

クロラムフェニコール添加増菌培地を用いた 効果的な赤痢保菌者検索

内村真佐子¹⁾ 三瓶 憲一¹⁾ 小岩井健司¹⁾ 矢崎 廣久¹⁾
七山 悠三¹⁾ 堀川 彰臣²⁾ 渡辺寿恵子²⁾ 竹田 敏晴²⁾
小林 宗則²⁾ 鈴木 鴨枝²⁾ 岡田 知子²⁾ 佐々木熙夫²⁾
鷺谷 健次²⁾

A Survey of Healthy Shigella Carrier Using Enriched Medium Supplemented with Chloramphenicol

Masako UCHIMURA, Kenichi SANBE, Kenji KOIWAI, Hirohisa YAZAKI
Yuuso NANAYAMA, Akiomi HORIKAWA, Sueko WATANABE, Toshiharu
TAKEDA, Munenori KOBAYASHI, Nobue SUZUKI, Tomoko OKADA,
Hiroo SASAKI, Kenji SAGITANI.

I はじめに

一般に赤痢の伝染は、ヒトを介した水平伝播様式をとることから、患者及び保菌者の早期発見は集団発生防止のために重要である。又患者発生に際しては、患者周辺の保菌者検索を確実な方法で行ない患者の続発を防止することが、流行の拡大を抑えることにつながる。

現在赤痢検査には主にSS培地が使用されているが、より効果的な選択培地に関する研究は古くから行なわれている。安原¹⁾は、1967年赤痢菌の多くがクロラムフェニコール（以下CMと略）耐性を示すことを利用し、CMを50 μ g/mlに加えたセレナイト培地を用いて赤痢菌検出を試み、村瀬ら²⁾は1970年、CM加BTB培地を保菌者検索に応用している。更に田波ら³⁾は、閉鎖集団における赤痢流行時の保菌者検索にCMを5 μ g/mlに添加したGNBroth増菌法を用い、直接培養法に比べ赤痢菌が高頻度に分離できたことを報告している。

本報では、CM添加GNBrothの赤痢菌増殖用培地としての有効性を再検討すると共に、集団発生時の保菌者検索に応用したので、その結果を報告する。

II 材料および実験方法

1. 有効性の検討：菌株は、患者由来保存株を使用した。

- 1) 千葉県衛生研究所
2) 千葉県木更津保健所
(1983年10月28日受理)

被検菌をTrypticase soy broth (Becton, Dickinson and Company) で37°C一夜培養し、PBS (-) (ニッスイ製薬K.K)で適宜希釈後、その0.1mlをGN broth (Becton, Dickinson and Company) に接種した。GN brothのCM濃度は、特に指定のない限り10 μ g/mlとした。分離用培地はSS培地(ニッスイ製薬KK)を用い画線培養した。

2. 保菌者検索時のCM濃度の検討：保菌者検索時に増菌培地に添加するCM濃度の検討は、SS培地に塗抹後の直採スワブを3mlのグリセリン食塩水に浸漬し、よく攪拌後その0.7mlを10mlのGNBrothに接種し、37°C一夜培養後1白金耳量をSS培地に塗抹した。

3. 保菌者検索：保菌者検索は、直採スワブをSS培地に塗布後直ちにCM添加GNBroth(5あるいは10ml)に入れ、37°Cで20時間培養後SS培地で赤痢菌検出を行なった。

III 結果

1. GNBroth中での赤痢菌及び大腸菌の増殖に対するCMの影響

CM耐性ソネ菌sh 430(最小発育阻止濃度一以下MICと略一200 μ g/ml)を、CM添加GNBroth及び無添加GNBroth各5本に、10²コ/mlの濃度に接種し、37°Cで培養しながら経時的に菌数を測定した。sh 430の増殖曲線は図1に示す如く、CM添加の有無には関係なくほぼ等しいものであった。同様CM感受性(M-

