

集落計数可能な培地における抗結核剤の 抗菌力表現の差異に関する研究

第1報 1%小川培地、キルヒナー寒天培地およびキルヒナー 半流動培地における抗菌力の差異

賀 来 隆 二

国立予防衛生研究所結核部（部長 室橋豊穂）

受 付 昭 和 38 年 7 月 13 日

新しい抗結核剤の効力を試験管内で検討するには、その物質の抗菌力が、培地組成等の因子により妨げられずに表現され、成績の判定が容易でありしかもその判定に客観性がある培地を使用することが理想的である。

そこで、既知の抗結核剤の抗菌力が培地の種類によってどのように表現されるかをしらべることにより、抗結核菌力に及ぼす培地の影響を再検討した。

このことは、薬剤耐性検査の実際にも関連することが大きいと思われるので、供試培地としては日常使用される頻度の高いしかも耐性集落数を数えるものを選んだ。すなわち、固形培地として、鶏卵を用いる小川培地および寒天を固形培地の基材とするキルヒナー寒天培地の2種と、培地性状としては液体培地に近いキルヒナー半流動培地との計3種の培地である。

実験材料および方法

I. 供試薬剤 1) dihydrostreptomycin 硫酸塩 (DHSM), 2) viomycin 硫酸塩 (VM), 3) kanamycin 硫酸塩 (KM), 4) isoniazid (INH), 5) ethionamide (1314 Th), 6) para-aminosalicylic acid-Na (PAS)。

II. 供試菌株 人型結核菌 $H_{37}R_v$ 株。

III. 供試培地 1) 1%小川培地（以下卵培地と略）、2) 10%馬血清加キルヒナー寒天培地（寒天培地）、3) 10%馬血清加キルヒナー半流動寒天培地（半流動培地）。

IV. 薬剤の溶解および薬剤含有培地の作製。

1314 Th は propylen glycol に溶解し、他の5種の薬剤には蒸留水を用いた。また稀釈はすべての薬剤とも蒸留水で行なった。

1) 卵培地：培地原液に全卵を混和後、培地 100 ml につき2倍稀釈によつて最終所要濃度の100倍量の薬剤を含ませた薬剤稀釈液を1 ml の割合で混入した。これを中試験管に6 ml ずつ分注し、90°C、1時間の凝固滅菌を行なつた。ただし DHSM は標定濃度の2、4および8倍量を含ませた。

2) 寒天培地：寒天を1.5%に加えた基礎培地を15 lb、30分間高圧滅菌し、培地温度が55~50°Cに降下するのを待ち、濾過滅菌馬血清を10%の割合に加えた。さらにこれに卵培地における同様の方法により薬剤稀釈液を加え、混和後、中試験管に5 ml ずつ分注し、斜面として凝固させた。

3) 半流動培地：寒天を0.1%の割合に加えた基礎培地を、寒天培地の場合と同様の滅菌処理および馬血清の添加を行ない、中試験管に4.5 ml ずつ分注した。そのうゑに最終所要濃度の10倍量の薬剤を含む稀釈液を0.5 ml ずつ注加し、希望する濃度の薬剤を含む培地を作製した。また3培地とも37°C、24時間の無菌試験を行なつたあと実験に供した。

V. 菌接種 1%小川培地8日培養の $H_{37}R_v$ 株を水晶球入り丸コルペン手振法にて均等菌浮游液とし、比濁により約1 mg/ml の菌液を調整した。これを順次10倍稀釈して1 mg/ml から 10^{-6} mg/ml にいたる6段階の菌液を作り、おのおの0.1 ml ずつ接種した。

VI. 判定 卵培地および寒天培地は37°C 培養4週後に、半流動培地は3週後に発育集落数を数えた。この場合、1薬剤濃度につき3本ずつ置いた試験管にともに必ず発育集落が認められるもののうち、最高稀釈菌量を接種した試験管での集落数の平均値を出し、これにより、

