

抗結核剤の培地内不活性化の研究

第3報 不活性化培地の吟味

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

われわれは、第1報¹⁾、第2報²⁾において、培地内に活性炭末とパラアミノ安息香酸 (以下 PABA と略す) を混入すると、どのような培地においても、また前処理の如何にかかわらずほとんどすべての抗結核剤を培地の中で不活性化できることを示した。これらの実験は、活性炭末、あるいは活性炭末と PABA を同時に混入し、これらのおおのの培地にさらに種々の抗結核剤を 0, 10 γ , 100 γ , 500 γ に混入した 1 組の培地に結核菌を培養し、不活性化することを認めたものであつて、この事實は、抗結核剤の混じっている可検材料中に生存している結核菌を、この不活性化培地に接種すると、このまま接種しても、培養できることを暗示するものである。

それでわれわれは、さらに基礎実験を進めて不活性化培地によつて、抗結核剤の溶液中に混入した結核菌の分離培養を試みたので報告する。

II 実験方法

① 抗結核剤：SM, PAS, INH, KM, VM, Sulfamethizol を滅菌蒸溜水で 500 γ /cc の溶液として使用した。

② 培地：第1報、第2報と同様であつて、鶏卵培地では 1% 小川培地、3% 小川培地、寒天培地としては Kirchner 寒天培地、変法 III Kirchner 寒天培地を用いたが、この場合も血清を 10% に使用した培地と、保存全血液を 10% に使用した培地を準備した。そしてこれらの培地に活性炭末 (Norit A) を 0.8%, PABA を 50 γ /cc に混入した培地と、これらのものを混入しない対照の培地を用いた。前者を本庄にならない不活性化培地とよぶことにする。なお、培地はすべて 5 cc 宛中試験管に分注し、斜面とした。

③ 菌株：すべての抗結核剤に感性である保存人型結核菌の H₃₇Rv 株の 2~3 週培養のもので 10⁻¹mg/cc の菌液を作り、500 γ /cc の抗結核剤の溶液 18 cc の中に 2 cc 宛分注して、10⁻²mg/cc の菌液とした。このようにしてほぼ 500 γ /cc の抗結核剤の中に、10⁻²mg/cc

の結核菌の混じっている菌液と、さらに対照として、滅菌蒸溜水による 10⁻²mg/cc の菌液を用いた。

④ 接種：抗結核剤の 500 γ /cc に混入した菌液と、対照の蒸溜水の菌液を準備した直後、その 0.1 cc 宛を 1% 小川培地、血清および保存全血液使用の Kirchner 寒天培地で作った不活性化培地および対照培地の 2 本宛に接種した。また別に、0.5 cc 宛をとつて、これに 8% NaOH を等量に加えてよく混ぜ、その 0.1 cc 宛を 3% 小川培地、血清および保存全血液を使用した変法 III Kirchner 寒天培地で作った不活性化培地および対照培地の各 2 本に接種した。さらにこれらの抗結核剤および滅菌蒸溜水による菌液を 37°C の孵卵器に保存し、1 日、3 日、7 日後に同様にして接種した。接種後は型のように、鶏卵培地では 1~2 日、寒天培地では 2~3 日、斜面台にねかして、液のほぼ乾燥したところでゴムキャップに変え、立てて培養を継続した。

⑤ 判定：集落発育の有無を毎週観察し、4 週で陰陽性をきめるとともに、発育した平均集落数を出した。

III 成績

第1実験は SM, PAS について、第2実験は INH, KM, VM, Sulfamethizol について実験した。

① 鶏卵培地の成績

表 1 のようである。

まず対照の蒸溜水の菌液からみてゆくと、保存期間の長びくとともに次第に集落数が減少し、第1実験では 3 日まで、第2実験では 7 日まで集落を認めるが、対照培地と不活性化培地との間には、集落数のうえにほとんど差がない。

次に抗結核剤の菌液でも、蒸溜水の場合同様、直後、1 日、3 日と次第に集落数が減少しているが抗結核剤の種類によつて、その消長は異なる。SM, INH では直後だけ、VM では 1 日まで、PAS では 3 日まで、KM, Sulfamethizol では 7 日まで検出されている。蒸溜水の場合と著明に異なることは、PAS, INH, Sulfamethizol では前処理の有無にかかわらず、また SM では、そのままの接種において、不活性化培地におきま集落を認め、対照培地には集落を認めないこ