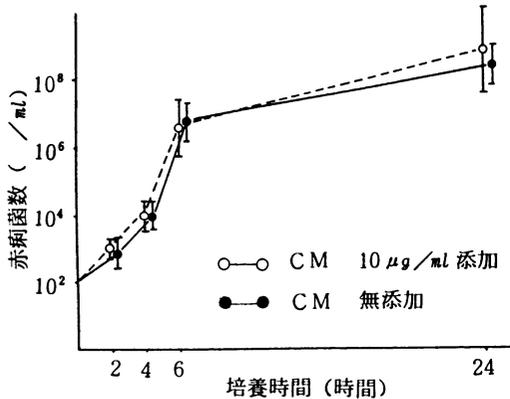


図1. CM耐性ソネ菌のGN Broth 中での増殖

IC 3.2 μg/ml 以下) 赤痢菌 (sh.flexneri 3株、sh.sonnei 2株) 及び大腸菌 4 株を用いて増殖実験を行なった。これらの菌株はすべて、CM無添加GN Broth 中で明らかに増殖しているのに比べ、CM添加GN Broth 中では増殖が見られず培養時間の延長と共に菌数がわずかず減少した。(図2、図3)

2. CM添加GN Brothの赤痢菌増菌効果

保菌者検索にCM増菌法を応用するとき、腸内常在細菌の影響を考慮する必要がある。そこで、大腸菌との混合培養における赤痢菌の増菌効果を検討する目的で、乳

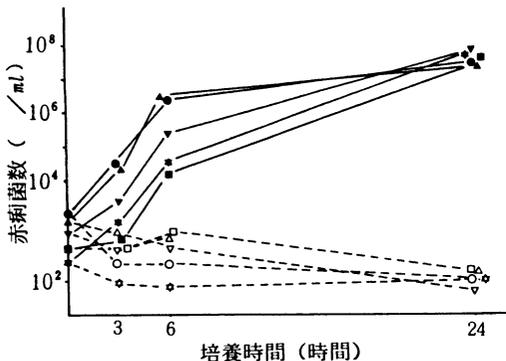


図2. CM添加GN Broth における CM感受性赤痢菌の増殖

●-●, ▲-▲, ■-■, ▼-▼, ★-★ …… CM無添加GN Broth
○-○, △-△, □-□, ▽-▽, ☆-☆ …… CM添加GN Broth

糖非分解大腸菌を一定量加えたGNBrothに、CM耐性赤痢菌の可変量を加え37°Cで培養した。培養開始後、0・6・24時間後に一白金耳量をSS培地に塗抹培養し、無作為に釣菌した5コロニーの性状を調べた。CM感受性大腸菌との混合培養で、直接培養に相当する0時間で

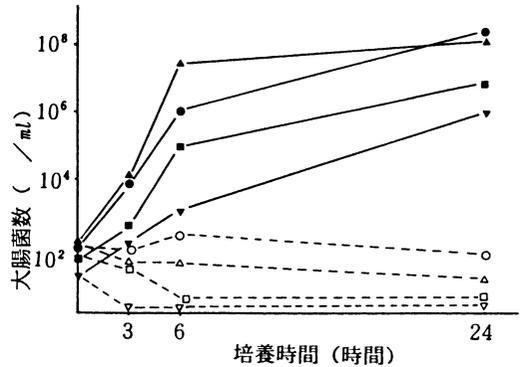


図3. CM添加GN Broth における CM感受性大腸菌の増殖

●-●, ■-■, ▲-▲, ▼-▼, CM無添加
○-○, □-□, △-△, ▽-▽, CM添加

は、10²コ/ml以上の赤痢菌が含まれていなければ菌検出はできなかった。それに比べCM添加GNBrothを用いた増殖後は、数コ以下の濃度でも十分検出が可能であった。しかし、CMを含まないGNBrothは増菌効果がみられず、むしろ直接培養の方が赤痢菌検出率は良好であった。(表1) 一方、CM耐性大腸菌との混合培養では、CM無添加の有無にかかわらず、GN Brothの赤痢菌増菌効果は認められなかった。(表2)

表1. CM添加GN Brothの増菌効果、

1) CM感受性大腸菌 a)との混合培養

Sh-sonnei 接種菌数 コ/ml	Sh-sonnei 数/検査株数				
	直接培養 (oh)	CM(-)6h	CM(-)24h	CM(+6h)	CM(+24h)
3 × 10 ⁶	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3 × 10 ⁵	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3 × 10 ⁴	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5
3 × 10 ³	4/5	4/5	1/5	5/5	5/5
3 × 10 ²	1/1 ^{b)}	0/5	0/5	5/5	5/5
3 × 10 ¹	- c)	0/5	0/5	5/5	5/5
3 × 10 ⁰	-	0/5	0/5	5/5	5/5
3 × 10 ⁻¹	-	0/5	0/5	2/2 ^{b)}	5/5
3 × 10 ⁻²	-	0/5	0/5	-	5/5