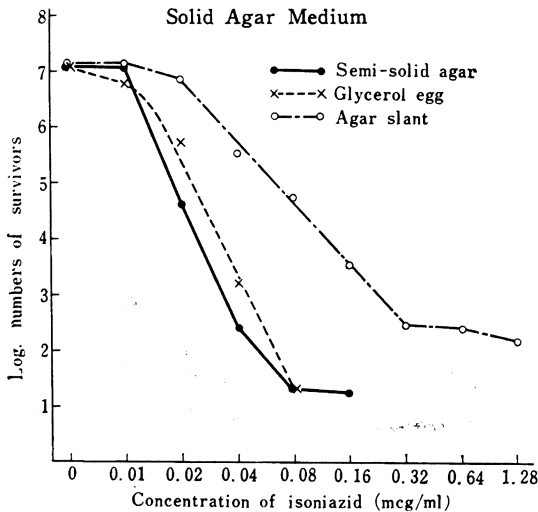
各薬剤濃度における菌 1 mg 中の生存菌数を算出した。ただし、高濃度薬剤含有培地では、1～2本の試験管のみに集落が認められた場合でもその数を平均した。

実験成績

上述の判定方法により得られた各薬剤濃度での生存菌数により、卵培地、寒天培地および半流動培地における各種抗結核剤の菌発育阻止力を比較示したのが図1～5である。以下個々の薬剤について述べる。

1) INH (図1)

Fig. 1. Comparison of the Anti-Microbial Activity of Isoniazid Against $H_{37}R_V$ on the Glycerol Egg, Kirchner's Agar Slant, and in Kirchner's Semi-Solid Agar Medium

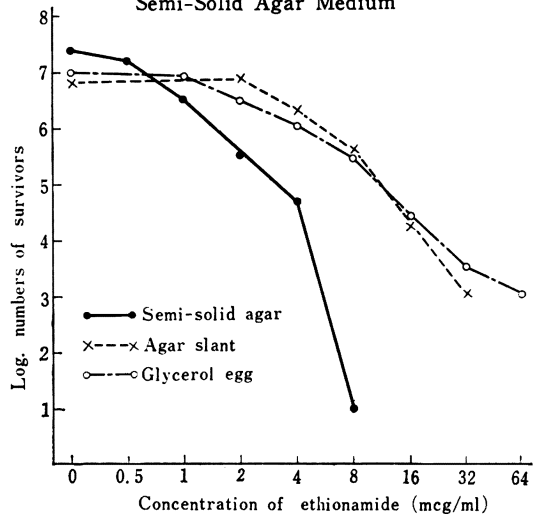


INH は寒天培地では他の2培地におけるよりも抗菌力が低く現わされていた。すなわち、半流動培地および卵培地では、約 $10^{-1}/mg$ V. U. の菌中 0.08 mcg/ml でわずかに約 20 コの集落が認められるにすぎなかったが、寒天培地ではなお 10^5 に近い菌数が数えられ、前2培地で生存菌が認められなかった 0.32 mcg/ml でも寒天培地には 3×10^2 の菌が生残していた。また寒天培地での生存曲線は半流動培地および卵培地でのそれと平行せず、INH の濃度が増すに従って菌数の差が大きくなってゆく傾向がみられ、再実験によつても同様の傾向が再現された。半流動培地と卵培地とを比較すれば、半流動培地でやや抗菌力が強く表現されていたが、その差は菌数にしてほぼ 1 order 程度の開きであつた。

2) 1314 Th (図2)

1314 Th は卵培地および寒天培地で抗菌力が弱く現わされていた。すなわち、半流動培地では 0.5～1 mcg/ml から菌数の減少がみられはじめ、8 mcg/ml で約 10 (0.000036 %) の生存菌が数えられるのみであつたが、

Fig. 2. Comparison of the Anti-Microbial Activity of Ethionamide Against $H_{37}R_V$ on the Glycerol Egg, Kirchner's Agar Slant, and in Kirchner's Semi-Solid Agar Medium

