

小川鶏卵培地における抗結核剤と結核菌との 接触時間と効果との関係

金井 興美・岡本 茂広・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部（部長 室橋豊穂）

受付 昭和 38 年 6 月 10 日

現在わが国では結核菌の薬剤感受性試験培地として小川培地がもつとも広く用いられているが、この培地における抗結核剤と結核菌との接触時間と効果との関係は薬剤の培地内での安定度と絡んで試験結果を支配する大きな因子である。たとえば培地中の薬剤の菌に対する決定的な作用が、比較的短時間のうちに決まるものであれば、薬剤濃度が菌接種後にふ卵器中で徐々に減じても、そのことは試験の最終結果を左右するにはいたらないであろうし、逆に抗菌力の発揮に長い接触時間を要するものであれば、ふ卵器中での力価減少は、重要な意味をもつことになる。

この関係はさらに、抗菌作用の内容が殺菌的か静菌的かによつて異なるであろうし、また薬剤濃度の如何によつても同一ではない。これらは結核菌の場合ことに考慮を要する点である。

以上はきわめて重要な問題であるにもかかわらず、具体的に検討された報告はほとんどみられない。それは理想的な実験方法が見当たらないためと思われる。著者らはこの問題の実際的な重要性を考えて、2種類の実験手法から検討を試み一応の結論に達したので報告する。

実験材料

菌株：H37 R_v, H37 R_v SM-R, BCG。

培地：原液に第1磷酸カリを1%に含有する小川鶏卵培地。

薬剤：Dihydrostreptomycin sulfate (SM と略), isoniazid (INH と略), PAS (Na 塩)。

実験方法

薬剤含有小川培地上に接種された結核菌はそこで薬剤と接触すると考え、一定時間経過後に、再びこの接触環境から離して薬剤を含みぬ小川培地に移して集落形成能をしらべ、集落発生数の変化を時間的に追求め殺菌力と

接触時間との関係を検討した。しかし薬剤環境から菌を離すことはこのような固型培地の場合には理想的な方法と考えられないので、次の2つのことなる手段を用い、その双方の成績から総合的に判断を下すことにした。

1) 全培地乳剤稀釈法

対照あるいは薬剤含有小川培地上に BCG を 0.1 mg (1 mg/ml 菌液を 0.1 ml) 接種した。各薬剤濃度につき必要数の培地を用意し、接種直後および日を追つて2本ずつをつぶして実験を行なつた。まず培地全体を抜き出し、これをホモジナイザーに移して2% NaOH を 1 ml、さらに蒸留水を 10 ml 加えて均等乳剤とした。次に蒸留水を用いて10倍稀釈系列をつくり、それらを 0.1 ml ずつ薬剤を含みぬ小川培地に接種して、37°C 4 週後の集落発生数を観察した。集落計数可能な稀釈度においては被検培地に由来する薬剤は問題とならぬ程度に稀釈されるのがこの方法の利点であり、逆算して被検培地上の生菌数を知りうるわけである。

2) 洗出法

薬剤含有培地および対照培地をそれぞれ必要数用意し、H37 R_v 株を 10⁻⁶ mg 一様に接種した。同時に、10⁻⁶ mg まで稀釈して別の対照培地に接種してそのさいの接種生菌数を測定する。一定日数後、菌接種培地上に 0.01% Triton WR-1339 溶液 1 ml を加え、適当に表面を流しつつ洗滌する。培地3本よりの洗滌液を集め、さらに蒸留水を用いて連続10倍稀釈を行なつて、これらを 0.1 ml ずつ対照小川培地に接種し、発生集落数より被検培地上の総生菌数を逆算した。

実験成績

1) 全培地乳剤稀釈法

この方法によつて実験を2回行ない、その成績を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。第1実験においては、SM 5 mcg/ml, INH 0.025 mcg/ml, PAS 0.25 mcg/ml に

