

抗結核剤の培地内不活性化の研究

第1報 活性炭末の混入量と培地内不活性化との関係

小川辰次・大谷典子

北里研究所付属病院 (院長 宗武藤)

受付 昭和35年10月4日

I 緒 論

本庄¹⁾は活性炭末を0.8%, PABAを50 γ /ccに混入した3%小川培地に4% NaOHで処理したものを接種すると, PAS, INHの100 γ /ccを培地内で不活性化できると報告した。氏の実験は3%小川培地を用いてのPAS, INHだけに限局した実験であるが, 4% NaOHで処理した材料を接種する培地としては, なお寒天培地があるし, 単に4% NaOHで前処理するだけではなくて, 中和した材料, あるいは前処理しない材料を接種することもある。それで種々の培地を用い, PAS, INHを含めたその他の種々の抗結核剤について, 培地内の不活性化を実験したが, ここでは, 基礎実験の一部として実施した炭末の混入量と不活性化との関係につき報告する。

II 実験方法

① 培地の種類: 鶏卵培地としては1%小川培地, 3%小川培地, 寒天培地としては馬血清および保存全血液²⁾を使用した変法III Kirchner寒天培地³⁾, Kirchner寒天培地⁴⁾を用いた。これらの培地はすべて5cc宛分注し, 斜面とした。

② 抗結核剤: SM, PAS, INH, Kanamycin (以下KMと略す), Viomycin (以下VMと略す), Cycloserine (以下CYと略す), TB-1, サルファ剤としては, Sulfisomezole, Sulfamethizol, Sulfadimethoxineにつき実験した。

③ 実験培地の作り方

イ. 炭末の混入: 炭末はNorit Aを用いた。そして鶏卵培地では凝固滅菌の前に, 寒天培地では,オートクレーフで滅菌する前に, 培地全体量の0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.8%に混入した4種類の培地を作った。

ロ. 抗結核剤の混入: 前述の種々の培地に活性炭末を0.1~0.8%に混入した培地のおのおのについて, 培地1ccについて0 γ , 10 γ , 100 γ , 500 γ によるように流しこみの方法によって作った。なお, 対照として活性炭末の混入しない培地についても, 同様に流しこみの方法によって抗結核剤を混入した。

④ 菌株および培養の方法: すべての抗結核剤に対して感性である人型結核菌, H₃₇R_v株の1%小川培地, 2~3週培養のものを用いた。まず型のように手振り法によつて1mg/ccの菌液を作り, 3%小川培地, 変法III Kirchner寒天培地には4% NaOHで前処理した菌液を, 1%小川培地およびKirchner寒天培地には前処理しない菌液, あるいは4% NaOHで前処理したものをさらに中和してその0.1cc宛を接種した。

4% NaOH処理のもの, 中和したものとを同時に接種するときには, まずフェノールレッドの0.004%に混入した4% NaOHを用いて, 菌液を前処理して1mg/ccとし, これをメスピペットで2cc宛2本の中試験管にとり, 一方は8%塩酸(容量%)で中和し, 他方は中和に要した塩酸の量だけの4% NaOHをさらに追加混入して両方の菌液の量を同一として, このように処理したものの菌量は, 1mg/ccではないが, これを1mg/ccと称した。中和したものは, さらに滅菌蒸留水で10倍宛に稀釈して, 4% NaOH処理のものは, 4% NaOHで10倍宛に稀釈して, これを10⁻¹mg/cc, 10⁻²mg/ccとよんだ。このようにして少なくとも2段階の稀釈液を培養し, なるべく集落の数えることのできるところで実験しようとした。

菌接種後は, 鶏卵培地では1~2日, 寒天培地では3~4日, 斜面台にねかして37°Cに保存し, 液のほぼ乾燥したときに, ゴムのキャップに変え, 立てて培養した。

⑤ 判定: 毎週観察し, 4週で決定した。そして集落の発育した最高の抗結核剤の濃度をもつて不活性化の濃度とし, 炭末混入量との関係を見た。

III 成 績

① 鶏卵培地の成績

この実験は, 次のように6回にわたつて実施されたものである。

- i. 3%小川培地によるSM, PAS, KM, VM, Sulfisomezole……4% NaOHで前処理して10⁻³mg接種,
- ii. 1%小川培地によるSM, PAS, KM, VM

iv. 3% 小川培地, 1% 小川培地による CY, TB-1……4% NaOH で前処理し, さらに中和して 10⁻²mg 接種.

v. 3% 小川培地, 1% 小川培地による Sulfadimethoxine……4% NaOH で前処理し, さらに中和して 10⁻²mg 接種.

