆起珊瑚地帯に出来た洞窟の多い酸性土壌である。今回の土壌は採集後、長時間経過しており、放線菌は5資料(分離率20.8%)より10株分離し得たのみである。

2) 一般に、各T.O.に対する阻止物質産生の最大ピークは、静置培養後72~120時間の間に在るが、#10のみは120時間後に僅かに上昇していく。

3) 被検菌の T. O. に対する態度は10株とも似てお

り、E. coli, Bacillus sp. に稍々強く、St. aureus には稍々弱く、Sar. lutea, C. albicans には殆んど阻止帯をつくらなかつた。そのうち#10のみはSar. lutea に対して、弱い抵抗物質を産生した。これ等分離放線菌株は強力な抵抗物質産生能に乏しいものであるのか、静置培養、培地組成、その他種々の欠陥のためか、いずれか判断し難い。特に抗生物質の産生は Chloramphenicol やその他の抗生物質の如く、振とう培養に用いられる培地の C-源、N-源の種類に影響されるので、他の培地との比較に就いては別紙に報告する。

### 文 献

梅沢兵夫 細菌学(総論)抗生物質  
伝染病研究所学友会編、細菌学実習提要

## 寒天平板による結核菌の迅速耐性検査成績 と斉藤氏の基礎実験

琉球衛生研究所 細菌部

仲 地 国 夫

### 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日がかりすぎることが、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 Wright の Slide cell culture 法、Pryce や Berry、Lowry らの Slide culture 法、植田の遠心管内培養法に基礎をおいたもの、小川の変法重層培地法、還元色素法、濾紙法を応用したもの等多々あるが、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、遠心、染色等の手技の面倒なものが多く、濾紙法を除いては大きな欠点といわれている。

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、Middle-Drook ら、Dubos ら、Roberts らが試みているが、高橋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。私は保健所より依頼のあつた17例の分離菌株について間接法を試みたのでその成績と斉藤氏の基礎実験について報告する。

### II 実験方法

#### 1 培 地

変法Ⅲキルヒナー寒天培地(小川ら)。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といわれている。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1磷酸カリウム	1.0g
第2ククナトリウム	0.3g
硫酸マグネシウム	0.06g
クエン酸ナトリウム	0.25g
アスパラギン	0.5g
グリセリン	1.5ml
0.1%マラカイト緑液	0.25ml
Bacto Agar (Difco)	1.5g
蒸 溜 水	100.0ml

以上を溶解、コツホ釜で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、2.5ml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 0.05ml 加えると pH6.7~7.0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。

培養方法

菌液

菌液は、磨砕コルペンによるいわゆる手振り法を用い蒸留水で1mg/mlとし、これを基本として培養を行なった。接種1～2日後、培地表面がほぼ乾いたところでシャーレを4～8枚一緒に、ポリエチレンの袋に入れ逆さに置き、ゴムでしばり培養を続けた。

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で鏡検し、培地の表面に發育している顕微鏡的集落をみて判定した。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、判定した。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～無数

ロ) 肉眼的集落

- + 集落の数えられる場合でおよそ200コくらいまで
- ++ 培地に生えた集落を全部あわせて、培地全面積の約3分の1くらいの場合
- +++ 培地に生えた集落を全部あわせて、培地全面積の約2分の1くらいの場合
- ++++ 培地全面積に發育しているが、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

変法キルヒナー寒天培地による結核菌耐性試験成績表  
(間接法による)

菌株	SM		PAS		INH		Control
	10 <sup>7</sup>	100 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	5 <sup>7</sup>	
(1)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(2)	+	+	+++	+++	++	++	+++
(3)		集落数	少ない	ため	判定	不能	
(4)		〃	〃	〃	〃	〃	
(5)	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
(6)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(7)	+++	+++	+++	+	+++	+	+++
(8)	++	+	+++	+++	+++	+++	+++
(9)	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
(10)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
(11)	+	+	+	+	+++	++	+++
(12)	+++	+	+++	+++	+++	+	+++
(13)	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
(14)	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
(15)	+	+	+++	+	+++	+	+++
(16)	++	+	+++	+++	+++	++	+++
(17)	++	+	+++	+++	+++	+++	+++

表1 接種方法の検討

患者番号 ガフキー番号	A		B		C	
	4%NaOH 処理そのまま 0.05cc接種	4%NaOH 処理、蒸留 水で2倍に 希釈0.1cc 接種	4%NaOH 処理、蒸留 水で4倍に 希釈0.2cc 接種			
(1) G 3号	++ 40 $\mu$	+++ 40 $\mu$	+++ 40 $\mu$			
(2) G 1号	++ 60 $\mu$	++ 60 $\mu$	+++ 60 $\mu$			
(3) G 7号	+++ 54 $\mu$	+++ 54 $\mu$	+++ 60 $\mu$			
(4) G 7号	+++ 50 $\mu$	+++ 50 $\mu$	+++ 50 $\mu$			
(5) G 6号	+++ 54 $\mu$	+++ 54 $\mu$	+++ 54 $\mu$			
(6) G 7号	+ 20 $\mu$	+ 20 $\mu$	++ 25 $\mu$			
(7) G 5号	+ 60 $\mu$	++ 60 $\mu$	++ 60 $\mu$			