Fig. 1. Bactericidal Effect of Antituberculous Agents in Relation to Exposure Time on Ogawa's Glycerol Egg Medium

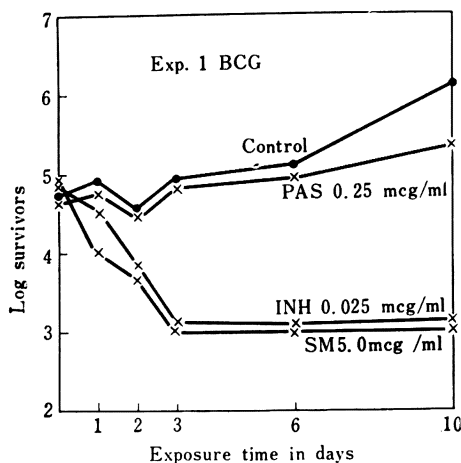
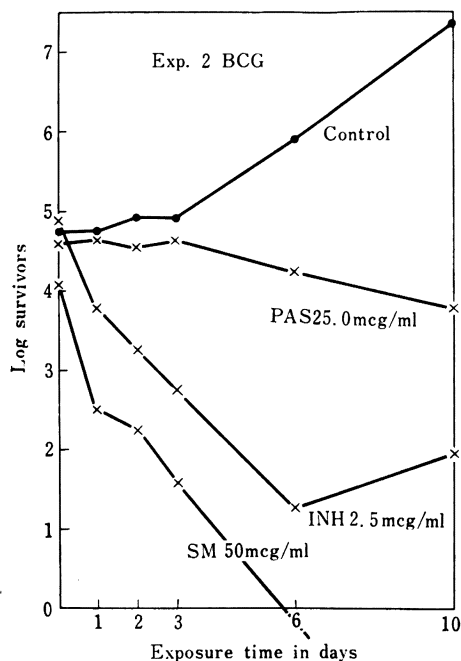


Fig. 2. Bactericidal Effect of Antituberculous Agents in Relation to Exposure Time on Ogawa's Glycerol Egg Medium



ついて検討し、Fig. 1 には乳剤とした培地 0.5g 中に含まれる生菌数を示した。これによつて小川培地上において上記薬剤濃度に接触した菌が、1日、2日、3日、6日および10日後にどの程度に殺菌されるかが分かる。また 10^{-1} mg、 10^{-3} mg および 10^{-6} mg 接種4週後の発育所見を Table 1 に示した。これはいわゆる発育阻止

Table 1. Growth-inhibitory Effect of Antituberculous Agents Observed at the End of Week Incubation at 37°C (Extended Observation of Exp. 1)

Size of inoculum (mg)	Growth at below-indicated drug concentration			
	Drug-free	SM 5 mcg/ml	INH 0.025 mcg/ml	PAS 0.25 mcg/ml
10^{-1}	+++	1*	64	+++
10^{-3}	+++	0	1	66
10^{-6}	58	0	0	1

* Number of colony.

効果をみたもので、殺菌効果と静菌効果との双方の総合された結果である。

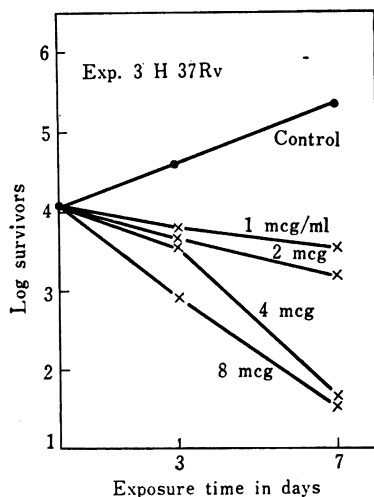
さて菌接種後10日間において、対照培地では200倍の菌数増加がみられたが、この間 SM 5 mcg/ml、INH 0.025 mcg/ml においては逆に1/80、あるいは1/40程度に菌数減少を示し、これらの薬剤はこのような低濃度においても殺菌作用を示すことが証明された。またこの殺菌作用は接触1日間ですでに表現され、3日後にはそれぞれその効果を発揮しつつある印象を与える。さらにまたこのまま培養を継続して4週後の発育阻止効果を見ると、SM についてはわずか1コの集落発生を、また INH の場合は63コの集落発生を許したにすぎない。すなわち接種後10日以上では殺菌作用は一層強まるか、あるいは殺菌されない菌細胞に対しても静菌作用の働いている可能性が示唆されている。他方 PAS 0.25 mcg/ml については図の示すごとく殺菌効果はみられないが、表に示された発育阻止効果からみて、この抗結核剤が静菌作用を示していることが分かる。