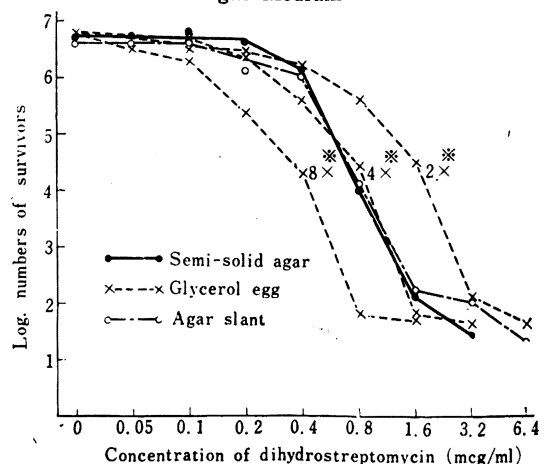


卵培地および寒天培地ではまだそれぞれ 3.7×10^5 (約 7 %), 15×10^4 (約 1.8 %) の菌が認められ、32 mcg/ml でもなお約 10^8 の菌が生残していた。

3) DHSM (図3)

DHSM の抗菌力は半流動培地および寒天培地では等しく現わされていた。しかし、卵培地では減弱がみられ、前2培地に匹敵する抗菌力を卵培地で表現させるためには、加熱凝固前に4倍量の DHSM を含ませておく必要

Fig. 3. Comparison of the Anti-Microbial Activity of Dihydrostreptomycin Against $H_{37}R_V$ on the Glycerol Egg, Kirchner's Agar, and in Kirchner's Semi-Solid Agar Medium



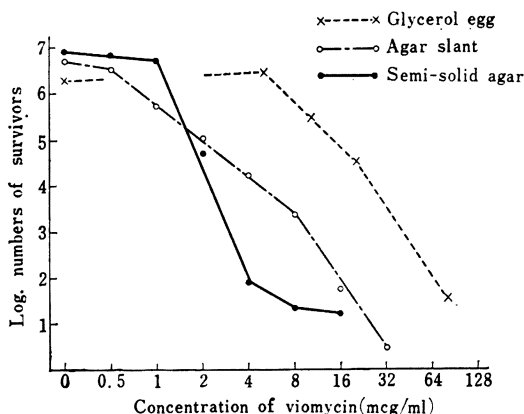
Note: *Actual concentrations of DHSM contained in the egg media are 2, 4, or 8 times as much as the concentration on the scale.

があつた。

4) VM (図4)

VMの抗菌力は半流動培地でもつとも強く、以下寒天培地、卵培地の順に弱く表現された。

Fig. 4. Comparison of the Anti-Microbial Activity of Viomycin Against $H_{37}R_V$ on the Glycerol Egg, Kirchner's Agar Slant, and in Kirchner's Semi-Solid Agar Medium



卵培地での生存曲線は寒天培地でのそれとほぼ平行した曲線が得られ、卵培地での VM の抗菌力は寒天培地での約 1/4~1/6 程度だと推定される。しかし、半流動培地での生存曲線は他の 2 培地での曲線と平行せず、寒天培地および卵培地では割合に緩やかな菌の減少がみられたのに対し、半流動培地での抗菌力は急激な菌の減少を示した。

5) KM (図5)

KM の抗菌力も半流動培地、寒天培地、卵培地の順に減弱して現われていた。しかし、半流動培地と寒天培地との差はわずかであり、約 1 order の菌数の開きがみられたにすぎなかつた。これに対し、卵培地での抗菌力の減弱は著しく、寒天培地で接種菌数を約 1 order 減少させた KM の濃度は 0.4 mcg/ml であり、また約 3 order の減少が 0.8 mcg/ml で約 5 order の減少が 1.6 mcg/ml でみられたのに対し、卵培地でこれに対応する菌数の減少を現わした KM 濃度は、おのおの 6.4 mcg/ml, 12.8 mcg/ml および 25.6 mcg/ml であり、卵培地での KM の発育阻止力は寒天培地でのほぼ 1/16 程度だと思われる。

