

抗結核剤の試験管内抗菌力と培地通気性との関係

岡本茂広・金井興美・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 25 日

前報告¹⁾においては、小川培地上に接種された結核菌とそこに含有された抗結核剤との接触時間と薬剤効果との問題をとりあげ、少なくとも殺菌濃度域に関するかぎり、結核菌の場合といえども、これに対する決定的な影響が比較的短時日のうちに決まることを報告し、この時間的關係において培地内の薬剤力価の安定性の意義を考慮すべきであると論じた。

しかし文献²⁾の報ずるところによると、Kirchner 液体培地での深部発育のさいには小川固形培地上の薬剤接触環境と異なり、抗結核剤の殺菌作用が弱い。そしてわれわれ自身もそのような所見を経験しているのでその理由についていろいろな面を考察したが、本報告では試験培地の通気性という点をとくにとりあげて検討した。

実験材料と方法

実験には 2 種類の方法を用いた。一つは実際の意義を重視して小川培地での通気性の影響を検討し、他は数回の予備実験ののち、Kirchner 高層寒天での混積培養を利用して、通気性と抗菌力との関係についてモデル実験を行なった。

A) 小川培地での検討

小川培地での結核菌培養においては、菌接種後 37°C で少なくとも 4 週間放置する必要がある。そしてこの間の培地の乾燥を防ぐため本研究室では 1 週間前後で綿栓をゴム帽にかえているが、この処置によって培地環境の通気性は一応消失すると考えられる。そこで培地の乾燥を防ぎながらしかもある程度の通気性を保つために、このゴム帽の中心に太さ 1 mm 程度の糸を長さ約 3 cm に振って貫通せしめたものを使用し、この処置によって抗結核剤の抗菌力にいかなる変動が現われるかを調べた。小川培地は原液に第一磷酸カリを 1% に含む組成のもので、これにジヒドロストレプトマイシン (SM と略) を 5, 10, 20, 40, 80 mcg/ml の 5 種類の濃度に含有せしめ、それぞれ 24 本ずつつくり、別に薬剤を含まぬ対照培地

を用意した。使用菌株は SM にある程度耐性を獲得したと考えられる人型菌 (SI 株) で凍結乾燥保存菌を使用した。このものを蒸留水で再浮遊し、その 10⁻³ mg を各 SM 濃度培地を 6 本ずつに、10⁻⁴ mg を 8 本ずつに、10⁻⁵ mg を 10 本ずつに接種した。対照培地にかぎり 10⁻⁶ mg をも 14 本に接種した。接種後 1 週間 37°C に放置培養してから、これらの培地を等数の 2 群に分け、一方は普通のゴム帽で綿栓を置換し、他方は糸を通した通気性ゴム帽で置換した。さらに培養を継続して 4 週後にその発育を比較観察した。観察後 10⁻³ mg 接種の各 SM 濃度培地より 1 本ずつを選んで、前報告¹⁾に記載された全培地乳剤稀釈法によつてこの培地 0.5 g/ml 中に含まれる生菌数を測定し、発生集落数のない場合、それが薬剤の静菌作用によるものか殺菌作用によるものかを追加検討した。

B) 高層寒天混積培養法による検討

1) 培地: Kirchner 半流動寒天培地を用いたが、これは Kirchner (Sy-Ser) 液体培地原液に馬血清を 10%、寒天を 0.3% (栄研脱脂寒天)、マラカイトグリーンを 4 mcg/ml に加えたものである。この培地を試験管のかわりに注射針をつけた 20 ml の注射筒に分注し、針の先端をゴム栓に刺して漏出を止め、上端は綿栓のかわりに家庭用アルミニウム箔をもつて包んだ。

2) 菌株: H37 RV 株の凍結乾燥保存菌を、実験に当たつて再浮遊して用いた。

3) 薬剤および被検濃度: INH (0.04, 0.03, 0.02, 0.01 mcg/ml), DHSM (4, 3, 2, 1, 0.5 mcg/ml), PAS-Na (0.1, 0.08, 0.06, 0.04 mcg/ml) の 13 濃度である。

