

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2報 馬血清または市販アルブミン添加キルヒナー 半流動培地における抗菌力変動

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 15 日

前報告¹⁾において、種々の抗結核剤の抗菌力が、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で、どのように表現されるかを、H₃₇Rv 株を試験菌としてその生存曲線により比較検討した。そのとき使用した両キルヒナー培地への添加血液成分は、いずれも馬血清であつた。高橋²⁾は彼の Tween 80 加アルブミン寒天培地を使用するにあたり、アルブミンの入手が容易でないため、これに代わるべき血清アルブミンの自家精製法を考案しているが、アルブミンが市販されている今日では、むしろ血清の入手に困難さを感じている。また寒天を含む培地で核結菌を培養するためには、寒天中の脂肪酸の核結菌発育阻害作用を中和するために、中和剤を添加するか^{3)~8)}、または脱脂肪酸寒天を使用することが必要である⁹⁾。しかもこの中和剤は培地中に含ませた抗結核剤を吸着もしくは不活性化しないものでなければならない^{10)~14)}。そこで、培地に添加される血清を市販アルブミンで置き換えられれば、抗結核剤の in vitro test にあたり、材料入手の困難さがある程度解消され、より使いやすい培地となるであろう。

本報告では合成剤および抗生物質のいずれの化学療法剤においても、もつとも安定した抗結核菌力を表現した¹⁾キルヒナー半流動培地について、馬血清添加時と、市販アルブミン添加時における dihydrostreptomycin, viomycin, kanamycin, isoniazid および ethionamide の5種の抗結核剤の抗菌力を、試験菌の生存曲線により比較した。

実験材料および方法

供試培地

1) 10%馬血清加キルヒナー半流動寒天培地 (以下血清加培地と略)

2) 10%アルブミン“栄研加”キルヒナー半流動寒天培地 (アルブミン加培地と略)

3) 10%アルブミン“栄研”およびクエン酸鉄アンモニウム加キルヒナー半流動寒天培地 (アルブミン・Fe 加培地と略)

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).

供試菌株: 感性人型結核菌 H₃₇Rv 株。

薬剤の溶解および薬剤含有培地の作製法、菌接種、判定等は前報告¹⁾のキルヒナー半流動培地に関する項に準ずる。

なお、アルブミン・Fe 加培地はキルヒナー基礎培地に、クエン酸鉄アンモニウムを 50 mg/l の割合に加えたものである。

実験成績および考察

血清加培地およびアルブミン加培地のほかに、アルブミン・Fe 加培地を置いたのは、次のような実験結果による。

すなわち、5種の薬剤に対しておのおの耐性を獲得している研究室保存 H₃₇Rv 株について1%小川培地、馬血清加キルヒナー半流動培地およびアルブミン“栄研”加キルヒナー半流動培地における発育状態をしらべたところ、H₃₇Rv R-INH 株は、アルブミン“栄研”加キルヒナー半流動培地ではその発育が非常に抑制されていた。

しかし、この培地にクエン酸鉄アンモニウムを 50 mg/l あて加えておくと、馬血清加培地に匹敵する発育をみることができた(表 1)。INH 耐性菌が種々の栄養素を要求することはよく知られているが^{15)~22)}、新しい抗結核剤の in vitro test での試験株として INH 耐性株を使用する頻度も非常に多い。そこで、その場合を考慮してこの保存株が要求する Fe を含ませた培地も、抗菌力を比較する培地に加えた。

Table 1. Comparison of Various Media for the Growth of Drug-Resistant Tubercle Bacilli

Strain	Glycerol egg (Ogawa's) medium	Kirchner's semi-solid agar media added with		
		Horse serum	Albumin "Eiken"	Albumin "Eiken" plus Fe. Amm. Citr.*
H ₃₇ Rv R-INH	47.8	83	+/10 ³ **	62.4
H ₃₇ Rv R-PAS	4.3	12.3	9.7	7.7
H ₃₇ Rv R-SM	14.8	19.8	18.4	13.2
H ₃₇ Rv R-VM	11.6	15.6	15.6	15.2
H ₃₇ Rv R-KM	16.5	18.4	9.7	7.7

Note: Colony number was indicated as the average number of 3-5 tubes inoculated with 10⁻⁶ mg each, except** with 10⁻³ mg.

* Ferric ammonium citrate: 50 mg/l of medium.

