

Mycobacteria の Growth phase と INAH の殺菌作用との関係

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

鈴木 鎌三郎・東 村 道 雄

(受付 昭和 30 年 5 月 2 日)

緒 言

Isonicotinic acid hydrazide (INAH) が結核菌に対して殺菌作用を示すことは、INAH の発見当時からひろく知られている。しかしこの INAH の tuberculocidal action と結核菌の growth phase との関係、すなわち INAH が結核菌の growth phase のどのような時期に強い殺菌作用を示すかと云う問題については今迄報告がない。そこでわれわれは growth phase によつて INAH の殺菌作用に差違があるかないかを検討してみた。

実験方法

被検菌は *Mycobacterium avium* 獣調株 (以下 *M. avium*) を使用した。実験方法の詳細は実験成績の各項で述べる。

実験成績ならびに考案

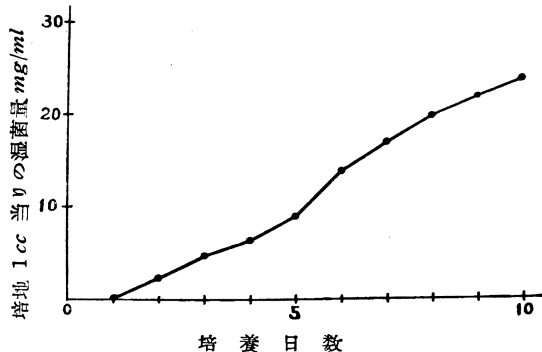
(1) *M. avium* の発育曲線

まず *M. avium* の発育曲線を観察した。*M. avium* は Sauton agar slant 7 日培養菌を、200 ml 容量の Erlenmeyer's flask に分注した 3% glycerine bouillon (3% Glycerine, 0.5% polypeptone, 0.5% meat extract, pH 7.0) 50 ml に各々湿菌量 1 mg 宛接種した。37°C に培養し、毎日 1 コ宛 flask をとり、これにガラス玉を入れて振盪して培養液中に菌膜を均等に懸濁させて Leitz の Rouy-Photrometer, 610 m μ で吸光度を測定し、予め作製した標準曲線により培地 ml 当りの湿菌量 mg を算定した。その結果は第 1 図に示す通りであつて、1 日後は大凡誘導期の終り頃に相当し、以後は対数期に入るものと考えられる。以上の培地 1 ml 当りの湿菌量の算出と同時に菌を集めて、ガラス玉入りコルベンで 10 分振盪し、軽く遠心して上清をとり、生理的食塩水 (生食水) を加えて比濁により湿菌量 1 mg/ml の浮游液を作製した。

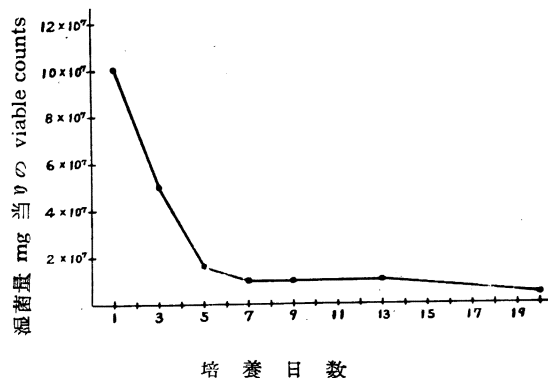
この浮游液を 10⁻⁴ に生食水で稀釈し、その 0.1 ml を 1.5% Sauton 寒天平板培地 (pH 7.0, Sauton 培地に 1.5% agar を添加したもの。Sauton 培地はすべて Asparagine の代りに sodium glutamate を同量使用

した。Sauton agar 20 ml を直径 9 cm の平板に流して平板培地とした) に流し、白金線ローラーで均等にならして、37°C に 5 日間培養して、5 日後に viable

第 1 図 培地 1 cc 当りの湿菌量の変化



第 2 図 湿菌量 mg 当りの viable counts の変化



counts を算出した。viable counts 算定には 1 sample につき平板培地 15—20 枚を使用した。このようにして算出した湿菌量 mg 当りの viable counts の変化は第 2 図の通りである。mg 当りの viable counts は培養 1 日後が最高で以後急に減少し、7 日以後大凡恒常期に入る。すなわち培養 2—7 日の間は発育は対数期で盛に増殖が起る時期であるが (第 1 図)、と同時に発育不能になる菌の数も著しく多いと思われる。7 日以後は生育不能となる菌と新生する菌との比が平衡状態を保つているものと思われる。