4) 菌と薬剤との接触培養: まず高圧滅菌した培地を孵卵器中に放置し、その温度が 50°C 前後になったところで、馬血清、薬剤をそれぞれ所定の終末濃度になるように加え、さらに菌液を加えて攪拌し、その培地中の生菌数が 9.5×10⁸/ml とするようにした。次に上記の 20

ml の注射筒に 20 ml ずつ分注し、上端にアルミニウム箔を軽く被せて綿栓の代用とした。冷却凝固後 37°C の孵卵器中に直立静置して培養した。

5) 薬剤接触後の生菌数の測定：菌の発育は培地中に層状に発生する集落形成をみて判定できるが、集落形成のない場合もその部位での菌の生死を次の方法で検査し薬剤の殺菌力を観察した。この検査は接触直後と 6 日、14 日後の 3 回にわたって行なつた。培地深部に存在する菌検出のためにはまず注射針先端のゴム栓を除去し、すばやく先端を試験管に入れて培地 1 ml を滴下せしめ、これを採取して被検対象とした。一方、培地上層部の菌は駒込ピペットで注射筒最上部の培地を 1 ml 採取し、これを検査の対象とした。

かくして得られた培地中の生菌数測定のためには、連続 10 倍稀釈液としてそれぞれ小川培地に 0.1 ml ずつ接種するが、そのさいの稀釈用媒液としては初回のみ 0.05% Tween 80 水溶液を使用し、以下は蒸溜水によつた。4 週間 37°C で培養後、発生した集落数より生菌数を算出した。

実験成績

A) 小川培地での検討

培養 4 週時における発育所見を通気性と非通気性とを対比して Table 1 に示した。用いた菌株はすでにある

Table 1. Growth of a Strain of Streptomycin-Resistant Tubercle Bacilli on Ogawa's Medium of Air-Tight, or Air-Passable Condition

Environmental condition of medium	Size of inoculum (mg)	Growth in below-indicated SM concentrations (mcg/ml)					
		0	5	10	20	40	80
Air-tight	10 ⁻³	###*	##	##	+	0	0
	10 ⁻⁴	++	++	++	92.2	0	0
	10 ⁻⁵	57.4*	50.4	4.4	0	0	0
	10 ⁻⁶	5.7	—	—	—	—	—
Air-passable	10 ⁻³	##	##	++	0	0	0
	10 ⁻⁴	++	++	33.7	0	0	0
	10 ⁻⁵	57	5.8	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	5.7	—	—	—	—	—

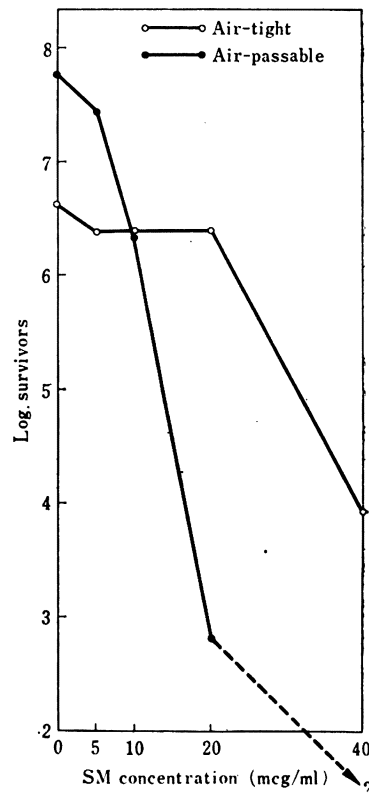
Note: * Diffuse growth was expressed arbitrarily by graded symbols # and ##, and solitary colonial growth was expressed by mean colonial numbers. Reading of growth was made at the end of 4 week incubation at 37°C.

程度 SM に耐性を獲得しているものであつたが、その耐性表現が通気環境によつて同一でないことがわかる。すなわち通気性ゴム帽を使用のさいは SM 20 mcg/ml で全く発育集落がなかつたが、非通気性の場合はこの濃度で発育が観察された。発育の程度差は 10, 5 mcg/ml でも同様に見出だされた。

ここで注目すべきは SM を含まぬ対照培地上においては発生集落数がこの両環境において全く同一であつたにもかかわらず、集落の大きさにおいては通気性培地上のものが常にまさつていた点である。

以上の所見を総括して考えれば、通気性の保持された発育に適した培地環境において SM の結核菌に対する影響力が大であるといえるし、また通気性が悪く結核菌の分裂増殖のおそい環境においては SM 耐性菌の形質発現がむしろ発揮されやすいともいえるであろう。10⁻³ mg 接種培地上の発育を 4 週時に全培地とともに乳剤として

Fig. 1. Viability Examination of the Cultures of 4 Weeks Inoculated with 10⁻³ mg as Seen in Table 1



