

# 抗結核剤の培地内不活性化の研究

## 第2報 活性炭末による不活性化のパラアミノ安息香酸による影響

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

第1報<sup>1)</sup>において、PASは鶏卵培地では、活性炭末を混入しても不活性化できないこと、また寒天培地では活性炭末で不活性化できるとしても軽度であることを報告した。PASは経口投与では口腔内に残るし、また局部的に使用されることも多い。それでPASも同時に十分に不活性化できるようにすれば、1つの培地ですべての抗結核剤が不活性化できることとなる。

Guy P Youmans<sup>2)</sup>らはパラアミノ安息香酸(以下PABAと略す)を使用すると、PASを不活性化できることを発表しているし、その後R.H. Hubble<sup>3)</sup>, Diran Yegian<sup>4)</sup>, 小川<sup>5)</sup>, 本庄<sup>6)</sup>もこの事実をみている。また、すでにWoods<sup>7)</sup>やSelbré<sup>8)</sup>はサルファ剤がPABAにより不活性化されることを証明している。このようにPASの不活性化は、PABAによつて可能であるし、またサルファ剤に対しても好都合であるとしても、その他の抗結核剤に対する活性炭末の不活性化が、PABAの混入によつて弱められると、最初の目的に反することになる。

本庄のPAS, INHの培地内の不活性化の実験では、PABAによる悪い影響はないものようであるが、その他の抗結核剤についてはまだ研究されていない。また培地も3%小川培地についての実験のみである。それでわれわれは、基礎実験の一部として、第1報で報告した種々の抗結核剤について、種々の培地を用い、活性炭末の不活性化のPABAによる影響を検討したので報告する。

### II 実験1 活性炭末による不活性化のPABAによる影響

#### (1) 実験方法

① 被検の抗結核剤：第1報の場合とほぼ同様であつて、SM, PAS, INH, KM, VM, Cycloserine(以下CYと略す), TB-1, サルファ剤としてSulfamethizol, Sulfisomezole, Sulfadimethoxine等である。

② 培地および使用培地の作り方：第1報と同様に鶏卵培地としては3%小川培地, 1%小川培地, 寒天培地としては変法III Kirchner<sup>9)</sup>寒天培地, Kirchner<sup>10)</sup>寒天培地(いずれも血清および保存全血液<sup>11)</sup>使用)を用い

た。そしてこれらの培地に活性炭末(Norit A)を0.8%に混入し、さらにPABAを培地1ccにつき50 $\gamma$ 宛に混入した培地を作り、これらの培地を用いて、前述の抗結核剤を、0, 10 $\gamma$ , 100 $\gamma$ , 500 $\gamma$ のように流し込み、この4本の培地を1組として使用した。

③ 接種方法：1%小川培地に2~3週間培養した保存人型結核菌, H<sub>37</sub>Rv株で型のように菌液を作り、まずフェノールレッドの0.004%に混入した4% NaOHで10<sup>-1</sup>mg/ccとし、この中から1cc宛を2本の中試験管にとり、一方は8% HCl(容量%)で中和し、他方は中和に要したHClの量だけの4% NaOHを加えて両方の液の量を同一とし、4% NaOHで処理したものは3%小川培地および変法III Kirchner寒天培地を台とした不活性化培地に、中和したものは1%小川培地およびKirchner寒天培地を台とした不活性化培地にそれぞれ0.1cc宛を接種し、これを10<sup>-2</sup>mgと記し、さらに4% NaOHで処理したものは4% NaOHで、中和したものは、滅菌蒸留水で10倍に稀釈して接種し、これを10<sup>-3</sup>mgと記載した。

接種は型のごとく、培地の全斜面をうるおし、斜面を上にして斜面台に水平にねかし、鶏卵培地は1~2日、寒天培地は2~3日37°Cの孵卵器に保存し、液のほぼ乾燥したところでゴムキャップに変えて立て37°Cで培養した。

④ 判定：接種後は毎週観察し、4週で決定した。そして集落の発育した最高の濃度をもつて不活性化の濃度とし、これらの成績を第1報で報告した活性炭末の0.8%に混入した成績と比較した。