a) 大腸菌 (Lac⁻) を 1 × 10⁷/ml に接種
b) 分離平板上のコロニー数が5コ以下であった。
c) 平板上にコロニーは生育していなかった。

3. 保菌者検索に効果的なCM濃度の検討

某施設での赤痢集団発生に伴う保菌者検索を、SS培地、1%白糖加SS培地を用いた直接培養及びCM濃度の異なるGNBrothを用いた増菌培養を併用して行なった。表3に検索成績を示し、表4に使用培地毎の赤痢菌検出数及び分離培地上に疑わしいコロニーが出現したため確認

表2. CM添加GN Brothの増菌効果
2) CM耐性大腸菌^{a)}との混合培養

Sh-sonnei 接種菌数 コ/ml	Sh-sonnei 数 / 検査株数					
	直接培養 (oh)	増 菌 培 養				
		CM-16h	CM-24h	CM+16h	CM+24h	
1×10 ⁷	5/5	2/5	2/5	3/5	2/5	
1×10 ⁶	4/5	2/5	0/5	1/5	0/5	
1×10 ⁵	3/5	0/5	0/5	2/5	0/5	
1×10 ⁴	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	
1×10 ³	1/4	0/4	0/5	0/5	0/5	
1×10 ²	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
1×10 ¹	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
1×10 ⁰	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

a) 大腸菌 (Lac-) を 1×10⁴/ml に接種

培養を行なった件数を示した。検便を行なった42例のうち、11例から赤痢菌が検出された。直接培養は菌陽性であるにもかかわらず増菌培養後は陰性であった2例の直接培養所見は、SS培地上のコロニーが少なく3～5であった。又、増菌培養のみ陽性の2例のうち1例は、直接分離培地上に赤痢菌及び他の雑菌が完全に重なって生育しており、単一集落を釣菌できなかった例であり、他の1例は、赤痢菌は生育していたが類似集落も多数生育していたため区別ができず、赤痢菌を釣菌しなかった例である。2例共、10μg/mlのCM添加によって雑菌の発育が阻止され、増菌培養後の分離平板上には赤痢菌が純培養状に生育していた。このように赤痢菌検出数は、直接培養増菌培養共に9例であったが、確認培養を行なった数は直接培養法ではSS培地に白糖を加えた場合が少なく、10μg/mlにCMを添加したGNBroth増菌後はさらに少ない結果が得られた。

表3. 直接培養及びCM添加増菌法による保菌者検索成績

培 養 方 法		検 体 数
直 接	増 菌	
+	+	7
-	-	31
+	-	2
-	+	2
合	計	42

表4. 赤痢保菌者検索における増菌培養の効果

培 養 方 法	培 地	赤痢菌陽性数 / 赤痢菌類似コロニー出現平板数 / 検査数
直 接	SS (白糖加)	9 / 20 / 42
	SS	9 / 30 / 42
増 菌	GN(CM-)	3 / 24 / 42
	GN(CM 3μg/ml)	8 / 15 / 42
	GN(CM 10μg/ml)	9 / 12 / 42

4. CM添加GNBroth増菌法の応用

CM耐性赤痢菌による集団発生に関連した保菌者検索及び退院時検便を、SS培養による直接法及び10μg/ml CM添加GNBroth増菌法を併用して、延べ906名について実施した。結果の比較を表5に示す。906例のうち7例では、直接法・増菌法共に赤痢菌が検出され9例は増菌法でのみ菌が検出された。しかしX²検定の結果では、増菌法による菌陽性率(1.77%)と直接法による陽性率(0.77%)との間には有意差は認められなかった。(P=0.05)

表5. 直接培養及びCM増菌法による赤痢保菌者検索成績

培 養 方 法		検 体 数
直 接 (SS)	増 菌 (CM 10μg/ml)	
+	+	7
-	-	890
+	-	0
-	+	9
合	計	906

IV 考察

赤痢患者数は、この30年間に激減した。千葉県における散发患者発生数は、1978年以後海外旅行ブームと共に増加の傾向にあるものの年間20件程度である。しかし、この菌の伝染はヒトを介した水平伝播様式をとり、ごく少量の菌でも感染をおこすことから、特に閉鎖施設内などでの流行は規模が大きく、終息までに長い経過をとる傾向にある。そこで集団赤痢の終息を速やかなものとするためには、患者周辺の保菌者検索を迅速かつ効果的な方法で実施することが重要である。

