

## 結核化学療法時における血清の総合的抗菌力検査法の考案

岡本 亨 吉・藤 永 亮 三・山 内 秀 夫

国立療養所村松晴嵐荘

受付 昭和 38 年 5 月 13 日

われわれは、さきに、結核菌の寒天高層混積培養上に INH 溶液を重畳してその濃度を測定する方法を考案し、臨床上使用しうることを提唱するとともに、INH 血中濃度に関する臨床的観察を行ない成績を報告した<sup>1)~3)</sup>。

その後引き続き、SM, PAS, KM, VM 等についても同様の基礎的実験を積み、さらに、各種抗結核剤を使用している患者の血清のそれぞれの抗菌力を、本法によつて標示しうることを観察した。

従来、抗結核剤の抗菌力の生物学的定量法については、薬剤が異なるごとに溶媒、培地ならびに標示菌を異にする例が多い。種々の抗結核剤の併用時における総合的抗菌力の検査には、SCC 法や直立拡散法<sup>4)~6)</sup>が用いられるけれども、前者は手技が繁雑であり、後者は鶏卵含有培地を用いるときにおいては、薬剤の吸着の問題がはなはだ難解であり、また寒天培地を用いるときにおいては結核菌の均等な表面培養が困難である。

混積培養重畳法は、均等な培養を得るのに好都合であり、また体液という実作用的な作用の場にある共通の溶媒を用い、かつ結核菌という共通の標示を用いするので、抗菌力の比較検討に有利であると考えられる。以下本法に関する臨床実験成績を報告する。

## 実験材料および方法

1. 培地：前報<sup>1)~3)</sup>においては自家調製キルヒナー培地を用いたけれども、その後市販デュボス培地および市販のキルヒナー培地も用いうることを知り、これら3者を比較しながら使用した。

2. 培養手技：前報<sup>1)~3)</sup>において述べた手技と同様である。すなわち、上記培地の各成分が2倍含まれている培地で菌浮游液を作り、駒込ピペット等で、約2ml宛ヴィダール試験管に分注し、別に用意した0.5%寒天を同量混じて、冷水で凝固せしめる。

3. 供試菌株：主として業室分離菌株を供試した。デュボス液体培地に10~14日間培養して増菌せしめ、こ

れを上記新培地に対して1%~0.5%の割合に混釈せしめる。

## 実験成績

1. 感受性菌および耐性菌混積培養上に薬剤溶液を重畳した効果

1) 供試菌株：抗結核薬を使用したことのない患者の喀痰から3%小川培地に分離し、さらに試験管内で馴らして、衛生検査法指針の方法により、SM 100 $\gamma$  耐性、PAS 100 $\gamma$  耐性、INH 10 $\gamma$  耐性となつた菌株。

2) 実験：上記菌株をデュボス培地に培養したものを自家調製キルヒナー寒天に混積培養し、寒天柱上に SM, PAS, INH, KM の各濃度溶液を重畳して37°Cで培養した。

3) 成績は (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3) に示すとおりである。

(1) SM 100 $\gamma$  耐性菌は、SM 100 $\gamma/ml$ ~1.0 $\gamma/ml$  溶液を重畳しても阻止帯を現わさないが、INH 1.0~0.1 $\gamma/ml$ , PAS 10~1.0 $\gamma/ml$ , KM 10~1.0 $\gamma/ml$  溶液重畳により約2cmまでの阻止帯を現わす。

(2) INH 10 $\gamma$  耐性菌は、INH 10~0.1 $\gamma/ml$  溶液

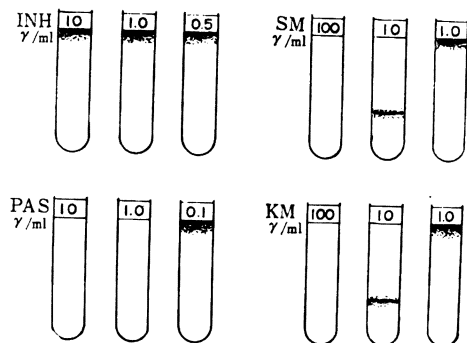
Fig. 1. SM 100 $\gamma/ml$  Resistant Tbc. Bacilli