#### (2) 成績

##### ① 鶏卵培地における成績

この成績は

- i. SM, PAS, KM, VM, Sulfamethizol
- ii. INH
- iii. Sulfisomezole, CY, TB-1
- iv. Sulfadimethoxine

の4回にわたる実験を集めたものであつて、接種菌量は10<sup>-2</sup>mg, 10<sup>-3</sup>mgであるが、表1に示した成績は10<sup>-2</sup>mgのものである。なお、対照培地と炭末のみ混入

表1 鶏卵培地の成績

培地の種類 抗結核剤 および その混入濃度 $\gamma/cc$		3% 小川培地			1% 小川培地		
		対 照	炭末混入	炭末 PABA混入	対 照	炭末混入	炭末 PABA混入
SM	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	45	-
	10	-	24	26	-	+	16
	0	16	26	36	+	+	56
PAS	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	32	-	-	22
	10	-	-	32	-	-	33
	0	16	19	54	+	+	47
KM	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	67	-
	10	-	16	41	-	+	11
	0	15	12	45	+	+	65
VM	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	12	6	-	27	-
	10	2	21	34	+	+	45
	0	19	25	44	+	+	43
Sulfamethizol	500 $\gamma$	/	/	27			42
	100	-	9	42			68
	10	-	18	59			45
	0	15	18	50			58
INH	500 $\gamma$	/	/	/	/	/	/
	100	-	26	42	-	8	31
	10	-	94	81	-	41	55
	0	48	88	77	40	60	67
Sulfisomezol	500 $\gamma$	-	-	21	-	-	50
	100	-	13	30	-	20	43
	10	-	56	52	-	49	72
	0	66	72	91	91	115	103
Cycloserine	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	18	8	-	21	28
	10	32	82	78	46	64	66
	0	86	78	112	65	116	84
TB-1	500 $\gamma$	-	46	40	-	28	21
	100	-	60	52	-	95	30
	10	12	68	66	6	84	82
	0	75	60	86	55	101	106
Sulfadimethoxine	500 $\gamma$	-	-	62	-	2	38
	100	-	58	58	-	16	58
	10	3	72	72	-	28	60
	0	48	54	60	28	26	44

注：表中の記載は集落数を示す。その表示は次のようである。

- ① 数字は集落数を示す。 ② +は無数であることを示す。 ③ -は陰性を示す。

した培地の成績は第1報のものである。

まず3%小川培地からみると、PABAの混入によつて差のないものは、SM, KM, VM, INH (500γは実施していない)、CY, TB-1であつて、炭末だけでは不活性化されなかつたPASは、PABAの混入により不活性化がみられ、サルファ剤のSulfisomezole, Sulfadimethoxine等では、不活性化が増強されている。また、Sulfamethizolは500γまで不活性化されている。次に1%小川培地では、影響のないものはINH,

CY, TB-1だけであつて、PASでは新しく不活性化がみられ、Sulfamethizolは500γまで不活性化されているし、Sulfadimethoxine, Sulfisomezoleでは不活性化が増強されている。また、SM, KM, VMでは、PABAの混入により不活性化が減弱しているが、これは、接種菌量が炭末混入のみの培地に比して少なかつたためではないかとも思われるので、この点はさらに検討してみたい。

② 血清使用の寒天培地における成績

表2 血清使用の寒天培地の成績

培地の種類 抗結核剤 および その混入濃度 γ/cc		変法 III Kirchner 寒天培地 (血清混入)			Kirchner 寒天培地 (血清混入)		
		対 照	炭末混入	炭末 PABA混入	対 照	炭末混入	炭末 PABA混入
SM	500 γ	-	-	-	-	-	-
	100	-	59	6	-	9	5
	10	-	96	62	-	33	75
	0	117	144	101	79	95	88
PAS	500 γ	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	10	-	-	21
	10	-	68	36	-	68	38
	0	110	95	68	78	95	49
INH	500 γ	-	61	48	-	65	61
	100	-	56	63	-	58	66
	10	-	61	50	-	62	×
	0	56	63	73	75	61	59
KM	500 γ	-	-	-	-	-	-
	100	-	10	-	-	16	-
	10	-	45	69	-	×	31
	0	48	56	55	53	60	59
VM	500 γ	-	-	-	-	5	-
	100	-	35	47	-	39	25
	10	-	34	66	-	22	30
	0	44	40	69	42	54	58
Sulfamethizol	500 γ	-	18	60	-	21	81
	100	-	32	82	-	38	131
	10	-	37	74	-	35	96
	0	42	44	68	61	53	62

