

血清中 INH 濃度の生物学的定量法の考案

結核菌の寒天高層混積培養上に INH 溶液を重畳して INH 濃度を測定する方法の提唱

岡本 亨吉・宇都宮利善・古泉桂四郎

国立療養所村松晴嵐荘

受付 昭和 35 年 5 月 10 日

緒 言

われわれは結核菌の寒天高層混積培養について研究中、結核菌はキルヒナー寒天高層培地に混積培養するときは、一般に高層のきわめて上層にのみ集落層を現わすものであり、高層の上に INH 溶液を重畳すること等により、集落の現われる場所が高層の深部に移動すること等を観察して¹⁾、この移動は結核菌株の薬剤に対する感受性と関係あること等を知った²⁾。

今回は、INH に対する感受性の著しい結核菌株を選んで、寒天高層混積培養を行ない、高層上に既知濃度の INH 溶液を重畳したものを対照となし、別に、INH 服用者血清を重畳して、血清中の INH 濃度を測定する方法に応用することを試みた。

従来、血清中 INH 濃度の生物学的測定法としては、Mandel³⁾ の INH による結核菌の抗酸性消失の程度によりその濃度を測定する方法、および Schmiedel⁴⁾ の直立拡散法等が発表されており、わが国においても、河盛^{5) 6)} は Mandel の方法を紹介し、多少の変法を試みて測定した成績を報告し、小川⁷⁾ は小川らの考案した直立拡散法による成績を報告している。

われわれはわれわれの試みた方法もまた実際に利用できるかと考え、かつ、上記諸法に比して簡便さの点でも有利であると考えるので、大方の批判を得たく、諸実験成績を報告する。

実験材料ならびに方法

1) キルヒナー寒天高層混積培養

下記の菌液に、溶解して約 55°C に保つてある [0.5%] 寒天^{1) 2)} を当量加えてよく混和し、ただちに冷水中で凝固せしめる。

菌液：キルヒナー培地の各組成がそれぞれ 2 倍に含まれている（ただし、血清または血漿の代りにアルブミン（栄研）を 10% に含む）培地 10 ml に対して、供試菌株の Dubos 液体培地（栄研）[10 日ないし 3 週間] 培養の 0.1 ml をよく混和し、[Widal 反応用] 試

験管に分注する。〔 〕内は再検討されることを示す。

2) INH 溶液または被検血清重畳

上記混積培養上に被検液を重畳して 37°C で培養する。このさい、前報²⁾ で述べたとおり、集落層の移動は混積培養後重畳するまでの時間に影響せられるので、今回は混積培養後可及的早く重畳することにした。

3) 判定方法

上記のように重畳して培養し、寒天柱の深部に集落層が現われた場合、上面から集落層までの集落発生が現われない部分を阻止帯と仮称して記述する。INH 1.0 γ/ml 、0.5 γ/ml 、0.25 γ/ml 、0.125 γ/ml 、蒸溜水溶液を重畳した培養を対照として、その阻止帯の巾と被検血清を重畳した培養の阻止帯の巾とを比較して INH 濃度を読む。通常混積培養後 5~6 日ごろに集落が可視的になる。この時期に判定するのが適当である。

約 2 週間後には、INH が不活性となるためか、上層にも集落が発生してくるので集落層の境界が不明瞭になる。

4) 供試菌株

化学療法を行なつたことのない肺結核患者の喀痰から直接法により耐性検査用小川培地に分離された抗結核剤感受性菌株（9 株）および H₃₇Rv 株。

実験成績

第 1 章 基礎的実験

INH の慣用量を服用している患者の血清中に含まれていると推測される濃度に等しい濃度（2.0 γ/ml ないし 0.1 γ/ml ）の INH の蒸溜水溶液を INH 感受性結核菌の寒天高層混積培養上に重畳した場合の集落層の移動（阻止帯の巾）

1) 混積菌量、寒天濃度

実験材料および方法

a. 供試菌株：栗原、米川、佐川、滝株。

b. 混積菌量：3% 小川培地から Dubos 培地に移植して 12 日間培養した菌液を原液として、10 倍稀釈を続け、それぞれを 0.5% の割合に混積した。それぞ

れ、原、 10^{-1} 、 10^{-2} …… 10^{-5} と記載した。

c. 寒天濃度：0.5%，0.25%，0.125%。

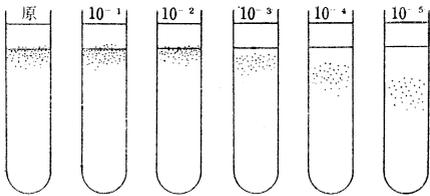
d. I NH 溶液滅菌法：1.0 γ/ml 溶液、0.1 γ/ml 溶液を 100°C で 20 分間加熱滅菌後室温で冷却。