6) PAS (表1)

PAS を含有させた供試 3 培地での菌の発育は非常に dysgonic であつたため、集落数を正しく数えることができなかった。そこで PAS についてはおのおのの培地

での 10^{-3} mg 菌量接種時の抗菌力を表示した。PAS は発育阻止濃度だけでみれば、3 培地とも同様な抗菌力を現わしていた。しかし発育集落の有無の判定は卵培地がもつとも容易であり、半流動培地では困難であつた。

Fig. 5. Comparison of the Anti-Microbial Activity of Kanamycin Against $H_{37}R_V$ on the Glycerol Egg, Kirchner's Agar, and in Kirchner's Semi-Solid Medium

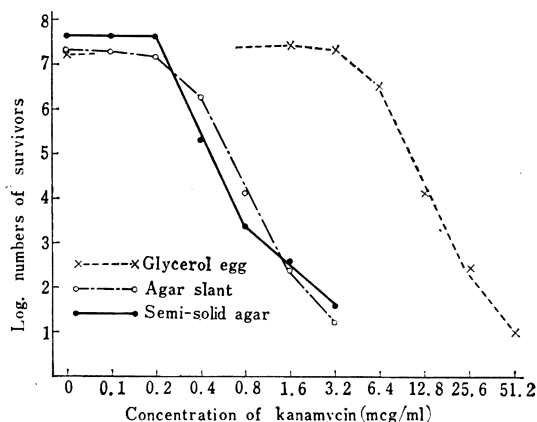


Table 1. Comparison of PAS Susceptibility of $H_{37}R_V$ on Glycerol Egg Medium, Kirchner's Agar Slant and in Kirchner's Semi-Solid Medium

Strain	Medium	PAS mcg/cc				
		0	0.01	0.05	0.1	0.5
$H_{37}R_V$	Glycerol egg	++	++	++	++	-
	Kirchner's agar slant	++	++	++	+	-
	Kirchner's semi-solid	++	++	++	+	-

総括および考察

種々の培地での抗結核剤の発育阻止力の差異を系統的に比較検討した報告としては、供試培地として 4 種の液体培地を用いた早坂¹⁾ および液体培地 2 種と卵培地とで比較を行なつた津久間²⁾ らの報告がみられるが、いずれもおのおのの培地での薬剤の最小発育阻止濃度をみることにより検討が加えられている。しかし発育集落数を数える培地を用いておのおのの培地での抗菌力の現れ方を比較する場合には、同一菌集団を接種すれば、薬剤を含有する各培地における発育集落数の差によつて発育阻止力の現れ方の強弱を、しかも抗菌力を現わし始めた濃度から、発育を完全に阻止し終わった濃度にかけて、定量的に知ることが可能となる。このためには、薬剤を含まない対照培地での菌の発育性にも差がみられないこと

も一条件であるが、著者の供試3培地での菌1mgあたりの生菌単位数にほとんど差の認められないことから、薬剤を含む各培地での発育菌数の差は、おのおのの培地での抗結核剤の抗菌力の差を現わすものとみなしてよいと考えられる。

一般に抗生物質は、卵培地でその抗菌力が低下して現われることは広く認められており、衛生検査指針³⁾にもDHSMは卵培地には所要濃度の2倍量を含ませるよう指示されている。卵培地と半合成培地での耐性検査成績で、卵培地に2倍量のDHSMを含ませてもなお卵培地で耐性値が高く現わされるという報告^{4),5)}がみられるが、著者の成績も、卵培地で薬剤感受性菌の菌数を半流動培地または寒天培地におけるとほぼ等しく減少させるためには、加熱凝固前に4倍量のDHSMを加えておく必要があつた。しかしこの4倍という値は1%小川培地とキルヒナー半流動培地または同寒天培地との間の抗菌力の現され方の差であつて、卵培地中でのDHSMの力価減少値を意味するものではない。したがつて抗菌力の表現に2倍以上の差がみられる培地を用いて耐性値を比較すれば、たとえ2倍量のDHSMを加えたとしても卵培地で耐性値が高く示されるのは当然のことであり、耐性値の不一致という現象から、ただちに卵培地へのDHSMの補足量を云々することは早計だと思われる。