第2実験においては、SM 50 mcg/ml、INH 2.5 mcg/ml、PAS 25 mcg/ml と濃度をあげ、前と同一要領で検討した。SM、INH はきわめて顕著な殺菌力を発揮し、10日接触後 SM によつては10万分の1程度に、また INH によつては千分の1以下に生菌数が減少した。これに対して PAS 25 mcg/ml との接触によつては、10日後にわずか10分の1程度に減じたにすぎない。SM、INH の殺菌作用は接触3日にしてすでに著明であり、約99%の菌を殺しているの、小川培地でのこれら薬剤の安定度はさほど考慮せずとも、はじめの含有量に正確を期すれば、実験結果は動揺しないと考えられる。これと逆の事情は PAS についていえるであろう。

2) 洗出法

この方法に関しての最初の疑問は、接種された菌、あるいはその後増殖した菌数のうちの程度が回収されるかという点であつた。そこで予備実験として、接種生菌数の測定と同時に、接種直後に既述のごとき回収培養を試みたところ2回の成績は次のごとくであつた。はじめ

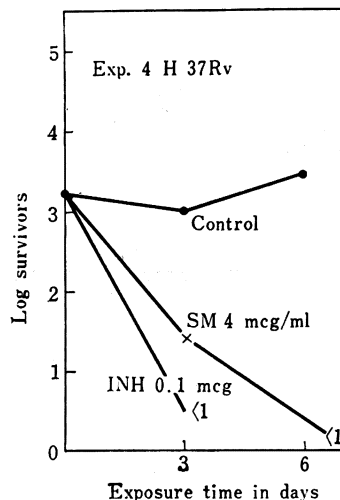
Fig. 3. Bactericidal Effect of Antituberculous Agent (Streptomycin) in Relation to Exposure Time on Ogawa's Glycerol Egg Medium



の実験では 18×10^8 のうち 11×10^8 , 次の実験では 17×10^2 のうち 13×10^2 が回収された。この程度によく回収され、また前述の全培地乳剤稀釈法でみられたような傾向がここでも得られるとすれば、この実験方法は十分に目的を達するであろう。そこで本実験を2回行なった。第3実験、第4実験としてその成績を Fig. 3 と Fig. 4 に示した。

第3実験においては、SM の 1, 2, 4 および 8 mcg/ml について検討し、接触3日および7日後の菌数について追求した。Fig. 3 に示したように SM 1 mcg/ml および 2 mcg/ml では7日後も10分の1にも菌数を減少せしめないが、4 mcg/ml となると約100分の1に減少せしめている。この効果は Fig. 1 の SM 5 mcg/ml の効果ときわめて近似のものと考えられ、検査方法は異なっても、よく殺菌効果の実態を表現しうる点で同一視できる。またこの洗出法の場合、菌と同時に被検培地中の薬剤が洗出されないかという疑問もあろうが、単に培地表面を軽く洗滌するにすぎず、培地内部からの洗出効果は考慮の外である。しかも洗出液を稀釈して培養するという段階を経ているので、よく第1実験と符合する成績が得られたものであろう。SM 4 mcg/ml の効果は Fig. 4 に示した第4実験でも再現されている。ここでは INH 0.1 mcg/ml が3日間の接触で100分の1以下に菌数を減少せしめたが、これは Fig. 1 における INH 0.025 mcg/ml の効果からみても当然であろう。