(2) *M. avium* の growth phase との INAH の殺菌作用との関係

前述の結果から誘導期の終りと考えられる1日培養菌すなわち young cultures の菌と対数期中にあると考えられる7日培養菌すなわち Older cultures の菌について INAH の殺菌作用を観察した。INAH を作用させる菌液の生菌数が比較的近似であることが望ましいので、予備実験を数回行つて、両者の viable counts が比較的近似している濃度をえらんだ。

実験は次のように行つた。

- (1) 1日菌生食水浮游液……………4.0.
INAH 液, $10\mu\text{g/ml}$ ……………1.0.
- (2) 1日菌生食水浮游液……………4.0.
生食水……………1.0.
- (3) 7日菌生食水浮游液……………4.0.
INAH 液, $10\mu\text{g/ml}$ ……………1.0.
- (4) 7日菌生食水浮游液……………4.0.
生食水……………1.0.

菌液は1日菌および7日菌を集めて、ガラス玉コルベンで振盪した後生食水で、予め概算した結果から、1日菌 0.16mg/ml 、7日菌 0.40mg/ml の浮游液とした。これを 37°C 24 時間放置した後に、遠心と生食水の洗滌とを3回繰返し、最後に再びガラス玉コルベンで振盪して生食水でコルベンを数回洗滌して菌を集め、 $4\times 10^4\text{ml}$ に稀釈した。すなわち最初の浮游液の 10^{-4} 稀釈液とした訳である。これを 0.1ml 宛、1.5% sauton 寒天平板培地に流して、 37°C 5日培養の後 viable counts を算定した。使用した平板培地は前記と同様で、1 sample について 10—12 枚使用した。その結果は第1表の通りであつて、INAH添加例では対照に比して相当の viable counts の減少が認められる。この viable counts の減少を一応 INAH の殺菌作用と定義すれば、INAH $2\mu\text{g/ml}$ 24 時間の作用により、7日菌では約22%、1日菌では約63%が殺菌作用を受けたことになる。すなわち1日菌では対照の平板1枚の viable counts の平均は 744.6 ± 128.5 であり、INAH $2\mu\text{g/ml}$ 作用後では viable counts の平均は 272.9 ± 86.5 であつて、両者

第1表 INAH $2\mu\text{g/ml}$ 中に 37°C 24 時間浸漬し3回洗滌した後の viable counts の変化

| | 1 日 菌 | 7 日 菌 |
|------------------------|------------------|------------------|
| 対 照(生食水) | 744.6 ± 128.5 | 975.1 ± 196.3 |
| INAH $2\mu\text{g/ml}$ | 272.9 ± 86.5 | 757.8 ± 169.5 |

注 1日菌は $0.16\text{mg/ml}\times 10^{-4}$ 、 0.1ml の viable counts、7日菌は $0.40\text{mg/ml}\times 10^{-4}$ 、 0.1ml の viable counts を示す

の間に有意の差がある。これに対して、7日菌では、対照の平板1枚の viable counts は 975.1 ± 196.3 であり、INAH $2\mu\text{g/ml}$ 作用後では viable counts は 757.8 ± 169.5 であつてこの間には有意の差は認められない。したがつて1日菌すなわち young cultures の菌(誘導期の終り)にたいする INAH の殺菌作用は7日菌すなわち older cultures の菌(対数期後半と考えられる)に対する殺菌作用よりも著しいと考えられる。

結 論

Mycobacterium, avium (獣調株)で growth phase と INAH の殺菌作用(viable counts の減少)との関係を検討した。1日培養菌すなわち young cultures の菌(誘導期の終り)は、7日培養菌すなわち older cultures の菌(対数期後半)に比較して、INAHの殺菌作用を著明にうけた。

御指導下さつた勝沼六郎院長と日比野進教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Steeken, W. Jr., and Wolinsky, E.: Amer. Rev Tuberc, 65 (4): 365, 1952.
- 2) 結核の化学療法(結核新書第19集)医学書院, 東京, 1953.
- 3) Burrows, W.: Jordan-Burrows Text book of Bacteriology, W. B. Saunders Camp, Philadelphia, 1950.