実験成績（図 1）

1 例を図示して所見を記述すれば次のとおりである。

図 1 混積菌量，寒天濃度

栗原株，寒天0.25%，INH 0.1 γ/ml



原

栗原株，寒天0.25%，INH 1.0 γ/ml

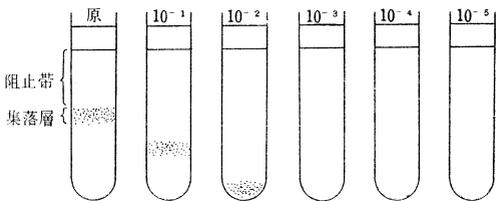
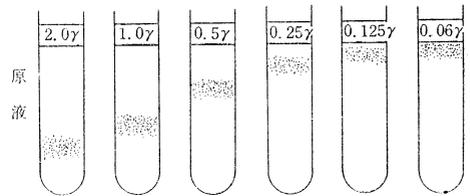


図 2 感度（栗原株）



0.1 γ/ml 液重疊の場合、原液またはその 10 倍または 10^2 倍稀釈菌液を混積してあつたときは阻止帯が現われなかつた。さらに稀釈した菌液を混積してあつたときは、図に示すように阻止帯が現われた。この場合、混積菌量が少なくて阻止帯の巾が大であるけれども、集落層の巾が大であり、集落の数が少ないので、両層の境界は不明瞭である。

1.0 γ/ml 液重疊の場合、原液を混積してあつた培養の阻止帯の巾は約 2 cm あり、集落層の巾は 0.5 cm あり、集落は密であつたので、両層の境界は明瞭であつた。

混積菌量の少ないほど阻止帯の巾が大となり、 10^3 倍以上稀釈菌液を混積してあつたときは、管底まで、集落は全く現われなかつた。

すなわち、同一濃度の I NH 液を重疊する場合、阻止帯の巾は混積菌量が少なくて広く、両者の関係は著明である。

以上の所見に関して、(1) 供試菌株間には著しい差異はみられなかつた。(2) 供試寒天濃度の間にも差異はみられなかつた。0.125% では軟らかすぎるため操作に不便であり、0.5% は 0.25% に比して透明さが劣り、集落発育を遅延せしめる（したがって、以下 0.25% を常用した）。

2) 2.0 γ/ml 、1.0 γ/ml 、0.5 γ/ml 、0.25 γ/ml 、

0.125 γ/ml 、0.06 γ/ml 液重量による阻止帯の巾の差（感度と仮称）

実験材料および方法

a. 供試菌株：栗原、米川、佐川、千川原株および $H_{27}R_v$ 株。

b. 寒天濃度：0.25%。

c. 混積菌量：Dubos 液 14 日間培養原液またはその 10^2 倍稀釈液を 0.5% の割合に混積。

d. I NH 溶液滅菌法：同上。

実験成績（図 2）

1 例を図示して所見を記述すれば次のとおりである。

栗原株原液混積培養上に I NH 溶液を重疊した場合、阻止帯の巾は、2.0 γ/ml で約 3.5 cm、1.0 γ/ml で 2.5 cm、0.5 γ/ml で 1 cm あり、0.25 ~ 0.125 γ/ml でも 0.5 ~ 0.2 cm 巾の阻止帯が現われた。

同株原液の 10^2 倍稀釈の混積培養上に I NH 溶液を重疊した場合、それぞれ原液混積の場合に比して、阻止帯の巾は一段と広いけれども、集落の数が少ないため両層の境界は不明瞭であつた。米川、千川原両株の場合は栗原株の場合よりも I NH 濃度による阻止帯の巾の差が著しかつた。 $H_{27}R_v$ 株もほぼ同様であつたけれども集落数が少なかつた。佐川株原液混積培養の場合、2.0 γ/ml 重疊で阻止帯の巾が 1 cm で各濃度間の差は著しくなかつた。菌量による差異は再確認された。