さて、血清加培地、アルブミン加培地およびアルブミン・Fe 加培地における前記 5 種類薬剤の抗菌力を、その個々について述べると次のごとくである。

1) DHSM

Fig. 1. Comparison of the In Vitro Activity of Dihydrostreptomycin against H₃₇Rv in the Kirchner's Semi-Solid Agar Media Added with Horse Serum, Serum albumin "Eiken" or Serum Albumin "Eiken" plus Ferric Ammonium Citrate

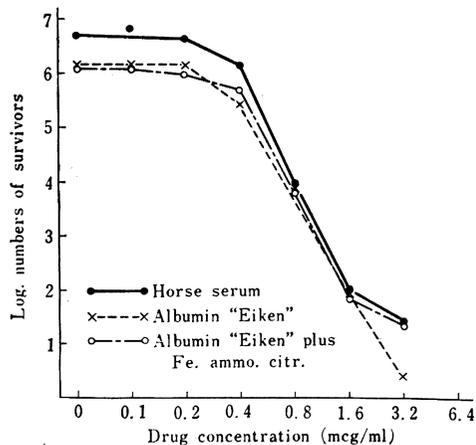


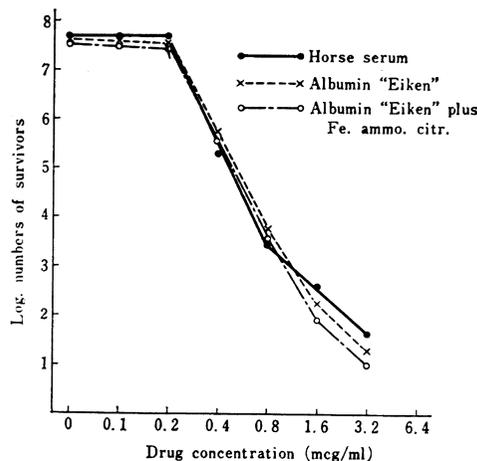
図 1 に供試 3 培地における DHSM の抗結核菌力を示した。すなわち、試験菌 H₃₇Rv 株の生存曲線で表わして比較した。

供試 3 培地での生存曲線はほとんど重なり、DHSM の抗菌力には添加血液成分による影響が認められなかった。

2) VM

図 2 に示したごとく、菌数の減少を現わしはじめた

Fig. 2. Comparison of the In Vitro Activity of Kanamycin against H₃₇Rv in the Kirchner's Semi-Solid Agar Media Added with Horse Serum, Serum albumin "Eiken", or Serum Albumin "Eiken" plus Ferric Ammonium Citrate



1 mcg/ml で、血清加培地とアルブミン・Fe 加培地との間には 1 order 以上の開きがみられたが、VM の濃度を増すに従ってその差は小さくなり、4 mcg/ml ではほとんど差がみられなくなった。またアルブミン加培地での生存曲線は、前 2 培地でのそのほぼ中間を通り、著明な差はみられなかった。

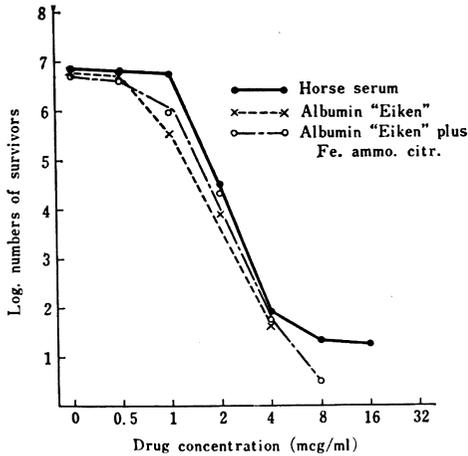
3) KM

KM の抗結核菌力も、図 3 に示したごとく供試 3 培地ではほとんど等しく表現され、培地間の差は認められなかった。

この実験に用いた薬剤中、抗生物質は DHSM, VM および KM の 3 種のみであるが、抗生物質に関するかぎりは、半流動培地に添加する血清の代りに市販アルブミンを代用しても、その抗結核菌力の表現に影響を及ぼさないものと推察される。

また、対照培地における菌 1 mg あたりの生菌単位数にも、3 培地間にはほとんど差がなかったが、集落初発日数は血清加培地、アルブミン加培地、アルブミン・Fe

Fig. 3. Comparison of the In Vitro Activity of Viomycin against $H_{37}Rv$ in the Kirchner's Semi-Solid Agar Media Added with Horse Serum, Serum Albumin "Eiken", or Serum Albumin "Eiken" plus Ferric Ammonium Citrate