注：表1に同じ。

成績は表2のようであるが、この成績は同時に実施されたものであつて、前同様10<sup>-2</sup>mg接種の成績である。

まず変法 III Kirchner 寒天培地の成績からみてゆくと、PABAの混入によつても差のないのはSM, INH, VM, Sulfamethizolであつて、不活性化の増強されたものはPASである。反対に不活性化の減弱したのはKMである。次にKirchner 寒天培地をみると、

差のないものは、SM, INH, Sulfamethizolであつて、増強されたものはPAS, 弱められたものはKMとVMであるが、VMの活性炭末のみの培地の500γには、集落が5コのように少数であるから、あるいは技術的な誤差かもしれない。このように考えると、変法 III Kirchner 寒天培地と Kirchner 寒天培地とでは不活性化については全く差がない。

③ 保存全血液を使用した寒天培地における成績

表 3 保存全血液使用の寒天培地の成績

培地の種類 抗結核剤 および その混入濃度 $\gamma/cc$		変法 III Kirchner 寒天培地 (全血液混入)			Kirchner 寒天培地 (全血液混入)		
		対 照	炭末混入	炭末 PABA 混入	対 照	炭末混入	炭末 PABA 混入
SM	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	50	78	-	64	39
	10	-	88	101	-	112	40
	0	132	132	94	165	145	57
PAS	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	78	-	-	41
	10	-	63	101	-	150	36
	0	84	119	113	131	140	60
INH	500 $\gamma$	-	106	53	-	142	12
	100	-	140	62	-	118	18
	10	-	123	×	-	134	28
	0	81	142	59	141	13 <sub>8</sub>	43
KM	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	15	-	-	10	-
	10	-	14	97	-	31	37
	0	24	20	85	45	36	49
VM	500 $\gamma$	-	-	-	-	-	-
	100	-	20	73	-	36	35
	10	-	28	89	-	52	33
	0	32	30	62	60	61	3 <sup>2</sup>
Sulfamethizol	500 $\gamma$	-	28	103	-	30	30
	100	-	22	121	-	43	49
	10	-	50	96	-	46	29
	0	30	44	88	79	55	53

注：表 1 に同じ。

この実験は、前述の ② と同時に同様の方法で実施されたものである。前同様に  $10^{-2}mg$  接種した成績を表 3 に示した。

4% NaOH で処理した菌液を接種した変法 III Kirchner 寒天培地からみてゆくと、PABA の混入によっても、不活性化に影響なかつたのは、SM、INH、VM、Sulfamethizol の 4 種で、増強されたものは PAS、減弱したものは KM である。次に Kirchner 寒天培地の成績をみると、変法 III Kirchner 寒天培地とほぼ同様である。

### III 実験 2 KM の培地内不活性化についての活性炭末と PABA の併用の再検討

実験 1 では、鶏卵培地においても、寒天培地においても、炭末による KM の不活性化が PABA によつて弱められたのではないかと推定させるような成績を示した。しかし、炭末のみによる不活性化の実験と、さらに PABA を混入したいわゆる不活性化培地の実験は、同

時に行なわれたのではないし、対照に発育した集落の数も同じではない。それで活性炭末のみの培地、PABA のみの培地、および活性炭末と PABA とを併用した培地について同時に実験し、このような事実が実際にありうるかどうかを検討した。