Fig. 2. PAS 100  $\gamma/ml$  Resistant Tbc. Bacilli

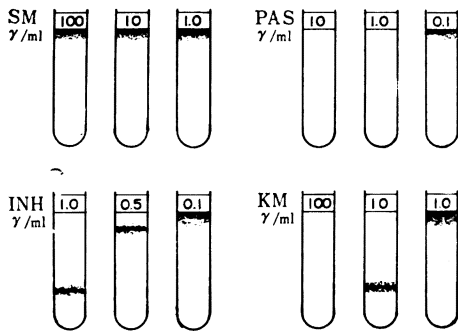
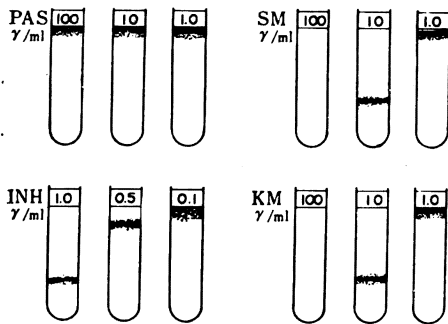


Fig. 3. INH 10  $\gamma/ml$  Resistant Tbc. bacilli



を重畳しても阻止帯を現わさないけれども、SM 10~1.0  $\gamma/ml$ 、PAS 1.0  $\gamma/ml$ 、KM 10~1.0  $\gamma/ml$  溶液重畳により約 2 cm までの阻止帯を現わす。

(3) PAS 100  $\gamma$  耐性菌は PAS 100  $\gamma/ml$  溶液を重畳しても阻止帯を現わさないが SM 10~1.0  $\gamma/ml$ 、INH 1.0~0.1  $\gamma/ml$ 、KM 10~1.0  $\gamma/ml$  溶液重畳により約 2 cm までの阻止帯を現わす。

2. SM 溶液重畳について

(a) 上記供試菌株のほか、業室分離の栗原株も、デュボス寒天培地ではほぼ同じ程度感受性を示した。

(b) SM 耐性菌 (衛生検査法指針による検査成績) について

(1) 上記実験 1 においては、自家調製キルヒナー寒天培地を使用してある。本項の実験においては、同株とデュボス寒天培地を用いた。1,000  $\gamma/ml$  までの溶液重畳によつては、全く阻止帯を示さなかつたが、10  $mg/ml$  溶液重畳でわずか 1~2 mm の阻止帯が現われた。

(2) SM 1 g 筋注 6 時間後の血清重畳の効果 供試血清は 5 例で、各々生理的食塩水で 4 倍、8 倍に稀釈して、各 1 ml を重畳した。

実験成績：阻止帯は全く現われなかつた。

3. VM 溶液重畳について

キルヒナー寒天培地では、1.5  $\gamma/ml$  で表面の発育が

なくなり、12  $\gamma/ml$  で 1.3 cm、25  $\gamma/ml$  で 1.9 cm の阻止帯を示した。デュボス寒天培地では、各濃度に対する阻止帯の幅がわずかに小さかつた。

4. PAS 溶液重畳について

栗原株、滝株、堀川株、H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> 株

自家調整キルヒナー寒天培地で上記株はいずれも PAS 1  $\gamma/ml$  重畳で約 2~1 cm の阻止帯を示し、10  $\gamma/ml$  重畳では集落がきわめて微細で判定困難であつた。

5. KM 溶液重畳について

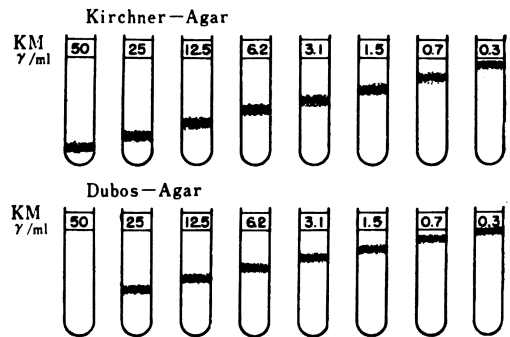
(a) 供試菌株 (堀川株)

供試培地 デュボス寒天培地

血清中 KM 定量を実施したさいに設置された対照を通覧して見るに、本株では、20  $\gamma/ml$  重畳で約 2 cm、1.25  $\gamma/ml$  重畳で阻止帯は 0 に近い。