生菌数をしらべた成績が Fig. 1 であるが、この成績より再び Table 1 を考察すれば、非通気性 40 mcg/ml の場合発生集落がなかつたのは接種された菌が殺菌されたのではなく、静菌作用を受けて分裂停止して生残していたためであることがわかり、また同様のことが通気性 20 mcg/ml についてもいえる。すなわち小川培地上において、SM の殺菌濃度域以下のところに静菌濃度域のあることが、このような耐性菌についても表現され、前報告¹⁾にみられた SM 感受性菌の場合と同一である。いずれにせよ SM の抗菌力は通気性培地環境でよりよく表

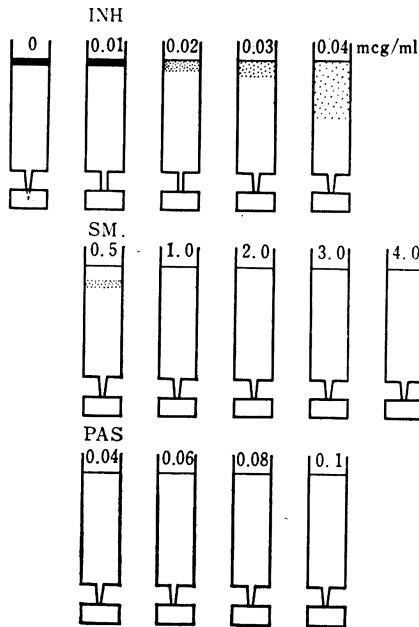
現されることが証明された。

B) 高層寒天混積培養法による検出

Fig. 3, 4, 5に6日および14日における生残菌数の消長を, INH, SM, PAS について個別的に示した。破線は表層での消長を示し, 実線は下層での消長を示しているが, 前者は一応通気環境, 後者は非通気性の乏しい環境とみなしたのである。

はじめに対照についてみれば, Fig. 2 に示したよう

Fig. 2 Growth-Inhibitory Effect of Anti-tuberculous Agents in Kirchner's Agar-Bacilli Mixture



Note: Observation of growth was made at the end of 14 day incubation at 37°C. Size of inoculum was 9.5×10^8 viable units per ml of medium.

に発育は表層直下に層状をなした多数の集落として観察されたが, それ以下は底部にかけて全く集落の発生をみなかった。

Fig. 3, 4, 5に共通な対照 (Drug-free) の菌数消長曲線より考えれば, 表層と底部の違いは接種6日以後の過程にあることが分かり, 底部においては6日より14日にかけて生菌数は1/10に減じている。他方, 表層においては100倍以上に菌数増加があつた。

INH についてみると, Fig. 2 に示されているように0.02 mcg/ml で発生集落数はかなり減じ寒天内の集落層は疎となり, またその幅は逆に増して0.04 mcg/ml では集落発生層はかなり底部近くに及んでいる。この所見は実験 A) でみられたような, 非通気性環境において耐性が発現しやすいという事実と共通である。しかしさらに興味があるのは Fig. 3 で示されている表層部と底部

Fig. 3. Antibacterial Activity of Low Concentrations of INH against Tubercle Bacilli Mixture into Deep Layer of Kirchner's Semi-Solid Agar

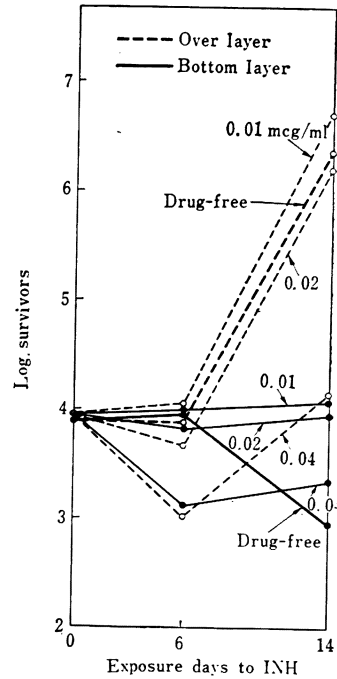


Fig. 4. Antibacterial Activity of Low Concentrations of SM against Tubercle Bacilli Mixture into Deep Layer of Kirchner's Semi-Solid Agar