#### (1) 実験方法

① 培地および使用培地の作り方：使用培地は実験 1 の場合と同様で、まず次のような 4 種類の培地を作り

- i. Norit A を 0.8% に混入したもの
- ii. PABA を 50  $\gamma/cc$  に混入したもの
- iii. Norit A 0.8% と PABA 50  $\gamma/cc$  を混入したもの
- iv. Norit A も PABA も混入しないもの

これら各培地について、KM を 0, 10  $\gamma$ , 20  $\gamma$ , 40  $\gamma$ , 80  $\gamma$ , 160  $\gamma/cc$  に混入した一連の培地を準備した。

② 接種方法：実験 1 と同様である。

③ 判定：実験 1 と同様である。

(2) 成績

表4に $10^{-3}mg$ 接種の成績を示した。

表4 活性炭末によるKM不活性化のPABAによる影響の再検討

培地の種類	前処理 炭末, PABA の培地 の混入 濃度 ( $\gamma/cc$ )	4%NaOH 処理				中 和			
		N	P	N+P	対	N	P	N+P	対
鶏卵培地	160 $\gamma$	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	88	-	98	-	14	-	1	-
	20	143	-	96	-	20	-	10	-
	10	180	42	141	130	56	18	64	26
	0	168	+	145	162	84	110	101	101
血清使用 寒天培地	160 $\gamma$	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	21	-	50	-	14	-	9	-
	40	55	-	110	-	6	-	40	-
	20	54	-	81	-	25	-	48	-
	10	51	-	112	-	70	-	41	-
	0	114	88	138	154	84	104	80	86
保存全血液 使用寒天培地	160 $\gamma$	82	-	-	-	-	-	-	-
	80	+	-	76	-	6	-	41	-
	40	+	-	+	-	54	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-
	0	+	+	+	+	+	99	+	+

注：① 炭末, PABA の培地混入の方法中の表示は次のようである。

N.....Norit A 0.8%混入した培地

P.....PABA 50  $\gamma/cc$  混入した培地

N+P.....Norit A, PABA が前述の量に併用した培地

対.....対照であつて Norit A も PABA も混入しない培地

② 表中の数字は集落数を示す。その表示は表1に同じ。

① 鶏卵培地における成績

4% NaOH 処理, 中和の如何にかかわらず Norit A のみ混入の培地と, さらにこれに PABA を 50  $\gamma/cc$  に加えた不活性化培地とで不活性化の程度は同じである。4% NaOH 処理と中和とでは不活性化の段階は同じであるが, しかしよくみると, 中和のほうが多少不活性化が弱いことは, 40  $\gamma$  に発育している集落数によつても明らかである。以上を総括すると, 鶏卵培地においては, KM の Norit A による不活性化は PABA の混入によつてほとんど影響を受けないといふことができる。

② 血清使用の寒天培地の成績

鶏卵培地とほとんど同様であつて, 4% NaOH 処理

でも中和でも, PABA の影響は認められない。

③ 保存全血液使用の寒天培地の成績

4% NaOH 処理では Norit A 単独に比して, Norit A と PABA を併用した不活性化培地のほうが一段と低い, 中和したものではその差は認めない。このことは, PABA の Norit A の不活性化を減弱させる力が血清同様に弱いことを示していると考えられよう。

以上は  $10^{-3}mg$  接種の成績であるが,  $10^{-2}mg$  接種においても, ほぼ同様の成績を示した。これを総括すると, 鶏卵培地においては, Norit A による KM の不活性化の程度は PABA によつてほとんど影響を受けない。寒天培地においては, その不活性化が多少減弱するがその程度は軽いものと推定できる。

IV 総括および考察

本庄は, 活性炭末と PABA を併用することにより, INH と PAS を同時に培地内で不活性化することに成功している。しかし, これらの事実が他の抗結核剤の場合にもあてはまるものかどうか検討する必要があるし, さらには, その他の培地についても検討する必要がある。PABA の混入量を 50  $\gamma/cc$  としたのは, 小川の以前の実験では, この程度に混入すると結核菌の発育には影響せず, しかも PAS の 100  $\gamma/cc$  を培地内で不活性化できることを証明しているからである。