(b) 培地による相違

Fig. 4. Different Effects of Media on Inhibitory Zones



キルヒナー寒天培地におけるほうが、デュボス寒天培地におけるよりも、阻止帯がわずかに大きく現われた。すなわち (Fig. 4) にみるとおり、堀川株はキルヒナー寒天培地において、KM 25  $\gamma/ml$  重畳により約 2.7 cm の阻止帯を現わし、デュボス寒天培地においては約 2 cm であつた。また最少発育阻止濃度は、キルヒナー寒天培地では 0.3  $\gamma/ml$  以下と現われ、デュボス寒天培地では 0.7  $\gamma/ml$  と現われた。

(c) KM 血中濃度定量法

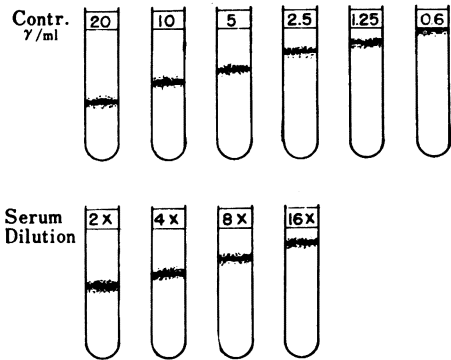
供試菌：堀川株デュボス液体 10~20 日培養

培地：デュボス寒天培地

血清：種々の抗結核薬を使用している患者に、採血の前日から抗結核剤の使用を中止し、当日朝食前 KM 1 g を筋注する。4 時間後昼食前に正中静脈より 5 ml 採血し、遠心沈澱により血清を分離して、生理的食塩水で 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に稀釈したものを各 1 ml ずつ重畳した。

判定法：20  $\gamma/ml$ ~0.6  $\gamma/ml$  の間において、蒸留水で倍数稀釈した KM 溶液各 1 ml を重畳して培養したもの

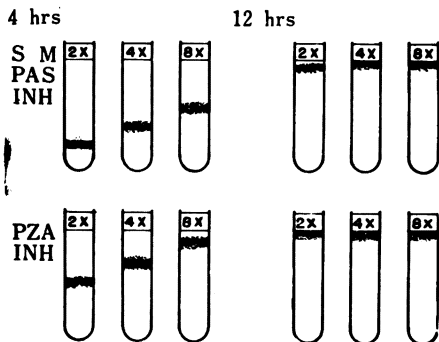
Fig. 5. Titration of KM Serum Concentration



を対照として、5～10日目に観察し、阻止帯の幅を比較して一致する対照の濃度を稀釈血清中 KM 濃度とした (Fig. 5)。各稀釈血清に与えられた濃度値を血清原液の濃度に換算した。すなわち本例では、4倍稀釈血清の阻止帯の幅は水溶液 10  $\gamma/ml$  と 5  $\gamma/ml$  の阻止帯の幅の中間にあり、7  $\gamma/ml$  に相当すると認められる。したがって原液では 28  $\gamma/ml$  と推定される。16倍稀釈血清については 1.25  $\times$  16  $\gamma/ml$  = 20  $\gamma/ml$  と推定される。

(d) 血清中 KM 濃度の分布

Fig. 6. KM Serum Concentration



本項の成績は、前項に述べた方法によつて得た値の算術平均値によつた。その数値を列記すると、8, 9, 9, 11, 11, 14, 14, 14, 15, 15, 19, 20, 22, 23, 23, 24, 24, 24, 25, 27, 27, 30, 30, 33, 37, 40, 40, 40, 40, 40, 40, 80, 80, 80, 80 であつた。

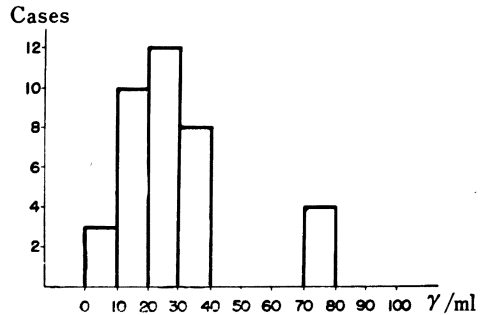
図示すると (Fig. 6) のようであり、大部分は 10～40  $\gamma/ml$  であり、10  $\gamma/ml$  以下、または 80  $\gamma/ml$  以上の例もあつた。