いずれもここに記した接種菌量の 10 倍量, あるいは 1/10 量のもを同時に実験したが, 成績は上述の接種菌量におけるものであるがこれを一括して表 1 に示した. まず活性炭末の混入していない対照培地における H₃₇Rv 株のこれら抗結核剤に対する発育の態度をみると, SM, PAS, KM, Sulfisomezole, INH, TB-1, Sulfadimethoxine では, 10 γ 以上の濃度には発育しない. また, VM, CY, Sulfadimethoxine では 10 γ まで発育し, 100 γ 以上の濃度には発育しない.

次に炭末の混入してある培地の発育の態度をみると, 3% 小川培地も 1% 小川培地も, PAS を除いたすべての抗結核剤においては, 活性炭末の混入量の増すとともに, 次第に高濃度の抗結核剤の混入している培地に発育するようになる. すなわち炭末の混入量と抗結核剤の不活性化とは平行する.

もつとも不活性化の強い 0.8% の混入濃度で抗結核剤の不活性化の状態をみると, もつとも著明なのは TB-1 の 500 γ, Sulfadimethoxine の 1% 小川培地における 500 γ で, 次に VM, Sulfisomezole, INH, CY, 3% 小川培地の Sulfadimethoxine の 100 γ, SM, KM の 3% 小川培地の 10 γ, 1% 小川培地の 100 γ である. SM, KM において 1% 小川培地が 3% 小川培地に比して, 一見不活性化の強い傾向を示しているのは, 本質的な差ではなくて, 1% 小川培

表 2 血清の混入した寒天培地による成績

抗結核剤	培地の種類 活性炭末の量 抗結核剤の濃度(γ/cc)	変法 III Kirchner 寒天培地 (血清混入)					Kirchner 寒天培地 (血清混入)							
		0	0.1%	0.2%	0.4%	0.8%	0	0.1%	0.2%	0.4%	0.8%			
		S M	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	41	59	-	-	-	-	-	-	-	9
	10 γ	-	-	81	120	96	-	-	2	52	33	-	-	-
	0	117	130	177	161	144	79	101	84	93	95	-	-	-
PAS	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-	60	-	-	-	26	68	-	-	-
	0	110	115	135	120	98	78	105	68	76	95	-	-	-
INH	500 γ	-	-	2	12	61	-	-	-	56	65	-	-	-
	100 γ	-	14	57	49	56	-	63	73	54	58	-	-	-
	10 γ	-	95	111	47	61	-	60	94	52	62	-	-	-
	0	56	101	99	84	63	75	71	85	65	61	-	-	-
K M	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	-	10	-	-	-	-	16	-	-	-
	10 γ	-	20	28	35	45	-	18	23	61	×	-	-	-
	0	48	64	60	52	56	53	62	57	55	60	-	-	-
VM	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	100 γ	-	-	-	34	35	-	-	-	45	39	-	-	-
	10 γ	-	30	44	×	34	-	19	33	41	22	-	-	-
	0	44	58	51	38	40	42	53	41	62	54	-	-	-
Sulfamethizol	500 γ	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	21
	100 γ	-	-	21	17	32	-	-	14	47	38	-	-	-
	10 γ	-	41	44	45	37	-	38	33	51	35	-	-	-
	0	42	60	55	46	44	61	58	62	50	53	-	-	-

注: 表1と同 であるが, ×は雑菌混入のために成績の不明であることを示している.

地における接種菌量の多かつたためであろう。

これを要するに、4% NaOH で処理して3% 小川培地に接種した場合と、前処理しないで、あるいは中和したものを1% 小川培地に接種した場合とでは不活性化の傾向は全く同じであつて、PAS を除くすべての抗結核剤が活性炭末によつてある程度不活性化されることを示している。

② 血清を使用した寒天培地の成績

SM, PAS, INH の実験と、KM, VM, Sulfamethizol の実験とは、別々に実施されたものであるが、ともに4% NaOH で前処理したものと、中和したものを同一の量として、4% NaOH 処理のものは変法 III Kirchner 寒天培地に、中和したものは Kirchner 寒天培地に接種したものであつて、前者の実験では $10^{-2}mg$, $10^{-3}mg$ を、後者の実験では $10^{-1}mg$, $10^{-2}mg$ を接

種した。成績は表2のようであるが、この表には $10^{-2}mg$ を接種した成績のみを示した。

まず、活性炭末の混入していない対照培地における $H_{37}Rv$ 株のこれら抗結核剤に対する発育の態度をみると、4% NaOH で処理して変法 III Kirchner 寒天培地に接種した場合と、中和して Kirchner 寒天培地に接種した場合とでは全く同様であつて、いずれの抗結核剤に対しても 10^{-2} では発育しない。次に活性炭末の混入された培地について発育をみると、いずれの抗結核剤に対しても活性炭末の混入量の増すとともに、不活性化が著明となつてくる。