表1 鶏卵培地の成績

実験	前処理および培地	接触日数		直 後		1 日		3 日		7 日							
		抗結核剤		4% NaOH		そのまま		4% NaOH		そのまま							
		対	N+P	対	N+P	対	N+P	対	N+P	対	N+P						
第1実験	蒸溜水	64	58	≡	≡	4	5	46	39	-	2	11	14	-	-	-	-
	SM	24	55	-	≡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PAS	-	59	-	≡	-	2	-	22	-	-	-	3	-	-	-	-
第2実験	蒸溜水	35	30	≡	≡	3	4	43	46	-	-	2	-	-	-	-	-
	INH	-	32	-	≡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KM	13	21	76	≡	3	6	1	3	-	-	-	-	-	1	-	-
	VM	20	31	93	≡	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sulfamethizol	-	29	-	≡	-	22	-	≡	-	7	-	63	-	-	-	-

注: 1) 表中の数字は集落数を示す。その表示の仕方は次のようである。

- ① 数字は平均集落数
- ② ≡, ≡等は無数であることを示す。
- ③ -は陰性を示す。

2) 対は対照培地を、N+Pは Norit A と PABA の混入した不活性培地を示す。

と、KM、VM では前処理の有無にかかわらず、また SM の 4% NaOH による前処理ではともに不活性化培地に比して少数の集落を対照培地に認めることである。以上の事実は直後の培養においてももつともはつきりしているが、保存後の培地においてもみられる。

上述の不活性化培地のみで発育することは、菌とともに培地内に入った抗結核剤が、その抗結核剤の阻止濃度

以上であつたからであるし、対照培地に発育したことは、阻止濃度以下であつたためであろう。

これを要するに、不活性化培地を用いると、抗結核剤の中に混ざっている結核菌でも、これを前処理するとしなにかかわらず、培養により検出することができることを認めた。

② 血清を使用した寒天培地の成績

表2 血清を使用した寒天培地の成績

実験	前処理および培地	接触日数		直 後		1 日		3 日		7 日							
		抗結核剤		4% NaOH		そのまま		4% NaOH		そのまま							
		対	N+P	対	N+P	対	N+P	対	N+P	対	N+P						
第1実験	蒸溜水	32	23	≡	≡	4	4	25	10	-	×	12	11	-	-	-	-
	SM	-	68	-	≡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PAS	-	85	-	≡	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
第2実験	蒸溜水	27	40	≡	≡	3	6	26	48	-	-	1	2	-	-	-	-
	INH	-	29	-	≡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KM	1	12	-	≡	-	4	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
	VM	32	34	-	≡	3	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sulfamethizol	-	46	-	≡	-	22	-	≡	-	19	-	63	-	2	-	-

注: 1) 表1に同じ。

2) ×は雑菌の侵入のために成績の分からなかつたことを示す。

成績は表2のようであるが、第1、第2実験とともに、蒸溜水による菌液では3日まで発育している。そして保存期間の長びくとともに次第に集落数が減少し、7日では集落を認めない。次に抗結核剤の菌液の場合をみよう。

まず SM、INH では、発育を認めるのは直後だけであつて、1日以後は集落を認めない。PAS と VM は1日まで、KM では3日まで、Sulfamethizol では

7日まで少数の集落を認めている。

以上の成績は鶏卵培地とほぼ同じである。鶏卵培地と異なるのは、SMにおける変法 III Kirchner 寒天培地では、対照培地においても集落を認めないこと、KM、VM では、そのままの接種で対照培地に集落を認めない点であるが、これらのことは、血清の入った寒天培地が、鶏卵培地に比して結核菌の発育を阻止する力の強いことに帰せられるであろう。

表 3 保存全血液を使用した寒天培地の成績

接触日数	前処理および培地	直 後		1 日		3 日		4 日									
		4% NaOH	そのまま	4% NaOH	そのまま	4% NaOH	そのまま	4% NaOH	そのまま								
		対 N + P	対 N + P	対 N + P	対 N + P	対 N + P	対 N + P	対 N + P	対 N + P								
第 1 実験	蒸溜水	53	78	卅	卅	3	4	45	44	2	2	19	18	-	-	3	-
	SM	52	130	-	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PAS	-	95	-	卅	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
第 2 実験	蒸溜水	62	39	卅	卅	5	10	40	59	1	-	1	2	-	-	-	-
	INH	-	71	-	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KM	-	34	-	卅	-	4	-	-	-	2	-	4	-	-	-	-
	VM	52	33	-	卅	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethizol	-	75	-	卅	-	53	-	卅	-	24	-	102	-	3	-	9	

注: 表 1 に同じ。

これを要するに、血清を使用した変法 III Kirchner 寒天培地、Kirchner 寒天培地で作った不活性化培地は、種々の抗結核剤の溶液の中に混入されている結核菌でも、前処理の有無にかかわらず、培養により検出できることが分かった。