注：欄中の+～+++は顕微鏡的集落をまた数字はコードの長さを示す。

斉藤氏の基礎実験

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

変法Ⅲ培地は本来培地 5ml に対して、4%NaOHで前処理した喀痰を 0.1ml 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 2.5ml 宛分注されているので、4%NaOH処理の喀痰を0.05ml 接種すればよいわけである(表1A)。しかし、0.05ml では培地の1区画全面をうるおすには少なすぎる。

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0.1ml を接種した場合(表1B)と、4倍に希釈してその0.2ml 接種した場合(表1C)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

表2 菌液を階段希釈した実験

菌株	希釈倍率	培地		小川培地
		7日 (顕微鏡的)	28日 (肉眼的)	
H <sub>37</sub> R <sub>v</sub> 株	10 <sup>1</sup>	++++	++++	++++
	10 <sup>2</sup>	+++	+++	+++
	10 <sup>3</sup>	++	++	++
	10 <sup>4</sup>	+	+	+
喀痰よりの新鮮 分離菌株(1)	10 <sup>1</sup>	++	+++	+++
	10 <sup>2</sup>	+	+++	+++
	10 <sup>3</sup>	+	++	++
	10 <sup>4</sup>	—	120	59
喀痰よりの新鮮 分離菌株(2)	10 <sup>1</sup>	++	+++	+++
	10 <sup>2</sup>	+	+++	+++
	10 <sup>3</sup>	10	131	137
	10 <sup>4</sup>	—	25	16
喀痰よりの新鮮 分離菌株(3)	10 <sup>1</sup>	++	+++	+++
	10 <sup>2</sup>	+	+++	+++
	10 <sup>3</sup>	3	110	105
	10 <sup>4</sup>	—	23	15

Dの大きさはA、B、C 3つの処理法の間に着明の差はないが(2)(3)(6)の例のようにCの方法すなわち0.2ml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ったし、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、0.2ml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。

#### 菌液を階段希釈した実験

菌液を接種する場合、どのくらいの希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菌株を使い、蒸留水で1mg/mlの菌液を作りそれを階段希釈し、シャーレの1区画に0.2ml宛接種したが、表2のように保存菌株以外は10<sup>3</sup>倍希釈のものは、迅速法では顕微鏡的集落数

が少なすぎるし、10<sup>1</sup>倍希釈では、濃すぎて鏡検のさい視野が汚くなるので、結局10<sup>2</sup>倍希釈(0.1mg/mlのものを0.2ml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とときどきあるが、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で、ポリエチレンの袋を用いた。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枚ないし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 寒天の比較

製品名		Bacto agar (Difco)	A 寒天 (邦製)	B 寒天 (邦製)	
寒天の混入濃度		1.5%	1.5%	1.5%	1.0%
患者番号 ガフキー番号	希釈倍数				
(1) G 5号	{ 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	+ ++ (78)	+ ++ (74)	+ ++ (80)	+ ++ (78)
(2) G 2号	{ 10 <sup>1</sup> 10 <sup>2</sup>	+ (6) - (1)	+ (6) - (0)	+ (15) - (1)	+ (80) - (1)
(3) G 6号	{ 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	+ ++ (75)	+ ++ (96)	+ ++ (88)	+ ++ (85)
(4) G 6号	{ 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	+ (80) - (4)	+ (62) - (9)	+ (120) ※ - (16) ※	+ (126) ※ - (21) ※

注:

1) ( ) 外は迅速法による集落数、( ) 内は5週後の内眼的集落を示す。

2) ※は微小集落を含む事を示す。

#### 寒天の比較

寒天の濃度はBacto-Agar (Difco) 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う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、もつばら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ます。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。なほ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。

#### 実験成績

今回の変法キルヒナー培地を用いて行つた結核菌の間接耐性試験の成績を一括して第3表に示した。大要を説明すると、SMに対してはNo11、15株を除けば殆どの菌株が耐性を獲得しているようである。就中No1、5、6、9、の4株は完全耐性である。PAS及びINHに対しても殆どどの菌株が耐性を獲得している。

#### 考察及び結論

今回の実験ではNo15株がSMに対して感受性がある外は各剤に対して耐性菌が多かつた、しかしこれは変法キルヒナー培地を使用しての成績であり従来まで行つていた小川培地による耐性試験の結果と比較できなかつたので、耐性判定の域をどの点におくか、又使用する培地、試薬によつても多少の変化は免れないので爾後の検討を必要とする。詳細は次報で報告する。

#### 参考文献

齊藤直蔵 : 結核 34 (8) 574pp 1959  
全 上 : Ibid 34 (10) 686pp 1959