3) 重疊に用いる I NH 蒸留水溶液の滅菌法

実験材料および方法

a. 供試菌株：栗原株 Dubos 培地 8 日培養および 3 週間培養。

b. I NH 溶液滅菌方法

(1) 10 mg/ml 液をザイツ濾過器で濾過後所要濃度に稀釈。

(2) 10 mg/ml 液を 100°C、20 分間加熱後水浴で急冷して所要濃度に稀釈。

(3) 同上中加熱時間 40 分。

(4) 所要濃度に稀釈した I NH 溶液を 100°C、20 分加熱後急冷。

実験成績

(1)、(2) の (2.0 γ/ml) 重疊においては管底まで集落層が現われなかつた。(0.125 γ/ml) でも阻止帯の巾が

約 0.3 cm あつた。(3), (4) の (2.0 γ/ml) では管底にわずかに集落が現われ、(0.125 γ/ml) では阻止帯がみられなかつた。一般に (同じ濃度) でも、(1), (2) のほうが (3), (4) よりも阻止帯の中がわずかに広いけれども一段階の差はない。上記所見に関して、供試菌株の混積培養前培養日数による差異は認めなかつた。

4) その他の実験

(1) INH 溶液滅菌法不詳の場合 10 株とも (1.0 γ/ml) ないし (0.1 γ/ml) で全然阻止帯が現われなかつたことがある。

(2) キルヒナー培地の 2 倍の組成の液で菌液を調製して、これを 24 時間 37°C で培養したのち寒天で固めて培養を続けた場合は、集落が粗大であつて、集落層の境界ははなはだ不明瞭であつた。

(3) 試験管の太さ：図 1, 2 は中試験管を用いた成績であり、その他は Widal 反応用試験管を用いた実験であるが、記述の所見に関する差異は認めなかつた。

第 2 章 血清中 INH 濃度の測定

1) 健康者血清重畳の効果 (図 3)

実験材料および方法

a. 供試菌株：栗原株。

b. 供試血清：健康者 (20 例) の血清を原液のまま、または生理的食塩水で 4 倍に希釈して約 1 cm の高さになるように重畳する。

c. INH 慣用量服用者血清を同様に重畳する。

d. 対照用 INH 溶液：10 mg/ml 液を 100°C、20 分加熱滅菌後所要濃度に希釈。

実験成績 (図 3)

対照の感度は良好であつた。健康者血清重畳では、集落は寒天柱の最上層に約 0.5 cm の深さまで密生し、阻止帯を現わした例はない。

INH 服用者血清重畳の場合、図の例では、原液は対照の 0.5 γ/ml 液相当の阻止帯を生じ、4 倍希釈血清は 0.125 γ/ml 液相当の阻止帯を生じた。よつて、この血清中 INH は 0.5 γ/ml であると判定することとする。

2) 血清中 INH 濃度の試験的測定成績

a. 供試菌株：栗原株。

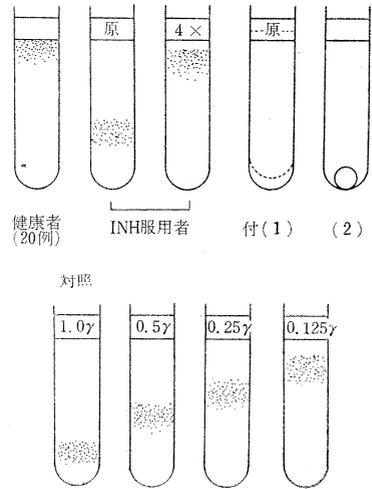
b. 対照用 INH 溶液：10 mg/ml 液をゼイツ濃過器で濾過してのち所要濃度に希釈。

c. 被検血清：INH と PAS を毎日服用中の患者につき、採血前日および当日採血まで PAS 服用を中止し、当日午前 8 時に INH 200 mg を経口投与して 3.5~4 時間後昼食前採血、遠心沈澱法により血清を分離し、生理的食塩水で 2 倍、4 倍に希釈して重畳した。

実験成績

1) 対照の阻止帯の中：1.0 γ/ml ...2 cm, 0.5 γ/ml

図 3 血清重畳の効果 (栗原株)



...1.5 cm, 0.25 γ/ml ...0.5 cm, 0.125 γ/ml ...0 cm (図 2 とほぼ同じ)。生理的食塩水...0, 健康者血清 2 倍...0, 4 倍...0。

2) 被検血清の 2 倍および 4 倍希釈重畳から得た値の平均値を列記すれば次のとおりである (単位 γ/ml)。

0.8, 0.7, 2.8, 0.8, 1.2, 1.05, 1.3, 1.6, 0.8, 0.2, 0.8, 0.7, 1.4, 1.5, 1.6, 2.0, 0.45, 1.0, 2.6

