

結核菌の化学療法剤に対する耐性検査法に関する研究

とくに Kanamycin および Viomycin の抗菌活性に及ぼす諸因子の検討

杉 山 育 男

国立神奈川療養所 (指導 伊藤忠雄博士)

受 付 昭 和 34 年 10 月 5 日

緒 言

Kanamycin (KM) は長野県の土壌から分離された放線菌 *Streptomyces kanamyceticus* の産生する水溶性塩基性新抗生物質である。KM の抗菌スペクトルはその最少発育阻止濃度 (MIC) でみるとグラム陽性菌および陰性菌に広く抗菌性を示し^{1)~3)}, 各種の急性感染症に対し奏効することはすでに動物実験^{2) 4)} および臨床成績^{5)~10)} の示すところである。

一方結核菌に対してもかなりの抗菌力を示すことが観察されており^{3) 11)}, その MIC は菌株および培養条件により差異が認められるがおおむね 1~2 γ/ml を示している。

また KM はモルモット^{12) 13)} やマウス¹¹⁾ の実験的結核症に対し Streptomycin (SM) に匹敵する効果を示し、ことに SM, INH, PAS 耐性結核菌による感染に対しても感受性菌の場合と同様に奏効することが認められ¹³⁾, 逆に KM 耐性結核菌感染にさいして SM が有効に作用することが報告されている¹³⁾。

梅沢¹⁴⁾ も第 34 回結核病学会シンポジウムにおいて抗酸性菌は SM よりやや遅いが、KM でも耐性上昇がはじまるときわめて速やかに上昇し高度耐性を獲得することを認めている。また抗酸性菌においては全く交叉耐性はないが、SM 自然耐性菌と SM 継代耐性菌の KM 耐性獲得の速さに差異のあることを明らかにした。

柳沢¹⁵⁾ は同シンポジウムにおいて KM, Fradiomycin (FM) および Viomycin (VM) の 3 薬剤間における交叉耐性の有無を検討した結果、① KM 耐性菌 H₃₇Rv R-KM 株は試験管内実験では KM には 500 γ/ml 完全耐性であるのに、FM では 100 γ/ml でも不完全耐性であり、動物実験でも KM 耐性菌感染動物において FM が軽微ながら有効である。② FM 耐性菌 H₃₇Rv R-FM 株は試験管内実験では KM にも、FM にもともに 1,000 γ/ml 完全耐性であるにもかかわらず、動物実験では KM は FM 耐性菌感染動物に有効である。③ VM では KM 耐性菌 H₃₇Rv R-KM 株および H₂ R-KM 株に対しても、FM 耐性菌 H₃₇Rv R-FM 株に対しても試験管内では 50 γ/ml 感性であり、H₃₇Rv R-KM および H₃₇Rv R-FM 感染動

物に対しても効果を示すことなどについて述べている。

以上の成績から KM は結核症に対しても優れた新抗生剤としての資格を備えており今後広くしかも長期にわたる使用も考えられる反面、耐性上昇の速やかなことと、さらに他の抗生剤との交叉耐性に関する今後の検討も要望されているため耐性検査はしばしば行なわれることが考えられる。一方使用増地ないしはその組成の影響によつてその MIC にも少なからざる変動がみられることが経験されており、その耐性検査法の確立は急を要するものと考えられる。

KM は熱に対して安定であるが、卵黄中の磷蛋白質に結合して吸着され、したがって鶏卵培地中で抗菌力の減弱することが知られ¹⁶⁾, 結核菌の KM に対する耐性検査には鶏卵培地の使用は不適當であり、Kirchner 寒天培地の使用が奨められている。

VM は個別に発見されたのであるが、2 組の研究者たちによつて *Streptomyces puniceus* および *Streptomyces floridiae* と名付けられる放線菌より産生する抗生物質^{17) 18)} で、KM が広い抗菌スペクトルを有するのに対し、抗酸性菌のみに試験管内および動物体内で抗菌活性を示す。

VM は試験管内および動物体内で SM 感性菌と同様、SM 耐性菌に対して有効であることが知られている^{19)~22)}。また VM の増量継代培養を数代重ねることにより容易に耐性を獲得することが知られ²²⁾, VM による 60~70 日間の治療を受けた感染動物から耐性菌を分離しうることが報告されている²²⁾。SM に比してやや大量を要するも SM と同様に実験結核症に対し有効であることが認められている^{22) 23)}。