寒天培地では、鶏卵培地において不活性化されなかつたPASにおいても不活性化がみられる。もつとも不活性化の強い0.8%の混入のところで抗結核剤の不活性化の状態をみると、著明なものは、INH, Sulfame-

表3 保存全血液を混入した寒天培地による成績

抗結核剤	培地の種類 活性炭末の量 抗結核剤の濃度(γ/cc)	変法 III Kirchner 寒天培地 (全血液混入)					Kirchner 寒天培地 (全血液混入)				
		0	0.1%	0.2%	0.4%	0.8%	0	0.1%	0.2%	0.4%	0.8%
		S M	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	-	5)	-	-	×	-	64
	10 γ	-	-	70	90	88	-	-	108	134	112
	0	132	150	111	145	132	165	152	170	164	145
PAS	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 γ	-	-	-	-	63	-	-	-	-	150
	0	84	139	148	152	119	131	165	150	166	140
INH	500 γ	-	-	-	76	108	-	-	-	99	142
	100 γ	-	111	115	122	140	-	65	×	87	118
	10 γ	-	130	132	120	123	-	141	156	119	134
	0	81	147	128	128	142	141	152	133	156	138
K M	500 γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	4	15	-	-	-	-	10
	10 γ	-	-	22	18	14	-	-	6	42	31
	0	24	29	18	24	20	45	60	51	56	36
VM	500 γ	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	100 γ	-	-	-	13	20	-	-	-	12	36
	10 γ	-	21	28	17	28	-	16	57	53	52
	0	32	29	25	35	30	60	32	63	49	61
Sulfamethizol	500 γ	-	-	-	-	28	-	-	-	-	30
	100 γ	-	-	-	13	22	-	-	15	56	43
	10 γ	-	39	15	30	50	-	50	55	59	46
	0	30	69	60	56	44	79	56	60	62	55

注：表2と同じ。

thizol の 500 γ であつて、次に VM の 100 γ ないし 500 γ , SM, KM の 100 γ , もつとも軽度のものは PAS の 10 γ である。この場合も変法 III Kirchner 寒天培地と Kirchner 寒天培地とは、不活性化の傾向はほとんど同じである。

以上の成績は $10^{-2}mg$ 接種におけるものであるが、接種菌量の 10 倍多い $10^{-1}mg$ でも、また $1/10$ の $10^{-3}mg$ 接種でも、ほぼ同様の成績を示した。

③ 保存全血液を使用した寒天培地の成績

SM, PAS, INH の実験と、KM, VM, Sulfamethizol の実験は、別々になされたものであつて、接種菌量、接種の方法は ② の場合と全く同様である。成績は、表 3 のようであるが、この表に示したものは、 $10^{-2}mg$ 接種のものである。

成績をみると、② と全く同様であつて、実験したすべての抗結核剤において、活性炭末の混入量の増加とともに、不活性化の程度は次第に増大している。また不活性化のもつとも強い 0.8 % の混入濃度のところでは、INH, Sulfamethizol は 500 γ まで、VM は 500 γ ないし 100 γ , SM, KM は 100 γ , PAS は 10 γ まで不活性化されているし、変法 III Kirchner 寒天培地と Kirchner 寒天培地とは、全く同様の成績を示した。

IV 総括および考察

われわれの目的は、培地中で種々の抗結核剤を不活性化して、可検材料よりの結核菌の分離培養を正確にしようというのであるが、それは従来まで発表されている可検材料中で不活性化する方法が予期に反した成績であつたからである。

さて、活性炭末を培地の中に入れると、抗結核剤が培地の中で不活性化されることは、後で述べるがすでに研究がある。しかしこれらの研究の多くは結核菌の検査に応用する目的でなされたのではなく、断片的なものが多い。本庄の研究にしても PAS と INH だけで、培地も 3 % 小川培地のみである。それでわれわれは、世に行なわれている抗結核剤の大部分につき、培地も種々のものを使用して、まず第一に、活性炭末がこれらの培地に、どの程度に混入されるとどの程度に不活性化するかを検査した。その結果、鶏卵培地では PAS 以外のすべての抗結核剤が、また寒天培地では検査したすべての抗結核剤が、活性炭末の混入量の増すとともに次第に不活性化されることを認めた。この不活性化の程度は、抗結核剤の種類によつて異なるが、抗結核剤の阻止力とは必ずしも平行しない。次に培地の種類からみると、4 % NaOH で処理したものを接種する培地と、中和し、あるいは前処理しないものを接種する培地との間では、不活性化の傾向はほとんど同じである。すなわち 3 % 小川培地と 1 % 小川培地、変法 III Kirchner 寒天培地と