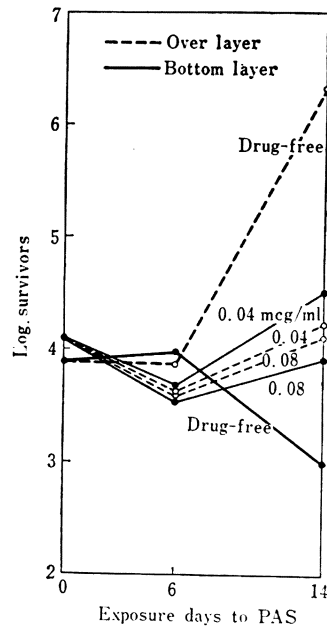
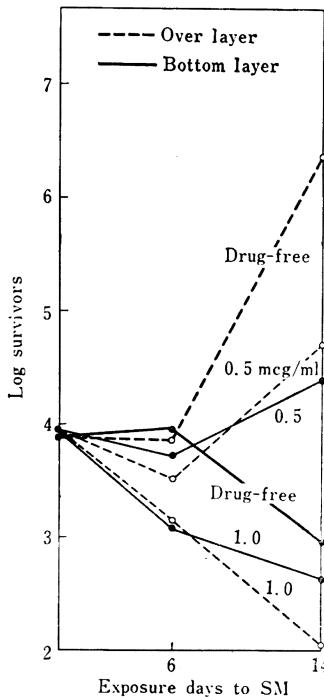


Fig. 5. Antibacterial Activity of Low Concentrations of PAS against Tubercle Bacilli Mixed into Deep Layer Kirchner's Semi-Solid of Agar



における生菌数の消長であつて、ことに底部において、0.01, 0.02 mcg/ml の INH の存在により、対照培地におけるような菌数減少が阻止されている事実である。表層菌の増殖に対して 0.04 mcg/ml はきわめて顕著な増殖阻止を示しているが、この抗菌力は通気性の悪い底部に接種された菌に対してはあまり効果がない。すなわち INH の抗結核菌力も通気性培地環境においてよく発揮されるものと考えらるべきであろう。

SM について Fig. 2 をみると、発育阻止濃度限界点とみられる 0.5 mcg/ml において、菌は表面より深さ 10 mm の層において幅 5 mm の発育集落層を形成した。ここでも通気性の乏しい環境において耐性が発現されやすい例となつている。1 mcg/ml 以上においては肉眼的発育はなかつたが、Fig. 4 の示すところによると 1 mcg/ml は表層菌（この場合は集落層の上部になる）に対して著明な殺菌力を発揮しており、14日目においては接種生菌数の 1/100 にもなつている。ところがこの強い殺菌作用も底層菌に対してはあまり顕著でなく、14日目においては対照と生菌数に関する差異はわずかであつた。静菌濃度とみられる 0.5 mcg/ml についてはこの濃度の SM によつて底部接種菌の必然的な生菌減少が完全に阻止された結果をまねている。不利な環境においては分裂増殖が菌の究極的な死を来すとすれば、静菌濃

度域の薬剤に接して菌はかえつて生残する機会を得たのではなからうか。また前報告⁷⁾で証明されたように PAS は本質的に静菌的な薬剤であるので、Fig. 5 はもつともよく上述の所見を再現し、またその説明のしかたを支持しているように思われる。

すなわち INH, SM, PAS のいずれに関しても、抗結核菌力は通気性の保持された環境で菌の分裂しうる培地で著明に発揮されることが証明された。

考 察

結核菌の分裂増殖のためには通気性とある一定の酸素分圧が必要であり、この報告の実験 B) で用いられたような Kirchner 半流動寒天においては集落形成は表面よりごくわずか下のところから始まるのが一般である。またこの報告の予備の実験において、酸素分圧を高めたデシケター中で混釈培養を行なつたところ、集落形成層は寒天深部層に移行した。この所見も結核菌の発育に至適酸素分圧の存在することを示唆している。

ところで抗結核剤の抗菌力が通気性のよい環境でよりよく発揮されるという本報告の観察は、その環境において菌の分裂速度、代謝回転が早いため薬剤の働く機会が多いし、また作用が強いという普遍的現象に基づくものか、あるいは通気性の乏しい環境での菌の代謝形式がこれら抗結核剤の作用に鈍であるという質的条件によるものか疑問のあるところである。もちろんそれはこの報告の所見のみでは決めがたい点であるが、問題は単に薬剤感受性試験、耐性検査に関係しているばかりでなく、臨床的に病巣あるいは菌の所在環境という点にもつながっている。少なくとも結核化学療法においては、菌・薬剤・宿主という三者の相互関係が治療効果を決定するであろうという一つの有力な示唆となつている。