本報では、CM耐性赤痢菌による集団発生時の保菌者検索に、CM 10μg/ml添加GNBrothによる増菌法を応用し、906例中16例から赤痢菌を分離することができた。本法による赤痢菌検出率は、直接培養法に比べ2.3倍であった。これは統計学的な有意差ではないが、直接培養法でのみ赤痢菌が検出される例はごく少ないと考えられることから、我々は、CM増菌法は排菌数の少ない保菌者からの赤痢菌検出に有用な方法であると考えられる。

増菌培地に抗生物質を添加することは、薬剤感受性の雑菌の増殖を抑え、検査対象となる菌を増殖させることが目的であるので、添加する抗生物質の種類は検出した菌の薬剤耐性型に従って選択することができる。しかし、薬剤の選択に当たっては、腸内細菌に耐性菌が少ない事、培地成分あるいは培養温度による変性失活がない事

などを考慮に入れる必要がある。今回我々は、赤痢菌の多くが耐性を示すにもかかわらず、多くの腸内細菌には耐性菌の少ないCMを用いて試験を行ない、増菌培地に添加するCM濃度は3 μ g/mlより10 μ g/mlの方が赤痢菌検出率が良好であるという結果を得た。それは、多くのCM感受性腸内細菌に対するCMのMIC値が約3 μ g/mlである事とよく一致する。又、耐性赤痢菌に対するCMのMIC値はほぼ25 μ g/ml以上であるので、増菌培地に添加するCMの濃度は10 μ g/ml以上であれば、目的とする株のMIC値の範囲内で決定してもよいものとする。

GNBrothの適用についてCharlesら⁴⁾及びTairorら⁵⁾は、SS培地による直接分離法に比べGNBroth 6時間増菌法は、赤痢菌検出率を1.5倍上昇させると報告している。しかし、我々の実験によると、CM無添加増菌法はむしろ、直接培養法より菌検出率が低い成績が得られた。同様に赤痢菌以外の乳糖非分解CM耐性菌が多数混在する場合は、例えCMを添加しても増菌効果は期待できないので、直接分離培養法は必ず併用すべきである。また、白糖加SS培地はSS培地に比べ菌検出率は同一であったが、確認培養の手間を少なくすることができる点で優れていた。これは、白糖利用性の乳糖非分解大腸菌及び一部のプロテウス菌と赤痢菌との鑑別が容易になるためと思われる。

以上の結果から、CM耐性赤痢菌による患者周辺の保菌者検索、退院時検便、管理検便に、白糖加SS培地による直接分離培養法及びCM添加GNBroth増菌培養法を併用することによって、確認培養の手間を少なくし、赤痢保菌者検出率を向上させることができると考える。

V まとめ

1. CM耐性赤痢菌の集団発生に伴う保菌者検索に、

CM添加GNBroth増菌法を応用したところ、菌検出率が直接培養法に比べ2.3倍増加した。

2. GNBrothに添加するCM濃度は、10 μ g/mlが適当であった。

3. 増菌時間は6時間24時間共に良い結果が得られた。

4. SS培地に比べ1%白糖加SS培地は、赤痢類似コロニーの出現頻度が少なく、分離用培地として効果的であった。

本論文の要旨は、第21回千葉県公衆衛生学会(1983年3月・千葉)において発表した。

文献

- 1) 安原美王磨(1967): 赤痢菌の一増菌培地について、日本伝染病学会雑誌、41(1)、20-23.
- 2) 村瀬稔、飯田豊、前島健治(1970): 赤痢菌検出手技上の問題点、日本公衛誌、17(13)、1075-1079.
- 3) 田波男也、坂本敏子、石沢孝子、根本紀代美、鈴木尚、大川正行、穴倉義春(1978): 微量抗生物質の生命賦活作用について、一赤痢菌検出用培地の検討一、第16回千葉県公衆衛生学会講演会要旨集、40.
- 4) Charles C. Croft and Mary J. Miller (1956): Isolation of Shigella from rectal swabs with Hajna "GN" Booth, Am, J. Clin. Pathol. 26, 411-417.
- 5) Wetton I, Taylor and Dorothy Schelhart (1967): Isolation of Shigella, by Comparison of plating media with stools. Am, J. Clin. Pathol. 37, 356-362.