Kirchner 寒天培地とはほとんど同じである。また寒天培地の血清を使用した場合と、全血液を使用した場合とは全く同様である。次に鶏卵培地と寒天培地とは多少の差がある。すなわち前述のように、寒天培地では PAS が不活性化されるし、また VM の不活性化の程度が強い。しかし鶏卵培地で不活性化されないようにみえるのは、最低の混入濃度を 10 γ とし、その上を 10 倍量の 100 γ としたためであつて、この間をもう少し、小さきみにきざんでいたら、ある程度不活性化はみられたものと思われる。したがつて本当の意味は、不活性化が軽度であるということであろう。なおわれわれの使用した活性炭末は Norit A と称するもので、これは James A. Hirsh⁵⁾ が氏の寒天培地に用いたものであつて、とくにこの製品でなければいけないということではない。しかし寒天培地に混入したときに、あまり効果のない活性炭末もあるから、一応、検定してから使用するべきである。

われわれの成績は、諸先進の成績とは、実験条件が異なるので正確な比較はできないが、岡ら⁶⁾⁷⁾ の Lockman 培地に炭末を 1 % に混入したときに、INH を 100 γ , PAS を 100 γ 不活性化できたとの報告、松村⁸⁾ の Kirchner 培地の基汁に炭末を 1 % に混入したときに、SM が 10 γ , PAS が 50 γ , INH が 100 γ 不活性化できた報告、本庄が 3 % 小川培地に活性炭末を 0.8 % に混入したときに、INH が 100 γ 不活性化できたとの報告とは、軌を同じにするものである。なお Edward Lewin⁹⁾ が炭末培地と、オレイン酸アルブミン培地を比較したときに、炭末培地では INH の阻止力が減少したのに、SM, PAS では差がなかったこと、山根¹⁰⁾ が氏の Tween 寒天培地は、1 % 小川培地に比して、SM では耐性値が低く、PAS, INH では差がなかったことは、これらの培地では、炭末が 0.1 % のように少量が用いられたことと、山根培地では Tween 80 が混入されているためと思われる。

V 結 論

4 % NaOH で処理したものを接種する 3 % 小川培地、変法 III Kirchner 寒天培地（血清および保存全血液使用）、中和した材料および前処理しない材料を接種する 1 % 小川培地、Kirchner 寒天培地（血清および保存全血液使用）に活性炭末（Norit A）を 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 0.8 % に混入した培地を用いて、H₃₇Rv 株を接種して SM, PAS, INH, KM, VM, C Y, TB-1, Sulfisomezole, Sulfamethizol, Sulfadimethoxine の培地内での不活性化の実験をした結果、次のような成績を得た。

1) 鶏卵培地では、PAS を除く他のすべての抗結核剤においては、活性炭末の混入量の増加とともに不活

性化の程度が増加し、炭末の0.8%に混入したところでは、TB-1は500γまでINHは100γまで(500γは実験していない)、VM, CY, Sulfisomezole, Sulfadimethoxineは100γまで、SM, KMは10~100γまで不活性化した。そして3%小川培地と1%小川培地とでは、不活性化の傾向は同じであつた。

2) 血清を使用した寒天培地では、PASを含めたすべての抗結核剤において、鶏卵培地とほぼ同様の不活性化の傾向が認められた。

炭末の0.8%に混入されたところでは、INH, Sulfamethizolは500γまで、VMは100~500γ, KM, SMは100γまで、PASは10γまで不活性化された。そして変法ⅢKirchner寒天培地とKirchner寒天培地とでは、ほとんど同じ成績を示した。

3) 保存全血液を使用した寒天培地では、血清を混入した寒天培地とほとんど同じ成績を示した。

この研究の一部は、昭和35年6月、第8回日本化

学療法学会総会において発表した。

文 献

- 1) 本庄：東京女子医科大学雑誌，30：549，昭35.
- 2) 小川他：結核，34：797，昭34.
- 3) 小川他：日本細菌学雑誌，14：171，昭34.
- 4) 小川他：日本細菌学雑誌，14：94，昭34.
- 5) James A. Hirsh：Am. Rev. Tbc.，70：955，1954.
- 6) 岡他：文部省科学研究費，結核研究班，細菌学的研究科会，昭30.
- 7) 岡他：日本医事新報，1635：3，昭30.
- 8) 松村：原著広島医学，6：1，昭33.
- 9) Edward Lewin：Am. Rev. Tbc.，71 (Part I)：447，1955.
- 10) 山根他：結核，31：111，昭31.