Werner ら²⁴⁾ は高度進展の肺結核患者に VM を 30~75 mg/kg, 毎日法で使用したが、VM に対する効果の判定は困難であり、中毒症状の出現が強調された。その後間欠使用による VM の毒性軽減に努力がむけられ、毒性の少ない他の抗結核剤が無効あるいはなんらかの理由で使用不能のとき VM は結核症の治療に価値があるものと考えられるようになった。

最近長期化学療法の実施に伴い各種抗結核剤に対する耐性例が増加し、また外科的療法適応の限界が拡大さ

れ、各種抗結核剤に対する耐性例の外科療法も増加しており、かかるさい VM の使用が要望されており、その耐性検査は等閑に付することはできない現状である。

VMは熱に対して不安定であるという理由から KM と同様に耐性検査には Kirchner 寒天培地の使用が奨められている。

一方 SM は鶏卵培地使用にさいする力価の減弱を予想して2倍量の Dihydrostreptomycin (DHSM) を添加して鶏卵培地により耐性検査を実施しているが、この力価の減弱に関する事項について必ずしも見解の統一はみられていないようである。SM に関してはすでに当所の亀崎²⁵⁾ が加熱による力価の減弱は軽微であるが、磷酸ないし磷酸塩による拮抗がみられ、さらに鶏卵への吸着が SM の抗菌活性に少なからざる影響を及ぼすことなどを発表した。

以上のごとき現状に鑑み、今回私は *Mycobacterium* 607 株を用い、一連の水溶性塩基性抗結核剤である KM, VM の抗菌力に影響を及ぼす 2, 3 の因子について検討し、同時に耐性測定用 Kirchner 寒天培地の適否についても検討を加えた。

実験方法

Kanamycin :

〔実験 I〕

基質として寒天および鶏卵、さらに加熱ならびに磷酸塩の添加が KM の抗菌力に及ぼす影響について検討した。ブイオン、ブイオン寒天、1% および 3% 小川培地による KM の 1,000, 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0 γ/ml の各稀釈系列を準備した。ブイオンおよびブイオン寒天培地では小川培地作製時における加熱凝固と同一条件すなわち 90°C, 1 時間加熱せる系列も用意し加熱による KM 抗菌力への影響をもあわせ観察した。供試菌株はすべて *Mycob.* 607 株を用い 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 稀釈の 0.1 ml を各培地にそれぞれ接種し、37°C に培養、3 日および 5 日でその成績を判定した。

〔実験 II〕

磷酸塩を添加せざる簡単な組成を有する培地として下記 Tarshis²⁶⁾ の血液寒天培地を用い、とくに培地 pH および磷酸塩が KM の抗菌活性に及ぼす影響について検討した。

血液寒天培地 (Tarshis)

バクト・アガール (Difco)	1.5 g	蒸留水	74.0 ml
グリセリン	1.0 ml	ペニシリン	50 u/ml
保存人血	25.0 ml	(pH 6.8)	

培地最終 pH を 6.4, 6.8, 7.2 にそれぞれ調整して、

KM を 100 γ/ml より上記同様の濃度に含有する血液寒天培地の各稀釈系列を準備し、さらに培地の最終 pH を 6.8

に調整し第一磷酸加里を 0.1, 0.3, 0.5 % に添加せる上記同様 KM の稀釈系列ならびに pH を調整せず第一磷酸加里を 0.1 % (pH 6.6), 0.3 % (pH 6.4) および 0.5 % (pH 6.2) に添加せる上記同様 KM の稀釈系列とを準備し、対照に Kirchner 寒天培地を用い、*Mycob.* 607 株の 10⁻², 10⁻³ の 0.1 ml を各培地に接種し、37°C に培養、3 日および 5 日でその成績を判定した。

〔実験 III〕

血液寒天培地を用い正磷酸と第二磷酸曹達²⁷⁾ が KM の抗菌活性に及ぼす影響を 1, 2, 3 % 小川培地と比較検討した。血液寒天培地では培地の pH をすべて 6.8 に調整し、第一磷酸加里に秤量換算して、0.1, 0.3, 0.5 % に正磷酸を添加した上記同様 KM の稀釈系列ならびに 0.1, 0.3, 0.5 % に第二磷酸曹達を添加した上記同様 KM の稀釈系列を準備し、*Mycob.* 607 株の 10⁻² の 0.1 ml を接種し 37°C に培養、対照である Tarshis の血液寒天培地および 1, 2, 3 % 小川培地と比較検討した。