KMおよびVMの卵培地での抗菌力の現れ方については、大川⁴⁾はキルヒナー寒天培地との間にKMは20倍、VMは5倍の抗菌力の差を認め、また耐性検査の比較を行なつた小川(政)⁶⁾は、卵培地でのKMはキルヒナー寒天培地のほぼ1/10に阻止力が低下していたと報告し、中井⁷⁾らも、同じく卵培地では寒天培地での1/10程度の抗菌力を現わすにすぎなかつたと発表している。これらの報告者と類似の、または同一組成の培地を用いた著者の成績も、卵培地でのKMの抗菌力は寒天培地のほぼ1/16程度と推察された。しかし、卵培地中でのKMの抗菌力価を測定した林ら⁸⁾によれば1%小川培地中のKMは、22~14%が残存していたと述べている。したがつて、培地間の比較でみられた発育阻止力の差よりも、卵黄成分への吸着^{8),9)}による抗菌力価減少の割合のほうが小さく、力価の減少分を補つたとしても卵培地と寒天培地での抗菌力は等しく現わされないとと思われる。

またVMやINHでみたごとく、菌の減少がおのおのの培地で平行して現わされない、換言すれば低濃度の薬剤を含ませたおのおのの培地での抗菌力の差と、高濃度の薬剤を含有した培地での抗菌力の差が等しく現わされないものもあり、比較培地間の抗菌力表現を、1菌量接種時の最小発育阻止濃度のみによつて比較してもその値が各濃度に共通した差を示すものとならない場合もあることに注意する必要があると思われる。

合成剤が寒天培地でその抗菌力を低下して現わされることに関しては、佐藤¹⁰⁾はキルヒナー寒天培地と1%小川培地とを用いてINH耐性検査を行なつたところ、キルヒナー寒天培地のほうが高い耐性値が得られたと報告し、また高橋¹¹⁾は、彼のアルブミン寒天培地と小川培地でINH耐性菌の耐性値を比較し、アルブミン寒天培地がやや高い耐性値を示す傾向をみている。しかし、高橋はこの原因をアルブミン寒天培地は小川培地よりINH耐性菌の発育に適しているためではないかとしている。薬剤感受性菌を用いた著者の成績もINHの抗菌力は寒天培地では低下して現わされていたが、半流動培地での結核菌の発育は、ルーベを使用すれば4日で判定できるというKnox¹²⁾の報告のように、寒天培地に比べればはるかに勝れており、半流動培地と寒天培地とでのINHの抗菌力の差が、菌の発育に対する培地の適否のみによつて生じたものとは思われず、菌と薬剤との接触環境の相違のほか、寒天自身の影響も無視しえないものと考えられる。

しかし1314Thについては、キルヒナー寒天培地と同半流動培地とではその抗菌力に差がみられなかつたとの報告¹³⁾もあり、これらの成績と著者の成績との相違の原因については明らかでない。