Fig. 4. Bactericidal Effect of Antituberculous Agents in relation to Exposure Time on Ogawa's Glycerol Egg Medium



ここで追加したい点は Fig. 3 でみられた SM 1 ないし 2 mcg/ml の殺菌効果は少なくともこの実験での接触期間では弱かつたが、4週間そのまま培養を続けて発育阻止効果をみると、1 mcg/ml では対照の約250分の1の菌が、また 2 mcg/ml では3万分の1の菌が発育したにすぎなかつた。したがって SM 1 ないし 2 mcg/ml という濃度も、7日以上接触せしめれば殺菌作用の強まる可能性もあろうし、あるいは殺されない菌細胞にも静菌的に働きうる可能性も考えられる。いずれにせよこれらの濃度は SM が有効であるぎりぎりの線と考えられるので、SM は小川培地添加後 37°C に保持されても比較的稳定であるといえよう。

考 察

一般細菌の場合と異なり、結核菌の場合には培養期間が長いので、培地に添加された抗結核剤の安定度は常にわれわれの関心の的となる。同時にそれら薬剤の抗結核菌作用は一体どの程度の接触時間のうちに決定的、あるいは不可逆的な影響力を及ぼすかという点も現実的な問題となる。もちろん抗菌力は菌の発育過程、生理的条件、培地環境、薬剤の種類によつてまちまちであろうが、われわれにとつてもつとも関係の深い SM, INH, PAS という薬剤を小川鶏卵培地で、しかも発育阻止の最低濃度に近いところで検討したところにこの実験の意義があるといえる。耐性検査という実際の問題とも絡んで重要な事柄であるにもかかわらず、小川培地上での薬剤の接触

期間と効果との関係はこれまでほとんど知られていない。それは既述のごとく、理想的な実験方法がこのような固型培地では見当たらないためと思われる。それならば改善の策をもつてしても検討すべきであつて、われわれは2種類の方法、すなわち全培地乳剤稀釈法と洗出法を考案して実験し、その成績がほぼ一致することから一応の結論を出しうると考えている。

SM, INH に関しては最低発育阻止濃度をすこし上回つた濃度において、かなり顕著な殺菌作用がみられ、しかもその効果は24時間接触ですでに著明であり、3日にして効果は表現しつくされる印象を受けた。また数日間の接触によつては殺菌効果の顕著でない SM 1 ないし 2 mcg/ml という濃度も、発育阻止効果はかなり著明であるので、これらの濃度における静菌作用という点に注目すべきであろう。そして SM の小川培地での安定性を問題とすれば結局この 1 ないし 2 mcg/ml が 37°C における培地中ではたしていつまでもつかという点になるであろう。なぜならはじめ 1 mcg/ml で発育阻止、すなわち静菌作用を受けていた菌は 1 mcg/ml 以下に SM の力価が減少するに及んで再び増殖を開始することは当然考えられることであり、もしはじめの 1 mcg/ml がそのまま維持されていれば、発育阻止濃度の判定において異なる結果を来たしうるからである。

このことは殺菌作用の著明に発揮される濃度での力価減少とは比較できないほど大きな意味をもっている。事実 SM 1 ないし 2 mcg/ml という濃度においては、結核菌は対照培地におけるより発育集落数が少ないというばかりでなく、集落を形成してくる時期がずれるという現象があり、このことも静菌作用と力価安定度、それに接触時間の3者よりなる一つの総合的な結果である。同様のことは INH についてもいえる。また PAS について