Viomycin :

〔実験 IV〕

培地の最終 pH を 6.4, 6.8, 7.2 にそれぞれ調整したブイオン、ブイオン寒天培地と 1% および 3% 小川培地を用い、培地 pH と加熱ならびに小川培地における磷酸塩の添加が VM の抗菌力に及ぼす影響について検討した。上記培地に VM の 1,000, 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0 γ/ml の各稀釈系列を準備し、ブイオン、ブイオン寒天では 50°C で作製せる系列と小川培地作製時における加熱凝固と同一条件すなわち 90°C, 1 時間加熱せる系列を用意し、培地 pH と加熱による VM 抗菌力への影響を同時に観察した。供試菌は *Mycob.* 607 株の 10⁻², 10⁻³ の 0.1 ml を各培地に接種し 37°C に培養、3 日、5 日、7 日でその成績を判定した。

〔実験 V〕

血液寒天培地を用い、培地 pH および磷酸塩が VM の抗菌活性に及ぼす影響について検討した。培地の最終 pH を 6.4, 6.8, 7.2 にそれぞれ調整して、VM を 100 γ/ml より上記同様に含有する血液寒天培地の各稀釈系列を準備し、さらに培地に第一磷酸加里を 0.1 % (pH 6.6), 0.3 % (pH 6.4) および 0.5 % (pH 6.2) に添加せる上記同様 VM の稀釈系列を準備し、対照に Kirchner 寒天培地を用い、*Mycob.* 607 株の 10⁻², 10⁻³ の 0.1 ml を各培地に接種し、37°C に培養、3 日、5 日、7 日でその成績を判定した。

〔実験 VI〕

血液寒天培地を用い正磷酸、第一磷酸加里および第二磷酸曹達²⁷⁾ が VM の抗菌活性に及ぼす影響を 1, 2, 3

% 小川培地と比較検討した。血液寒天培地では培地の最終 pH をすべて 6.8 に調整し、第一磷酸加里に秤量換算して 0.1, 0.3, 0.5 % に正磷酸を添加した上記同様 VM の稀釈系列ならびに 0.1, 0.3, 0.5 % に第一磷酸加里、第二磷酸曹達を添加した上記同様 VM の稀釈系列を準備し、Mycob. 607 株の 10^{-2} , 10^{-3} の 0.1 ml を接種し 37°C に培養、3日、5日、7日で判定し対照である Tarshis の血液寒天培地および 1, 2, 3 % 小川培地と比較検討した。

実験結果

Kanamycin に関する成績

[実験 I]

表 1 培地内 KM の抗菌力に影響を及ぼす培地の条件 (Mycob. 607, 10^{-2})

培地条件		γ/ml										
		1,000	100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0
ブイヨン	50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	⊘
	90°C, 1時間	-	-	-	-	-	-	-	-	2	+	⊘
ブイヨン 寒天	50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⊘
	90°C, 1時間	-	-	-	-	-	-	-	-	7	⊘	⊘
1%小川	90°C, 1時間	-	-	-	11	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
3%小川	90°C, 1時間	-	-	-	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘

生菌単位数 33×10^5

表 2 培地内 KM の抗菌力に及ぼす pH と磷酸塩の影響 (Mycob. 607, 10^{-2})

培地条件		γ/ml										
		100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0	
血液寒天	pH 6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⊘
	pH 6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⊘
	pH 7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⊘
第一磷酸加里 (pH)	0.1% KH_2PO_4	-	-	-	-	-	-	17	+	+	⊘	⊘
	0.3% "	-	-	-	-	-	48	+	+	⊘	⊘	⊘
	0.5% "	-	-	-	-	+	+	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
第一磷酸加里 (pH)	0.1% KH_2PO_4 (pH 6.6)	-	-	-	-	-	-	20	+	+	⊘	⊘
	0.3% " (pH 6.4)	-	-	-	-	-	+	+	⊘	⊘	⊘	⊘
	0.5% " (pH 6.2)	-	-	-	-	+	+	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
キセル ヒナ 天		-	-	-	-	+	+	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘

生菌単位数 8.5×10^5

その成績は表 1 に示すごとくで、ブイヨン、ブイヨン寒天、1 % および 3 % 小川培地における Mycob. 607 株に対する KM の抗菌力を MIC で検討したが、ブイヨン培地における MIC は $0.16 \gamma/ml$ 、ブイヨン寒天培地では $0.31 \gamma/ml$ を示し、寒天による KM の抗菌力の低下は比較的軽度 (2 倍以下) であり、またブイヨンおよびブイヨン寒天における 90°C, 1 時間加熱による抗菌力への影響はきわめて軽度 (2 倍以下) と考えられる。ブイヨン培地 $0.16 \gamma/ml$ 、ブイヨン寒天培地 $0.31 \gamma/ml$ に比し小川培地の抗菌力は著しく低下している。これらの結果より培地の pH、鶏卵による薬剤の吸着、磷酸塩の存在が KM の抗菌活性に少なからざる影響を与えるのではないかということが考えられる。

〔実験Ⅱ〕

その成績は表2に示すごとくで、Tarshisの血液寒天培地においてpHを6.4, 6.8, 7.2に調整せる各系列ではKMのMICはともに0.31 γ/ml で各系列間には有意な抗菌力の差異は認められなかった。同上培地の最終pHを6.8に調整し、0.1, 0.3, 0.5%に第一磷酸加里を添加せる系列におけるMICはそれぞれ1.25, 2.5, 5 γ/ml を示した。同上培地のpH無修正で0.1% (pH 6.6), 0.3% (pH 6.4), 0.5% (pH 6.2)に第一磷酸加里を添加せる各系列では上記pH調整系列とほぼ同様のMICを示した。これを要するに添加せる第一磷酸加里の増量につれてKMの抗菌力は低下することを認め、Kirchner寒天培地におけるMICは5 γ/ml で0.5%第一磷酸加里加血液寒天培地のそれと等しく、Tarshisの血液寒天培地におけるMICに比し約16倍活性低下がみられることになる。

〔実験Ⅲ〕

その成績は表3に示すごとくであつて、0.1, 0.3, 0.5%に正磷酸を添加し培地の最終pHを6.8とせる各系列におけるKMのMICは1.25, 5, 10 γ/ml で第

一磷酸加里加血液寒天培地の場合(表2)とおおむね同様の傾向を示し、0.1, 0.3, 0.5%に第二磷酸曹達を添加し同様に最終pHを6.8に調整せる各系列におけるKMのMICはそれぞれ0.31, 0.63, 1.25 γ/ml を示した。

Tarshisの血液寒天培地では0.31 γ/ml であり1.2および3%小川培地におけるKMのMICはそれぞれ50, 50, 100 γ/ml を示した。すなわち添加せる正磷酸の増量につれてKMのMICは低下することが認められ、第二磷酸曹達においても抗菌力の低下は軽度ながら同様の傾向が認められた。

1%小川培地における第一磷酸加里の濃度は約0.3%にあたり、同培地におけるKMのMICは20 γ/ml と考えられ(表3)、0.3%第一磷酸加里加血液寒天培地のMICは2.5 γ/ml (表2)を示せる点より比較検討して鶏卵への吸着によるKM抗菌活性の低下はおおむね8倍と推定された。また1%小川培地における抗菌力は磷酸塩を含有しないTarshisの血液寒天培地におけるMIC 0.31 γ/ml に比しおおむね64倍の活性低下が考えられる。

表3 培地内 KM の抗菌力に及ぼす磷酸および磷酸塩の影響 (Mycob. 607, 10⁻²)

培地 条件		γ/ml										
		100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0	
血液寒天	Tarshis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	##
正磷酸加血液寒天 (pH 6.8)	0.1% H ₃ PO ₄	-	-	-	-	-	-	11	59	##	##	##
	0.3% "	-	-	-	-	7	51	##	##	##	##	##
	0.5% "	-	-	-	29	+	##	##	##	##	##	##
第二磷酸曹達加血液寒天 (pH 6.8)	0.1% Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	15	##	##
	0.3% "	-	-	-	-	-	-	-	14	27	##	##
	0.5% "	-	-	-	-	-	-	8	7	34	##	##
小川	1%	-	-	37	##	##	##	##	##	##	##	##
	2%	-	-	##	##	##	##	##	##	##	##	##
	3%	-	31	##	##	##	##	##	##	##	##	##