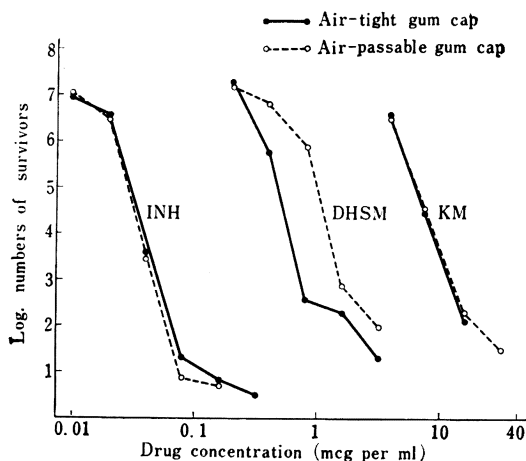
また一般に接種菌量が大きくなるときは、薬剤の最小発育阻止濃度が低下して現わされる^{14),15)}。図1~5に示した生存菌曲線からも明らかなように、培地中の薬剤濃度が増すに従つて菌数は急速に減少していくが、そのまま零になることはなく、ある濃度までくれば菌数の減少曲線はその傾斜が緩やかになり、あるものでは横軸に平行してほぼ同数に近い菌が試験管2~3本にわたり生残し続けている。これは、たとえ薬剤感受性菌の集団でも大量の菌の中には感受性の低い菌が存在していることを意味するものと思われる。この低感受性菌の影響をnegligibleにするためには接種菌量を 10^{-8} mg以下にするか、または大量の菌を接種した場合には、ある薬剤濃度に菌の発育が認められても、その菌数が数十以下の場合はその濃度をもつてend pointとしているMarks¹⁶⁾の薬剤感受性検査の判定基準に準じる必要があると考える。

最後に、菌の薬剤感受性に及ぼす試験管用キャップの影響について付記すれば、図6に示したごとくINHおよびKM含有小川培地での生存菌数には、通気性または閉塞性キャップのいずれを用いてもほとんど差がみられないのに反し、DHSMでは通気性キャップを使用すればその抗菌力は強く現わされるようになり、とくに0.8mcg/mlという発育阻止力を顕著に現わしはじめた濃度では閉塞性キャップ使用時に比べ約3 order以上の菌数の差がみられた。

Halpern¹⁷⁾やRei¹⁸⁾が行なつたほどの積極的な通気でないにしても、薬剤無含有培地での集落初発日数およ

び集落増大の速度は通気性キャップ培地がはるかに勝れていた。増殖期の菌にのみ抗菌作用を示す DHSM¹⁹⁾ が閉塞性キャップ培地で発育している菌に働くよりより強く作用したためであれば INH²⁰⁾ でも同様の現象がみら

Fig. 6. Effect of the Mode of Tube-Sealing on the Sensitivity of $H_{37}R_V$ to Isoniazid, Dihydrostreptomycin and Kanamycin on the Glycerol Egg Medium



れてよいはずである。池田²¹⁾は通気嫌気性菌を好気的および嫌氣的に培養して SM を作用させると、嫌氣的な条件下では SM の発育阻止作用が弱くなると報告しており、結核菌でも DHSM 感受性と培地上の酸素分圧とが全く無関係²²⁾だと断定できないと考える。この現象は小川培地のみでなく、半流動培地でもみられ、またスクリーキャップ培地ではキャップと試験管との密着度の適否によつても差が生じた。新しく考案されたキャップに切り換えるさい、または使用キャップを異にする培地での成績を比較するときは、キャップも成績の動揺の一原因となりうることに注意する必要がある。

結 論

日常の薬剤感受性検査に用いられている培地のうち、使用頻度の多い3種の集落計数可能な培地、すなわち小川培地、キルヒナー寒天培地およびキルヒナー半流動培地について、それらの培地における各種抗結核剤の抗菌力表現の差異を薬剤感受性人型菌 $H_{37}R_V$ 株を試験菌として定量的に比較し、次のような結果を得た。

1) 抗生物質 DHSM, KM および VM の抗菌力は小川培地ではいずれも低下して表現された。小川培地での DHSM の発育阻止力をキルヒナー寒天培地または同半流動培地で現わされた抗菌力とほぼ等しく発揮させるためには、加熱凝固前に4倍量を加えておく必要があった。また VM および KM の場合は、寒天培地での生存

菌数とはほぼ等しい菌数の減少がみられた濃度は VM は4~6倍、KM では16倍を含ませた培地であつた。

2) DHSM はキルヒナー寒天培地と同半流動培地とでは抗菌力の表現にほとんど差がみられなかつたが、KM は半流動培地でやや強く現わされていた。また寒天培地での VM の抗菌力は割合に緩やかな生存曲線として現わされたのに対し、半流動培地での作用は急激な菌減少を示すものであつた。