③ 保存全血液を使用した寒天培地の成績

対照の蒸溜水の菌液では、第 1 実験では 7 日まで、第 2 実験では 3 日まで集落が発育していること、前処理したものは著明に集落が減少していること、対照培地と不活性化培地の集落の数がほとんど同じである事等は、鶏卵培地や血清を使用した寒天培地の場合と同様である。また抗結核剤の中に混入している結核菌の培養においても、血清を使用した寒天培地における傾向とほとんど同じである。

KM の直後の、4% NaOH の前処理の対照培地において集落が発育していないこと、SM の直後の 4% NaOH 処理の対照培地において菌が発育していることは、血清を使用した寒天培地と異なる点であるが、これらの事実も、この保存全血液を使用した寒天培地の結核菌の阻止力が、血清を使用した寒天培地のそれと異なるためであろう。

これを要するに、保存全血液を使用した寒天培地で作った不活性化培地においても、抗結核剤の溶液の中に混ざっている結核菌を培養により証明することができた。

IV 総括および考察

われわれは、SM, PAS, INH, KM, VM, Sulfamethizol の 500 γ /cc の溶液の中に $H_{37}Rv$ 株の菌液を混入し、その直後および 1 日、3 日、7 日と 37°C の孵卵器に保存したものを、対照の培地と不活性化培地に、そのままあるいは 4% NaOH で前処理して培養してみた。その結果、培地内に菌とともに混入された抗結核剤の濃度が阻止濃度以上で、対照の培地には菌

の発育を認めない場合でも、不活性化培地では発育を認めた。この場合はもちろん、4% NaOH で前処理することによって、そのままの接種に比して集落数は減るのであるが、前処理の如何にかかわらず、また培地の如何にかかわらず同様に培養することができた。そして発育した集落の数をみると、4% NaOH で処理して接種する 3% 小川培地、血清および保存全血液を使用した変法 III Kirchner 寒天培地との間、および前処理しない材料を接種した 1% 小川培地、血清使用の Kirchner 寒天培地、保存全血液使用の Kirchner 寒天培地との間にも著明の差のないことをみた。しかも対照培地と PABA と Norit A を混入した不活性化培地との間には、菌液のみの培養ではほとんど差がない。

このようなことから本庄の不活性化培地は、ほとんどすべての抗結核剤の混入されたものでも濃度以下であれば、これを不活性化できるものであることが分かった。しかし実際には、前にも述べたように活性炭末の混入された不活性化培地は、いずれも雑菌の侵入が多く、ことに寒天培地は使用するものが血清であっても保存全血液であっても著明に多い。したがって雑菌の阻止する方法を研究することも必要であろう。また実験に使用した $H_{37}Rv$ 株では、この不活性化培地は対照に比して発育に差はないが、Diran Yegian ら⁵⁾は、PABA が SM, PAS, INH 等に対して 2 重、3 重の耐性を示している結核菌に対して阻止力が強いこともあると発表しているので、これらの点も含めて、喀痰中の結核菌について検討する必要がある。

V 結 論

すべての抗結核剤に対して感性である保存人型結核菌の $H_{37}Rv$ 株を、SM, PAS, INH, KM, VM, Sulfamethizol の 500 γ /cc の溶液の中に混入して、直後および 37°C の孵卵器に 1 日、3 日、7 日と保存した

ものを、一部は4% NaOH で処理して、5 cc 宛分注した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）で作った PABA 50 μ /cc、活性炭末（Norit A）0.8% に混入した不活性化培地に、また一部は前処理しないでそのまま、5 cc 宛分注した1% 小川培地、Kirchner 寒天培地（血清および保存全血液使用）で作った不活性化培地に、それぞれ0.1 cc 宛を接種して、次のような成績を得た。

1) 対照の蒸留水で作った菌液を培養したときは、4% NaOH で処理するとしないとにかかわらず、不活性化培地と対照培地との間には、集落数のうえにおいて差がなかった。

2) 抗結核剤の溶液に混入した菌液の培養においては、4% NaOH で処理したと、そのまま接種したとの如何にかかわらず、対照培地で陰性であった場合でも不活性化培地が陽性を示すし、菌の接種とともに培地に混入された抗結核剤の濃度が阻止濃度以下のときは、対照

培地にも発育するが、不活性化培地のほうは、対照培地に比して集落が多い。

3) 抗結核剤の種類別に結核菌の検出できる期間をみると、SM, 1NH では直後だけ、VM では1日、KM, PAS では1~3日、Sulfamethizol では7日まで検出できた。なお、滅菌蒸留水による対照の菌液では3~7日まで検出できた。

この論文の一部は、昭和35年7月第8回化学療法学会総会において発表した。

文 献

- 1) 小川・大谷：結核，36：32，昭36.
- 2) 小川・大谷：結核，36：67，昭36.
- 3) Diran Yegian et al. : Am. Rev. Tbc., 71 : 860, 1955.