生菌単位数 6×10⁶

Viomycin に関する成績

〔実験Ⅳ〕

その成績は表4に示すごとくで、pHを6.4, 6.8, 7.2に調整せるバイオンおよびバイオン寒天培地の各系列におけるVMのMICは、培地pH6.4ではそれぞれ0.63 γ/ml , 1.25 γ/ml を示し、pH6.8, 7.2ではともにバイオン培地0.31 γ/ml , バイオン寒天培地1.25 γ/ml を示し、VMの抗菌力への影響はきわめて軽度ながら酸性に傾くに従い抗菌活性の低下を認め、寒

天によるVMの抗菌力の低下は4倍以下で軽度である。バイオンおよびバイオン寒天培地における90°C, 1時間加熱による抗菌力への影響は、培地のpHで差異を示し、pH6.4のバイオンおよびバイオン寒天培地におけるMICはそれぞれ0.63 γ/ml , 1.25 γ/ml で抗菌活性に影響はなく、pH6.8のバイオンおよびバイオン寒天培地のMICはそれぞれ1.25 γ/ml , 5 γ/ml とともに軽度ながら4倍の活性低下を示した。またpH7.2のバイオン, バイオン寒天培地のMICは1.25

γ/ml, 2.5 γ/ml で、ブイオンにおいては同様4倍、ブイオン寒天培地においては2倍の活性低下を示し、1%および3%小川培地の各系列における VM の MIC

はそれぞれ 10 γ/ml, 50 γ/ml で抗菌活性はさらに低下している。

〔実験V〕

表4 培地内 VM の抗菌力に影響を及ぼす培地の条件 (Mycob. 607, 10⁻²)

培地	条件	γ/ml pH	1,000	100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0
			ブイオン	50°C	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-
		6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	1	+	+
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	90°C, 1時間	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		6.8	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ブイオン	50°C	6.4	-	-	-	-	-	-	11	70	+	+	+
		6.8	-	-	-	-	-	-	-	85	+	+	+
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	10	+	+	+
寒天	90°C, 1時間	6.4	-	-	-	-	-	-	3	92	+	+	+
		6.8	-	-	-	-	-	59	+	+	+	+	+
		7.2	-	-	-	-	-	-	42	+	+	+	+
1%小川	90°C, 1時間		-	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+
3%小川	90°C, 1時間		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

生菌単位数 18×10⁵

その成績は表5に示すごとくで、Tarshisの血液寒天培地において pH を 6.4, 6.8, 7.2 に調整せる各系列における VM の MIC はおおむね 0.63 γ/ml を示し各系列間には有意な抗菌力の差異は認められなかつた。同上培地に 0.1% (pH 6.6), 0.3% (pH 6.4), 0.5% (pH 6.2) に第一磷酸加里を添加せる各系列の MIC はそれぞれ 2.5 γ/ml, 5 γ/ml, 10 γ/ml を示

し、Kirchner 寒天培地では MIC 10 γ/ml を示した。

これを要するに添加せる第一磷酸加里の増量につれ VM の抗菌力の低下を認め、Kirchner 寒天培地における MIC は 10 γ/ml で 0.5% 第一磷酸加里加血液寒天培地のそれと等しく、Tarshis の血液寒天培地における MIC に比し約 16 倍活性の低下がみられることになる。

表5 培地内 VM の抗菌力に及ぼす pH と磷酸塩の影響 (Mycob. 607, 10⁻²)

培地	条件	γ/ml	100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0
			血液寒天	pH 6.4		-	-	-	-	-	-	4
	pH 6.8		-	-	-	-	-	-	2	+	+	+
	pH 7.2		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
第一磷酸加里	0.1% KH ₂ PO ₄ (pH 6.6)		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	0.3% " (pH 6.4)		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	0.5% " (pH 6.2)		-	-	-	84	+	+	+	+	+	+
キルヒナー			-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

生菌単位数 18×10⁵

〔実験VI〕

その成績は表6に示すごとくであつて、0.1, 0.3, 0.5%に正磷酸を添加し培地の最終pHを6.8とせる血液寒天培地の各系列におけるVMのMICはそれぞれ2.5 γ/ml , 5 γ/ml , 10 γ/ml を示し、同様に最終pHを6.8に調整し0.1, 0.3, 0.5%に第一磷酸加里を添加せる各系列のMICは1.25 γ/ml , 2.5 γ/ml , 5 γ/ml で、正磷酸加血液寒天培地は第一磷酸加里加血液寒天培地に比しおおむね2倍の抗菌活性低下を示した。また0.1, 0.3, 0.5%に第二磷酸曹達を添加し同様に最終pHを6.8に調整せる各系列におけるVMのMIC