6. 抗結核薬併用時における血清の総合的抗菌力

供試菌株：SM, PAS, INH, KM, VM に感受性の菌株

供試血清：種々の抗結核剤を使用している患者について薬剤摂取後、4時間、6時間、12時間後に採取した血

Fig. 7. The Effect of Serum from Patient under Chemotherapy



清を重畳して、その効果を観察した。1例を図示すると (Fig. 7) のようである。

SM, PAS, INH を摂取して4時間後の血清を重畳した場合は他の例に比して、集落は小さく、数が少なく、阻止帯の幅が著しく大きい。

12時間後の血清重畳では、SM, PAS および INH を併用した血清の場合は、阻止帯がわずかに認められ、集落数が少ない。他の例においては、いずれも阻止帯は全く現れないし、重畳液中にも増殖し、また集落ははなはだ密である。

以下同様の実験により各種血清の抗菌力を観察したのであるが、常に次のような点に注意した。すなわち、毎常同一菌株の混積培養を用いて、同時に数例の血清を検査するように留意した。また血清は、毎回、2倍、4倍、8倍、16倍に稀釈した。なぜならば、併用薬剤の種類または個人的差異により、著しい抗菌力を示す場合は、集落がはなはだ小さく、集落数がきわめて少ないために、集落層を認めがたい場合がある。また逆に阻止帯が現れない場合もある。このような場合、本法の大略を承知するまでは、おのおの場合の条件を考慮しなければならなかつたからである。その結果、毎回同じ条件の混積培養に対して血清が異なるごとに、阻止帯の幅および集落の大きさ、集落数、集落層の幅等が異なることが観察され、互いに他と異なることが確認された。

考 案

1. 混積菌量

混積菌量により、集落層の幅や阻止帯の幅が多少異なることはすでに報告したとおりである<sup>1)</sup>。しかしながら、実験を行なう場合、最初の菌液すなわち Dubos 培養の菌数を一定にすることは困難であるので実験ごとに対照を設置しなければならない。単独薬剤の血清中濃度を測定しようとするときは、そのようにして実施することができる。しかし薬剤を併用するときは、溶媒が血清の対照となるかどうか別々に検討されなければならない。血

清の総合的抗菌力を検査するさい、この問題を避けるために、今回は同一菌液について数例の血清を同時に検査して、互いに他を対照として差異を認めることに注目しながら、一連の実験を行なった。この結果、最初の菌液の菌数を比濁法等により規定するならば、1例の検査でも、阻止帯の幅により抗菌力を検討することができることを修得したと考えるにいたつた。

## 2. 培地について

市販デュボス培地、市販キルヒナー培地、自家調製キルヒナー培地につき、Tween 80, Malachite Green が含まれると否との相違に着目したけれども、いずれも SM, KM, VM, INH の検査に対して支障を与えなかつた。デュボス培地における発育がもつとも良好で、他に比して集落層の幅が小で、阻止帯の幅がやや小さいので観察しやすかつた。

## 3. 標示菌株について

臨床的に単独の薬剤の血清中抗菌力を検する場合は、他の薬剤の残留効果を除外するため、それらの薬剤に対する耐性菌を使用することが望ましく、併用薬剤の総合的抗菌力を検する場合は、いずれの薬剤にも感受性の菌を使用しなければならないのは当然である。

## 4. 採血の時期および稀釈血清について

第1項の実験等にもみられるように、SM, PAS INH, および KM 等については、投与後12時間経過すれば残留効果はきわめてわずかになるので、その後新たに、被検薬剤を投与して4~6時間後の血清について検査するのが適当であると考えられた。しかし、この時期の血清の8倍稀釈でも著しい抗菌力を示し、集落層の発現がない例がしばしばあるので、2~16倍に稀釈した血清を供試するのが適当と考えた。

## 5. KM 血中濃度について

KM 1g 筋注4時間後における血清中濃度については、本法による成績は  $8 r/ml \sim 80 r/ml$  であり、諸家<sup>7)~10)</sup>の測定値とほぼ同じ範囲にあるけれども、なお個人差が著しい。

## 6. 本法の臨床上の意義

抗結核剤の抗菌力または血清中濃度の測定法には、化学的定量法と生物学的定量法が用いられている。生物学的定量法においては SM, KM, VM 等は、ぶどう球菌または枯草菌が供試される例<sup>11)~16)</sup>が多い。化学療法剤が次々と発見され、INH の生物学的定量には結核菌が供試された<sup>4)~17)</sup>。このようなとき、SM と INH 等の総合的抗菌力の標示もまた临床上必要となり、その方法が考究されなければならない。化学的定量法による個々薬剤の血清中濃度だけでは、併用療法における総合的静菌効果を推測することは困難であり、生物学的定量法においても、個々の定量法が異なるときは、同様に併用効