3) 合成剤 INH および 1314 Th の発育阻止力は寒天培地では低下して現わされ、また 1314 Th は小川培地でも抗菌力の低下がみられた。

4) INH や VM にみるごとく、培地間の阻止力が平行して現われないものもあり、一菌量接種時の最小発育阻止濃度差のみでは、その値が各薬剤濃度に共通の差を示すものとならない場合もあると思われる。

5) 培地中の薬剤濃度を増すにしたがつて生存菌数は急速に減少していく。しかし、ある濃度までくれば菌減少は緩やかになる。したがつて、接種菌量としてはこれらの低感受性菌の影響が negligible となるように稀釈したものを用いる必要がある。

6) 第1級の化学療法剤 INH といえども、発育阻止力を現わし始めた濃度といわゆる感受性菌発育阻止濃度との間には8倍の開きがみられた。したがつて、低感受性菌の影響を negligible にしても接種菌量によつては発育阻止力に8倍以内の変動を生じることが避けがたいと思われる。また 1314 Th のように緩やかな発育阻止力をしか現わしえない“minor”級の薬剤では、その変動域はさらに大きくなると思われる。

7) 半流動培地は抗生物質または合成剤のいずれの場合にでも安定した抗菌力を表現しうる培地と思われる。

8) 培地用キャップの相違も、発育阻止力表現に差異を生じる一原因となりうることに注意する必要があると考えられる。

稿を終るのにのぞみ、御指導御校閲をたまわつた室橋部長、金井室長、小関室長に深謝するとともに、技術的援助をくださった赤松現文部教官に謝意を表する。

文 献

- 1) 早坂聰考: J. Antibiotics, Ser. B, 8: 215, 昭30.
- 2) 津久間俊次・中西通泰・神尾彰・松島留蔵・国枝義治・山下直二郎: 胸部疾患, 2: 522, 昭33.
- 3) 厚生省編集: 衛生検査指針: 1962年改訂案.
- 4) 大川日出夫: 結核, 36: 753, 昭36.
- 5) 河盛勇造・金井次郎・松崎武寿・河野義邦: 第37回日本結核病学会総会, 京都, 昭37.
- 6) 小川政敏: 第37回日本結核病学会総会, 京都, 昭

- 37.
- 7) 中井毅・国立療養所特殊研究班：第37回日本結核病学会総会，京都，昭37.
- 8) 林治・小山憲次郎・根橋敏行・大竹昭：第37回日本結核病学会総会，京都，昭37.
- 9) Morikubo, Y.: J. Antibiotics, Ser. A, 11: 181, 昭33.
- 10) 佐藤直行：臨床病理，4: 283, 昭31.
- 11) 高橋昭三：日本細菌学雑誌，12: 669, 昭32.
- 12) Knox, R.: Lancet, 1881: 110, 1955.
- 13) 堂野前維摩郷：第37回日本結核病学会総会，京都，昭37.
- 14) 内藤益一・津久間俊次 他：胸部疾患，2: 232, 昭33.
- 15) 河田利延：京大結研紀要，7: 13, 昭34.
- 16) Marks, J.: Tubercle, 42: 314, 1961.
- 17) Halpern, B. and Kirchheimer, W.F.: Am. Rev. Tuberc., 70: 665, 1954.
- 18) Rei, T.S.: Japan. J. Microb., 3: 509, 1959.
- 19) Middlebrook, G. and Yegian, D.: Am. Rev. Tuberc., 54: 553, 1946.
- 20) Schaefer, W.B.: Am. Rev. Tuberc., 69: 125, 1954.
- 21) 池田広：日本細菌学雑誌，9: 867, 昭29.
- 22) 内藤益一：北本・藤田編「結核の化学療法」，医学書院版，39, 昭34.