はともに1.25 γ/ml でTarshisの血液寒天培地と同値を示したが、1, 2, 3%小川培地におけるMICは50, 50, 100 γ/ml を示した。すなわち添加せる正磷酸の増量につれてVMのMICは低下することが認められ、第一磷酸加里を添加せるpH無修正の場合(表5)とおおむね同様の傾向を示した。後者を添加後最終pHを6.8に調整せる場合(表6)にも1段階低いがほぼ同様の活性低下の傾向がみられた。しかし第二磷酸曹達添加では抗菌活性に及ぼすほどの影響はみられなかつた。

前述したごとく、1%小川培地における第一磷酸加

表6 培地内VMの抗菌力に及ぼす磷酸および磷酸塩の影響 (Mycob. 607, 10^{-2})

		γ/ml	100	50	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0
培地	条件											
血液寒天	Tarshis		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
正磷酸加血液寒天 (pH 6.8)	0.1% H_3PO_4		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	0.3% "		-	-	-	-	3	+	+	+	+	+
	0.5% "		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
第一磷酸加里加血液寒天 (pH 6.8)	0.1% KH_2PO_4		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	0.3% "		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	0.5% "		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
第二磷酸曹達加血液寒天 (pH 6.8)	0.1% $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	0.3% "		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	0.5% "		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
小川	1%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3%		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

生菌單位数 23×10^6

里の濃度は約0.3%にあたるが、同培地におけるVMのMICは20 γ/ml と考えられ(表6)、0.3%第一磷酸加里加血液寒天培地のMIC 2.5 γ/ml より比較検討して鶏卵への吸着によるVMの抗菌活性低下はおおむね8倍と推定された。またこれはTarshisの血液寒天培地における1.25 γ/ml に比し16倍の活性低下が考えられる。

総括ならびに考察

KMおよびVMの耐性測定に小川培地を使用するときは耐性値が高く出ることが知られているが、その原因については未だ十分に検討されてはいない。しかしこれについては加熱凝固、培地pH、磷酸塩の影響および鶏卵への吸着がその主要な原因ではないかと予想され

る。

本実験においてはまずMycob. 607株により、ブイヨン、ブイヨン寒天培地を用い小川培地作製時と同様に90°C、1時間加熱せるものとしからざるものとを準備し、加熱によるKM力価の減弱を検討したが、DHSMと同様²⁵⁾に軽微でその活性低下は2倍以内と推定される結果を得た。ついでpH 6.4, 6.8, 7.2のブイヨンおよびブイヨン寒天培地を用い、KM同様加熱によるVM力価の減弱を検討したが培地のpHにより抗菌力に差異を認め、pH 6.4においてはともに抗菌活性に影響はなく、pH 6.8ではともに4倍の活性低下を示し、pH 7.2ではブイヨンにおいて4倍、ブイヨン寒天培地では2倍の活性低下を認め、pH 6.8および7.2

の培地では加熱の影響をうけやすいと推測される結果を得た。

同時に KM および VM の寒天による活性低下も検討したが、VM は KM に比しやや寒天による抗菌力の影響をうけやすいと考えられるもいずれにしても、寒天による活性低下は軽度であることを認めた。

KM の抗菌活性は DHSM 同様にアルカリ側で増強されることが知られているが、Tarshis の血液寒天培地により培地の最終 pH 6.4, 6.8, 7.2 の3段階を準備して Mycob. 607 株を接種した成績ではその抗菌活性に有意の差を認めえなかつた。VM の抗菌活性は酸性側で低下することが認められているが²⁷⁾、本実験でもきわめて軽度ながら酸性に傾くに従い活性の低下をブイオン、ブイオン寒天培地で認めた。しかし Tarshis の血液寒天培地においては有意差を認めえなかつた。

培地の最終 pH を 6.8 に統一し 0.1, 0.3 および 0.5 % 第一磷酸加里加血液寒天培地を用い、同時に 0.1 % (pH 6.6), 0.3 % (pH 6.4), 0.5 % (pH 6.2) の第一磷酸加里加血液寒天培地 (培地の pH は無修正) を併置して KM の抗菌力を比較すると、そのいずれにおいても第一磷酸加里の増量とともに KM の抗菌力の低下をみ、おおむね同様の結果を示した。VM の抗菌力も KM 同様第一磷酸加里加血液寒天培地の pH 無修正と最終 pH を 6.8 に統一した培地で比較すると、いずれにおいても第一磷酸加里の増量とともに抗菌力の低下をみるが、最終 pH を 6.8 に調整した場合の活性低下は pH 無修正の場合より軽度で pH の影響も考えられる。