次に本報告において強調したい点は、殺菌濃度域以下のところに静菌濃度というものが SM, INH に関して存在し、また殺菌力も静菌力とともに通気性のよい環境でよく表現されることである。

また通気性の乏しいところに接種された菌数が培養中減少するのは、いわゆる“grow to death”であつて、不自然な環境で菌が本来の代謝形式のまま分裂するためであると考えられる。なぜならば静菌濃度域の SM, INH, PAS によつてその生菌数減少が阻止されるからである。

さて最後に問題としたいのは、それでは一体薬剤感受性試験においてあるいは耐性検査において、小川培地の乾燥防止のための手段をとる場合、密閉するのと通気性にするのといずれが正しいかという点である。本報告の実験 A) におけるように、密閉といつてもそれは接種の 1 週後から始まつたわけであつて、もしそれ以前からこの処理をとるならば、成績は通気性の場合からさらにへ

だたるであろう。しかし現在いずれかを正しいとする理論的根拠もあまりないようである。要は成績評価の統一性のためにいずれか一方に決めるのが望ましいということであろう。

したがって高層寒天での混積培養による耐性検査³⁾ということも、本報告に述べたような論理を一応考慮すべきであろう。ただ岡本⁴⁾、古泉⁵⁾が試みたような患者血中のINH濃度の測定に、高層寒天に血清および血漿を重層するという方法はきわめて興味もあり、かつ臨床的価値の高いもののように思われる。

総 括

小川培地斜面およびKirchner高層寒天混積培養法を

用いて、培地の通気性とSM, INH, PASの抗菌力との関係を検討した。その結果静菌力、殺菌力ともに、通気性環境においてより効果的に発揮されることが証明された。

文 献

- 1) 金井興美・岡本茂広・室橋豊穂：結核，38，512，昭38.
- 2) 上野高正：日本細菌学雑誌，9：499，昭29.
- 3) 岡本亨吉：結核，38，No. 3：78，昭38.
- 4) 岡本亨吉・宇都宮利善・古泉桂四郎：結核，35：543，昭35.
- 5) 古泉桂四郎・岡本亨吉：結核，37：18，昭37.

In Vitro Activity of Antituberculous Agents in Relation to Ventilation in Culture Medium.

In the previous paper¹⁾, it was reported that tubercle bacilli inoculated onto the surface of Ogawa's glycerol egg medium were highly sensitive to the bactericidal activity of streptomycin and isoniazid contained therein. According to some report²⁾, however, such strong bactericidal activity is not exhibited against tubercle bacilli of submerged growth in Kirchner's liquid medium, where culture conditions are so different from those on Ogawa's glycerol egg slant. The present authors presumed that one of the factors responsible for such difference might be "ventilation" in test medium. And, this problem was examined using Ogawa glycerol egg slants of air-tight or air-passable conditions, and also using Kirchner's semi-solid agar mixed with the bacilli.

In our laboratory, the cotton plug of Ogawa's slants inoculated with tubercle bacilli is usually replaced with a gum-cap in a week or so of incubation to prevent them from drying. This treatment does not allow the air ventilation on the surface of medium any more. However, as a device to prevent the medium from drying but to allow air-passage to some extent, a double-winded thread of 1mm×30mm was passed through the center of gum-cap. Then, a streptomycin-sensitivity test was made of a strain of streptomycin-resistant

tubercle bacilli comparing the growth between the case of air-tight slants and the case of air-passable slants. The results are shown in Table 1 and Fig. 1, where stronger bactericidal and bacteriostatic activities are expressed in the air-passable condition than in the air-tight condition.

In the Kirchner's agar-bacilli mixture, both the bactericidal and bacteriostatic activities of SM, INH and PAS were much stronger in the overlayer of the agar than in the bottom layer in which air ventilation was poor and oxygen tension was low. In the control case without antituberculous agents, numerous small colonies formed a turbid layer near the surface of the medium, but this colonial layer became sparse, increased in breadth, and moved deeper into the medium when the threshold concentrations of INH and SM were added. This finding also shows that the drug sensitivity of tubercle bacilli is lower in the poorly-ventilated area of the medium. In Ogawa's glycerol egg slants, colonial formations in both conditions were the same in numbers, but colonial size was larger in the air-passable tube indicating the rapid multiplication of tubercle bacilli. Therefore, it will be concluded that the activity of those antituberculous agents is stronger in the environment where air-ventilation is adequate for the bacilli and their multiplication is more rapid.