果の推測は困難である。

今回の実験成績は、本法が各種抗結核剤の総合的抗菌力を示すことができることを示唆し、SCC 法、直立拡散法に比して簡便であると思われる。

また各個体の結核菌に対するその個体の血清の抗菌力を検査するならば、症例ごとに、直接的に薬剤の選択について示唆を与えうるのであらうと考えることができる。

## 結 論

結核菌の寒天高層混積培養上に抗結核剤溶液または、化学療法中の患者血清を重疊して培養することにより、おのおの異なる阻止帯を現わすことを観察し、血清の総合的抗菌力を測定する方法を考案した。

したがって、本法により臨床例ごとにその血清の抗菌力を推定することは、薬剤の選択に対して示唆を与えることができるであらうと考えられる。

稿を終るにあたり、御指導御鞭撻を頂いた加納保之教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 宇都宮利善：結核，35：173，昭35.
- 2) 岡本亨吉 他：結核，35：543，昭35.
- 3) 古泉桂四郎 他：結核，37：18，昭37.
- 4) 小川政敏：日結，16：417，昭32.
- 5) 小川政敏：結進，24：189，昭34.
- 6) Schmiedel, A.: Zeitschr. f. Tbk. 112：48, 1958.
- 7) 市川篤二：カナマイシン・シンポジウム，日本医師会・日本医学会，昭33.
- 8) 石山俊次：カナマイシン・シンポジウム，日本医師会・日本医学会，昭33.
- 9) 金沢裕：J. Antibiot. B. 8：295, 1960.
- 10) 北本治：J. Antibiot. B. 15：1, 1962.
- 11) 鳥居敏雄・川上保雄：J. Antibiot. B. 13：295, 1960.
- 12) 鳥居敏雄・川上保雄：J. Antibiot. B. 2：719, 1949.
- 13) 金沢裕：J. Antibiot. B. 2：780, 1949.
- 14) 石田名香雄 他：J. Antibiot. B. 2：増刊 B 79, 1949.
- 15) 清水五百子：J. Antibiot. B. 3：651, 1950.
- 16) 金沢裕・宮村定男：J. Antibiot. B. 13：295, 1960.
- 17) Mandel, W. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91：409, 1956.

### **A Method for Evaluation of Antituberculous Drugs by Their Diffusion into Depth Culture of Tubercle Bacilli in Semi-Solid Agar Medium.**

The aim of our study is to investigate the properties of semi-solid agar medium for depth culture of tubercle bacilli as compared with those of solid medium for surface culture and with those of liquid medium for submerged culture. The results have been reported in part. The observations made by us disclosed that in cultures under oxygen environment or with INH solution superposed on the medium, the disc of colonies submerged below the surface of the medium, the distance from the surface of the medium being related to the concentration of INH, that is, the growth of tubercle bacilli was inhibited in the uppermost layer of the medium.

Each of minimum inhibitory concentrations of SM, KM, VM, PAS and INH obtained with this culture method using semi-solid agar medium was very close to that obtained from the dilution method with liquid medium.

The present method was also found to be useful for the detection of the antibacterial effect of sera of patients under treatment with various antituberculous agents. Following are the results obtained.

1) Serum level of KM after intramuscular administration

The minimum inhibitory concentration of KM obtained with the present method was about 1 mcg/

ml, and this method could be employed for measuring the concentration of KM ranging from 20 to 1 mcg/ml.

Two-fold dilutions of the serum were used for the tests. Serum levels 4 hours after 1 gm intramuscular administration in 30 cases ranged from 80 mcg/ml to less than 10 mcg/ml.

2) Specific effect of serum under combined drug therapy

The depths of the inhibitory zones and appearances of discs varied in accordance with the various drugs combined as in the cases treated with INH or KM. Especially, serum 4 hours after SM-PAS-INH administration showed marked growth inhibitory effect in the tube cultures. Colonies in the discs were smaller and less in number than those in cases treated with INH or KM alone. The growth inhibitory effect of sera collected 12 hours after administration was less than 4 hour sera.

At present, various antituberculous agents are clinically available and usually given combined. Therefore, it is important to know the total effect of the combined drug therapy in vivo as well as the effect of individual drugs in vitro.

The culture method described can be used for the evaluation of the total effect of the combined drug therapy with a single medium and sera of patients.

Tubercle bacilli grow in 5 to 6 days with this culture method and the examination described above can be conducted in this short period.