KM および VM の Kirchner 寒天培地における MIC はそれぞれ 5 γ/ml , 10 γ/ml で 0.5 % 第一磷酸加里加血液寒天培地の MIC (VM の場合は pH 無修正) と同値を示し、Tarshis の血液寒天培地の KM の MIC 0.31 γ/ml , VM の MIC 0.63~1.25 γ/ml に比して著明な差異が認められた。Kirchner 寒天培地では第二磷酸曹達が第一磷酸加里とともに添加されているので、第二磷酸曹達が KM および VM の抗菌力に与える影響をも観察したが、第二磷酸曹達が KM に与える影響は第一磷酸加里に比し軽度であるが、ほぼ同様の傾向が認められ、一方 VM ではほとんど影響はみられなかつた。

Gourevitch³⁾ は E. coli を用い pH を 7.2 に統一して、第一磷酸加里に第二磷酸加里を添加せる緩衝液は KM モル濃度の上昇とともに抗菌力の低下をみ、さらに Staphylococcus aureus 209 P を用い、食塩、塩化加里、塩化カルシウム、塩化マンガンも同様の傾向のあることを示した。

いま本実験における成績で第一磷酸加里に秤量換算して 0.1, 0.3, 0.5 % に正磷酸を添加した血液寒天培地

により KM および VM の抗菌力を検討すると、KM では 0.1, 0.3, 0.5 % 第一磷酸加里加血液寒天培地の場合と同様の結果を示し、VM では 0.1, 0.3, 0.5 % 第一磷酸加里加血液寒天培地の pH 無修正の場合と同様である。また第一磷酸加里加血液寒天培地の最終 pH を 6.8 に調整した場合と比較すると (表 6), 正磷酸加血液寒天培地は 2 倍の活性低下をみたが、これは磷酸イオン化傾向の強弱による差と考えられ、結局磷酸イオンによる KM および VM への拮抗が考えられる。

最後に鶏卵への吸着が問題になる。梅沢^{16) 28)} は KM が卵黄に吸着されることを述べているが、前述せるがごとく、1 % 小川培地 (ほぼ 0.3 % の第一磷酸加里を含有する) と 0.3 % 第一磷酸加里加血液寒天培地の MIC より比較検討して鶏卵への吸着による KM 抗菌活性の低下はおおむね 8 倍と推定され、Tarshis の血液寒天培地における MIC のおおむね 64 倍の活性低下が考えられた。同様に VM について比較検討すると鶏卵への吸着は同様 8 倍と推定され、Tarshis の血液寒天培地における MIC のおおむね 16 倍の活性低下が考えられる。

これを要するに KM および VM の加熱、寒天および鶏卵への吸着ならびに磷酸ないし磷酸塩の影響は両剤おおむね同様の傾向を示すことが認められ、KM および VM の耐性用培地としては鶏卵培地をさけ、磷酸 (塩) 添加の少ない培地の使用が望ましいといえる。

結 論

培地内 KM および VM の抗菌力に影響を及ぼす諸因子について検討し下記のごとき結果を得た。

1) 90°C, 1 時間の加熱による KM の抗菌力への影響はきわめて軽度であり、また寒天による抗菌力の低下も軽微と考えられた。同様に VM の加熱による影響は培地 pH で差異を認め、pH 6.8 および 7.2 の培地は影響をうけやすい傾向がみられた。また VM は KM に比しやや寒天による抗菌力の影響をうけやすいようであるがやはり軽度であると考えられた。

2) 両薬剤ともに小川培地での抗菌力はブイオン、ブイオン寒天培地に比し著明に低下し、3 % 小川培地では 1 % 小川培地に比し抗菌力の低下が認められた。

3) 血液寒天培地において pH を 6.4, 6.8, 7.2 に調整せる KM の各系列では著明な抗菌力の差異はなく、0.1, 0.3, 0.5% と第一磷酸加里の増量とともに MIC の低下を認めた。第一磷酸加里に秤量換算して 0.1, 0.3, 0.5% に正磷酸を添加した各系列でも第一磷酸加里の場合と同様に正磷酸添加が KM の抗菌力に拮抗することを認め、第二磷酸曹達においても軽度ながら同様の傾向を示した。