このように 50  $\gamma/cc$  に混入して PABA の影響を検討した結果, 活性炭末に PABA を併用することにより, 鶏卵培地においては活性炭末だけでは不活性化できなかった PAS を不活性化できたし, 寒天培地では PAS の不活性化を増強することができた。さらに, 鶏卵培地ではサルファ剤の不活性化を増強した。寒天培地においては, サルファ剤の不活性化が増強されなかつたのは, 最高 500  $\gamma$  の濃度に検査を実施したためであろう。次に KM においては, いずれの培地においても PABA により不活性化が減弱しているような成績を認めたが, 再検討により鶏卵培地では減弱されないこと, 寒天培地では減弱の傾向は認めるが軽度であることを確認した。なお, SM, VM, CY, TB-1 においては PABA による影響は全くみられなかつた。

以上の成績から, 鶏卵培地でも, 血清を使用した, あるいは保存全血液を使用した寒天培地でも, その前処理の方法の如何にかかわらず, すべての抗結核剤のある程度のもを, 活性炭末と PABA を併用した培地の中で不活性化しようとする試みは期待できそうに思われる。

V 結 論

鶏卵培地としては, 3%小川培地, 1%小川培地, 寒天培地としては変法 III Kirchner 寒天培地, Kirchner 寒天培地を台として, 活性炭末 (Norit A) を 0.8% に混入したもの, PABA を 50  $\gamma/cc$  に混入したもの, お

よび Norit A と PABA を併用したもの等を作つて、これらの培地に H<sub>37</sub>Rv で作つた菌液を 4% NaOH で前処理し、あるいは中和して接種した。これにより活性炭末の抗結核剤不活性化に対する PABA の影響をみた。そして次のような成績を得た。

1) 鶏卵培地では、PAS の不活性化が認められ、さらに Sulfisomezole, Sulfadimethoxin の不活性が增強され、SM, KM, VM, INH, Cycloserine, TB-1 の不活性化には影響を認めなかつた。

2) 血清使用の寒天培地では、PAS の不活性化が增強され、SM, INH, VM, Sulfamethizol では影響なく、KM では軽度であるが減弱を認めた。

3) 保存全血液使用の寒天培地では、血清使用の寒天培地とほとんど同じ成績を示した。

4) 4% NaOH で処理したものを 0.1 cc 接種する 3% 小川培地と変法 III Kirchner 寒天培地 (血清ならびに全血液使用)、および中和した材料あるいは前処理しない材料を接種する 1% 小川培地と Kirchner 寒天培地 (血清ならびに全血液使用) とでは、炭末の不活性化に対する PABA の影響は、ほとんど同じ傾向を示した。

5) 以上の成績から Norit A を 0.8%, PABA を 50  $\gamma$ /cc に混入した不活性化培地は、鶏卵培地と寒天培

地とで多少差があるが、SM を 10~100  $\gamma$ 、PAS を 100  $\gamma$ 、INH を 100~500  $\gamma$ 、KM を 10~100  $\gamma$ 、VM を 100  $\gamma$ 、種々のサルファ剤を 500  $\gamma$  まで培地内で不活性化できることが分かつた。

本研究の一部は昭和 35 年 7 月、第 8 回日本化学療法学会総会の席上において発表した。

#### 文 献

- 1) 小川・大谷：結核，36：32，昭36.
- 2) Guy P. Youmans et al.：J. of Bact., 54：409，1947.
- 3) R.H. Hubble et al.：Proc. Soc. Exp. Biol & med., 84：526，1953.
- 4) Diran Yegian et al.：Am. Rev. Tbc., 71：860，1955.
- 5) 小川：臨床病理，2：363，昭29.
- 6) 本庄：東京女子医科大学雑誌，30：549，昭35.
- 7) Woods：Brit. J. of Exp. Path., 21：74，1940.
- 8) Selbie：Brit. J. of Exp. Path., 21：90，1940.
- 9) 小川 他：日本細菌学雑誌，14：171，昭34.
- 10) 小川 他：日本細菌学雑誌，14：94，昭34.
- 11) 小川 他：結核，34：797，昭34.