は本実験はその静菌性が主体であり、殺菌性のきわめて乏しい事実を証明しているので、小川培地中における PAS の安定度はことに重要であろう。

さて SM の殺菌性についてはすでに多くの報告があり疑う余地はなく、われわれりもかつて報告したが、われわれの経験に比べると殺菌効果がきわめて弱いという報告もある。たとえば、上野²⁾による Kirchner 培地を用いた実験はその代表的なものと考えられるが、小川培地や Sauton 合成培地が表面培養であるに反し、Kirchner 培地はいわゆる深部培養で菌は液体培地の底に発育するので培養条件は明らかに異なっている。そこで著者らは抗結核剤の殺菌性と培地通気性、あるいは酸素分圧という点にも視野を広め、さらに接触時間との関係も含めて次報において検討を試みることにした。

総 括

小川培地での SM, INH, PAS の抗結核菌力と、菌-薬剤接触時間との関係を、2種類の異なる実験手技で検討したところその結果はほぼ同一であつた。SM は 4 mcg/ml, INH は 0.1 mcg/ml で接触3日間後すでにきわめて顕著な殺菌力を発揮し、PAS は静菌作用が主であることが証明された。少なくとも小川培地においては、発育阻止試験の結果に影響する菌-薬剤接触時間と薬剤安定性との関係は、SM 1 ないし 2 mcg/ml のような発育阻止限界濃度での静菌作用の場合か、PAS のごとき本質的に静菌的な薬剤の場合に問題となり、殺菌濃度においては問題とはならないと考えられる。

文 献

- 1) 金井興美：日本細菌学雑誌，10：177，昭30.
- 2) 上野高正：日本細菌学雑誌，9：499，昭29.

The in Vitro Effect of Antituberculous Agents in Relation to the Exposure Time on Ogawa Glycerol Egg Medium.

The in Vitro Effect of Antituberculous Agents in Relation to Drug-Exposure Time on Ogawa Glycerol Egg Medium.

Here in Japan, Ogawa glycerol egg medium is now most frequently used for drug-sensitivity test of tubercle bacilli. However, little information has been available concerning the relation between drug-exposure time and antibacterial effect on this medium. This problem is directly concerned with the stability of potency of antituberculous drugs. In other words, if the decisive effect of test drugs is

exerted upon the bacilli more rapidly than the potency-decreasing rate of the drugs, there will be little obstacles in the test. If the reverse is the case, however, the test result might be altered more or less. This state of affairs will not be the same depending upon the nature of drug effect (bactericidal or bacteriostatic) and also upon the drug concentration.

The present authors examined the above problem using streptomycin (SM), isoniazid (INH), and PAS as test drugs. Namely, a time-course viability test was conducted by liberating the bacilli once inoculated upon drug-containing Ogawa megium slants and then by reinoculating then upon fresh drug-free

media. In this way, the bactericidal effect of the drugs was checked in relation to drug-exposure time. Two different methods were employed for liberation of the bacilli from drug environment. One of them was to homogenize the whole medium and dilute it by ten-fold steps so that the drug concentration might be low enough and the bacillary number might be adequate for subsequent colonial counting. The other method was to wash the surface of bacilli-inoculated media with a 0.01% solution of Triton WR-1339, and this washings and the serial ten-fold dilutions were used for viability test.

Fig. 1, 2, and Table 1 are the results according to the former technique and Fig. 3 and 4 are those according to the latter technique. Despite of the difference in technique, the results showed the same

tendency. Namely, SM in the concentration of 4 mcg/ml and INH of 0.1 mcg/ml showed a marked bactericidal effect after only 3 day contact with bacilli inoculated onto Ogawa medium slants. On the other hand, the activity of PAS was proved mostly bacteriostatic.

The observations gave us a suggestion as follows. The relation between drug-exposure time and antibacterial activity, which will be a factor in drug-sensitivity test in association with the stability of drug potency, must be taken into our consideration especially concerning the bacteriostatic concentrations of SM and INH or in the case of essentially bacteriostatic drugs such as PAS, but it is not so vital problem concerning the bactericidal concentration of SM and INH.