Expressions of the In Vitro Activity of Antituberculous Chemotherapeutics Depending on Different Colony-Countable Media. Report I. Ogawa's Glycerol-Egg Medium Containing 1% KH_2PO_4 , Kirchner Agar Slant, and Kirchner Semi-Solid Agar.

Expressions of the In Vitro Activity of Antituberculous Chemotherapeutics Depending on Different Colony-Countable Media. Report I. Ogawa's Glycerol-Egg Medium Containing 1% KH_2PO_4 , Kirchner Agar Slant, and Kirchner Semi-Solid Agar.

Experimental research work was conducted to examine the medium-dependent variation of the antibacterial activity of known antituberculous agents, and thereby to see the influence of test medium upon their antituberculous activity. In view of the practical significance of this work in association with clinical drug-resistance test, three kinds of colony-countable culture medium were brought under our examination, which have most frequently been used in routine laboratory work in this country.

Materials and Methods: Test drug samples were dihydrostreptomycin sulfate, viomycin sulfate, kanamycin sulfate, isoniazid, ethionamide, and para-aminosalicylic acid (sodium salt). The employed strain of tubercle bacilli was $H_{37}R_v$. Test culture medium was Ogawa's glycerol-egg slant containing KH_2PO_4 in 1%, Kirchner agar slant containing horse serum in 10%, and Kirchner semi-solid agar containing horse serum in 10%. Excepting ethionamide which was dissolved in propylene glycol, other 5 test drugs were dissolved in distilled water. Then, these

six drug solutions were diluted with distilled water to be added to the media in desired concentrations. Serial ten-fold dilutions of the test tubercle bacilli ranging from 1 mg/ml to 10^{-8} mg/ml were prepared and each of those dilutions was inoculated to the media in an amount of 0.1 ml. Reading of growth was conducted at the end of 4 week incubation at 37°C in the cases of Ogawa's glycerol-egg slants and of Kirchner agar slants, but at the end of 3 week in the case of Kirchner semi-solid agar. From the colonial numbers on appropriate media, the numbers of living bacillary cells contained in 1 mg inoculum were calculated.

Result: I) The in vitro activity against tubercle bacilli of antituberculous antibiotics such as dihydrostreptomycin sulfate (DHSM), kanamycin (KM), and viomycin (VM) was expressed in a lower grade on glycerol-egg slants than on Kirchner agar slants, for example, 1/4 concerning DHSM, 1/4 to 1/6 concerning VM, and 1/16 concerning KM. II) The activity of DHSM was expressed in almost the same intensity in Kirchner agar slant and Kirchner semi-solid agar, but that of KM was expressed a little stronger in the latter medium. On the other hand, the antituberculous activity of VM was expressed as a rather gradual survival curve on Kirchner agar slant. III) The activity of the synthetic compounds such as INH and ethionamide was expressed lower in other kinds of medium. Ethionamide was less active on glycerol-egg slants. IV) With the increase of drug concentration in culture medium, the bacillary survivors decreased rapidly.

However, in the concentrations above a certain level specific to each drug, the decreasing rate of the surviving bacilli became much gradual indicating the presence of drug-resistant bacilli of the relatively low grade mixing in the cell population of so-called "sensitive strains". V) Even in the case of INH, there was an interval of 8 times of the drug concentration between the first appearance of growth-inhibitory effect if any and the so-called "complete inhibition". Accordingly, it might be inevitable that there would occur the difference of "M.I.C." to such an extent as 8 times depending upon the size of inoculum. Particularly, this variation will

be liable to occur concerning the drugs whose antibacterial activity is mild and gradual as in the case of ethionamide. VI) Kirchner semi-solid agar medium was proved to make both antibiotics and synthetic compounds express their antituberculous activity in the most stable and unvariable way among the media under the test. VII) In the case of streptomycin, the activity was expressed more intensely when inoculated test tubes were sealed with an air-tight gum cap instead of an air-passable one. However, this observation was not obtained concerning KM and INH.