3) その他の実験

(1) 寒天柱浮上防止：血清を重畳した場合、血清が管壁と寒天柱との間隙に浸入して混濁することがある。極端な場合には、血清が管底に沈んで、寒天柱が浮上することがある。このことは血清を希釈した場合のほうが少ない。そこでわれわれは、Widal 反応用試験管に硝子玉を容れたものを使用し、混積培養後は管を急激に回転したり、傾倒したりしないよう注意してとり扱うことによつて、一応、寒天柱の浮上をみないよう習熟した (図 3 の(2))。

(2) INH の水溶液と血清溶液との比較：INH の健康人血清溶液重畳の場合のほうが、水溶液重畳よりも阻止帯がわずかに深い。その差は約 10% であつた。7 日以上重畳培養した場合、低濃度 (0.125 γ/ml) 水溶液重畳では阻止帯が漸時不明瞭になつたけれども、血清溶液では、なお明瞭な阻止帯を残した。

(3) Nat. cit. 溶液, Heparin 溶液は阻止帯を生じなかつた。

総括および考案

上記諸実験により、INH 感受性結核菌の寒天高層混積培養上に既知濃度の INH 溶液を重畳して対照となし、被検血清重畳による菌発育阻止帯の中を比較することにより血清中 INH 濃度を測定することができ

たと考える。

1) 本法と Mandel 氏法⁵⁾、直立拡散法^{4) 7)} との比較：Mandel 法は判定までの所要日数 4~5 日で直立拡散法よりも早いけれども、後者の手技は前者に比しはるかに簡便であり、日常の使用に適するとされている^{6) 8) 9)}。ただし、直立拡散法は判定までに約 2 週間を要し、結核菌研究上一般に痛感せられる不便さを含んでいる。われわれの方法では通常 5~6 日で集落が可視的となり、判定可能である。また、この種研究においては菌量を一定にすることが重要であり、本法においては、直立拡散法における菌移植の手技的困難を避けることができる。本法において、菌液は可及的速やかに寒天で固めるべきこと（実験 4）—(2) および混釈培養後はなるべく早く重畳すべきであること²⁾ は注意を要する。

2) 阻止帯の巾について：本文において、阻止帯とは、INH 液を重畳して培養し、寒天柱の深部に集落層が現われた場合、その上部に現われた集落のない部分を仮称することとしたのであり、その適否については、なお研究を要する。この阻止帯の巾に影響する因子は、菌株の INH に対する感受性²⁾、重畳する INH の濃度、混釈菌量が主である。感受性菌株間の相違は著しくないで、一般的な方法で感受性と判定された菌株は、いずれも、2.0 ~0.1 γ/ml の測定に使用することができた。

供試菌株の混釈前培養日数は著しい影響を与えない。寒天濃度、試験管の太さも影響がない。したがって、同一菌株を使用する場合、混釈菌量を一定にすることが望ましいけれども、これは不可能ともいうべく、毎回対照を使用しなければならないことは論をまたない。

3) INH の蒸溜水溶液は加熱により不活性となることが報告せられており、ことにアルカリ性の場合著しいとされている¹⁰⁾。本実験の蒸溜水は pH 6.7 くらいであり、2.0~0.1 γ/ml 液を 100°C、20 分加熱によ

り約 10% の不活化がみられたけれども、10 mg/ml 液を同様加熱後急冷してのち稀釈した場合はザイツ濾過器で濾過してのち稀釈した場合と差はなかった。また重畳して放置する場合、蒸溜水溶液は漸時不活化するけれども、血清溶液では約 4 週間観察した範囲では阻止帯の消失はみられない。

結 論

結核菌のキルヒナー寒天高層混釈培養上に既知濃度の INH 溶液を重畳して対照となし、INH 含有血清重畳によつて生ずる菌発育阻止帯の巾から、2.0 ~0.1 γ/ml の血清中 INH 濃度を測定する方法を考案した。本法は Mandel 法に比し手技簡便であり、その判定日数は直立拡散法の 2 週間に比し、5~6 日に短縮された。

稿を終るにのぞみ御指導頂いた慶大牛場大蔵教授に感謝いたします。終始御鞭撻下さった加納保之教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 宇都宮利善 他：衛生検査，8：25，昭34.
- 2) 宇都宮利善：結核，35：173，昭35.
- 3) Mandel, W. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91：409，1956.
- 4) Schmiedel, A. : Zeitschr. f. Tbk., 112 (1)：48，1958.
- 5) 河盛勇造：日本医事新報，1790：25，昭33.
- 6) 河盛勇造 他：結進，24：51，昭34.
- 7) 小川政敏：結進，24：189，昭34.
- 8) 河盛勇造：日結，18：449，昭34.
- 9) 五味二郎：日本結核病学会シンポジウム，昭35.
- 10) 芦荊宏彰：結進，24：114，昭34.