4) ブイオン、ブイオン寒天培地において pH を 6.4,

6.8, 7.2 に調整せる VM の各系列ではきわめて軽度ながら酸性側で抗菌活性低下を認め、血液寒天培地において 0.1, 0.3, 0.5 % に第一磷酸加里を添加した各系列では第一磷酸加里の増量とともに VM に対する MIC の低下を認めた。KM の場合と同様正磷酸を添加した各系列でも正磷酸添加が VM の抗菌力と拮抗することを認めた。

5) 小川培地では KM および VM の鶏卵への吸着がさらに加わつて、KM, VM の抗菌活性に著明な影響を与えるものと考えられる。

東邦大学桑原章吾教授、慶応義塾大学牛場大蔵教授の御校閲を深謝し、国立神奈川療養所伊藤忠雄博士の御指導に心より御礼申し上げます。また御鞭撻と研究の便を賜つた所長上島三郎博士に深謝します。

本論文の要旨は第 34 回日本結核病学会シンポジウムにおいて発表した。

文 献

- 1) 梅沢浜夫：綜合医学, 14 : 988, 昭32.
- 2) Robinson, H.J., Miller, A.K. & Graessle, O.E. : 日本医師会雑誌, 39 : 727, 昭33.
- 3) Gourevitch, A., Hunt, G.A. & Lein, J. : Antibio. Chemother., 8 : 149, 1958.
- 4) 北岡正見・小林一郎・井上和夫：日本医師会雑誌, 39 : 722, 昭33.
- 5) 市川篤二：日本医師会雑誌, 39 : 730, 昭33.
- 6) Bunn, P.A. : 日本医師会雑誌, 39 : 732, 昭33.
- 7) 藤井良知・市橋治雄・星山健二・石橋智子・小山淑子・紺野昌俊：日本医師会雑誌, 39 : 740, 昭33.
- 8) 石山俊次・隅田正一・水谷嘉夫・福地吉雄・沢崎博次・山田充堂・徐慶一郎：日本医師会雑誌, 39 : 742, 昭33.
- 9) 長岐佐武郎：日本医師会雑誌, 39 : 744, 昭33.
- 10) 北本治：日本医師会雑誌, 39 : 738, 昭33.
- 11) 柳沢謙・佐藤直行：日本細菌学雑誌, 12 : 857, 昭32.
- 12) 柳沢謙・金井興美・立花暉夫：日本細菌学雑誌, 12 : 919, 昭32.
- 13) 柳沢謙：日本医師会雑誌, 39 : 719, 昭33.
- 14) 梅沢浜夫：第 34 回日本結核病学会カナマイシンシンポジウム (昭 34) にて発表。
- 15) 柳沢謙：第 34 回日本結核病学会カナマイシンシンポジウム (昭 34) にて発表。
- 16) Morinobu, Y. : J. Antibiotics, 11 : 172, 1958.
- 17) Finlay, A.C., Hobby, G.L., Hochstein, F., Lees, T.M., Lenert, T.F., Means, J.A., Pán, S.Y., Regna, P.P., Routien, J.B., Sobin, B.A., Tate, K. B. & Kane, J.H. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 1, 1951.
- 18) Bartz, Q.R., Ehrlich, J., Mold, J.D., Penner, M. A. & Smith, R.M. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 4, 1951.
- 19) Ehrlich, J., Smith, R.M., Penner, M.A., Anderson, L.E. & Bratton, A.C., Jr. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 7, 1951.
- 20) Hobby, G.L., Lenert, T.F., Donikian, M. & Pirkula, D. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 17, 1951.
- 21) Youmans, G.P. & Youmans, A.S. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 25, 1951.
- 22) Steenken, W. Jr. & Wolinsky, E. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 30, 1951.
- 23) Karlson, A.G. & Gainer, J.H. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 36, 1951.
- 24) Werner, G.A., Tompsett, R., Muschenheim, C. & McDermott, W. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 49, 1951.
- 25) 亀崎華家：第 34 回日本結核病学会にて発表, 結核, 35 : 153, 昭35.
- 26) Tarshis, M.S. : J. Lab. & Clin. Med., 40 : 628, 1952.
- 27) 伊藤篤：京大結研紀要, 7 : 152, 昭33.
- 28) 梅沢浜夫：日本医師会雑誌, 39 : 713, 昭33.