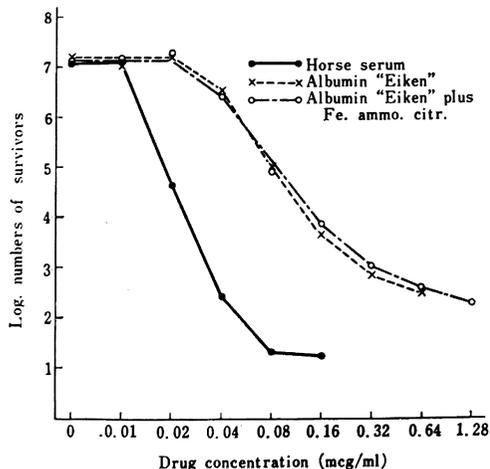


加培地の順に早く、集落の大きさも血清加培地でもつとも大きく形成され、他の2培地での colony count はやや困難であった。

4) INH

血清加培地、アルブミン加培地およびアルブミン・Fe加培地での $H_{37}Rv$ 株に対する INH の抗菌力を、得ら

Fig. 4. Comparison of the In Vitro Activity of Isoniazid against $H_{37}Rv$ in the Kirchner's Semi-Solid Agar Media Added with Horse Serum, Serum Albumin "Eiken", or Serum Albumin "Eiken" plus Ferric Ammonium Citrate



れた菌 1 mg 中の生存菌数により生存曲線を描き比較したものが図4である。

INH の抗菌力は、アルブミン培地およびアルブミン・Fe 加培地では著しく減弱して現わされた。すなわち薬剤無含有対照地で約 $10^7/mg$ の生菌単位数を示した菌集団中、INH を $0.02 mcg/ml$ に含む培地に生存していた菌は、血清加培地では 4×10^4 (約 0.32%) に減少し、 $0.04 mcg/ml$ でのそれは 25×10 (約 0.002%) を残すにすぎなかつた。しかしアルブミン加培地およびアルブミン・Fe 加培地での INH は、 $0.002 mcg/ml$ では、まだ菌増殖阻止作用をみせず、 $0.08 mcg/ml$ でアルブミン培地 9.3×10^4 (0.58%)、アルブミン・Fe 加培地 7.7×10^4 (0.52%) と減少しはじめ、 $0.16 mcg/ml$ でもおのおの 4.3×10^3 (0.02%)、 7.7×10^3 (0.052%) の生存菌が認められた。

INH の抗菌力の減弱は、ともに馬血清を添加したキルヒナー寒天培地とキルヒナー半流動培地との間でも認められたが¹⁾、この実験に関しては含有寒天量は3培地とも等しく 0.1% であり、したがって同じ作用環境での INH と菌との接触によつても、基礎培地への添加物の相違によりその抗菌力に差が生じることが示唆される。

このことから次の2つのことが考えられる。すなわち、基礎培地に添加されたアルブミンまたはクエン酸鉄アンモニウムのために INH 自身の抗菌活性が減弱されたということと、INH に対する結核菌の薬剤感受性が、これらの添加物によつて変化を受けたということである。

INH の培地中での抗菌活性の減弱に関しては Pansy²³⁾ らは Dubos and Middlebrook の Tween-serum albumin 培地³⁵⁾に INH を加え、 $37^\circ C$ に incubate したところ INH が不活性化されることを知り、これに及ぼす培地組成の影響を検討した結果、この INH 抗菌力の低下はクエン酸鉄アンモニウムと磷酸緩衝液との組合せにより起こることをみたが、これはアルカリ性緩衝液中でのみであつたと述べている。また Lewin²⁴⁾ らも Fe^{++} , Fe^{+++} の存在下では中性緩衝液中でも INH はその抗菌力を減じることを認めている。しかし 10% 血清加キルヒナー培地と Dubos-Albumin 培地 (Difco) での INH の分解を比較した勝沼²⁵⁾によれば、この両培地間にはほとんど差がみられなかつたと報告している。

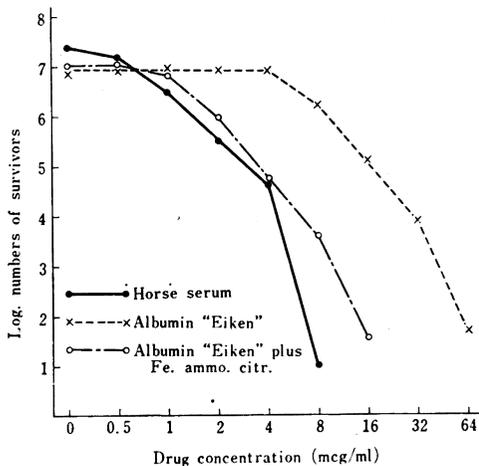
著者の実験において、血清加培地に比しアルブミン・Fe 加培地で INH の結核菌増殖阻止力に減弱がみられたことを、添加されたクエン酸鉄アンモニウムによる INH 不活性化によるものだとすれば、Fe が添加されていないアルブミン培地での同様な抗菌力の減弱が解しえない。また INH の分解に差がない血清加培地と Dubos-Albumin 培地において²⁵⁾は、一般に Dubos-Albumin 培地で抗菌力が増強して示され、Dubos 培地ではキルヒナー

一培地の約2~4倍強い発育阻止力がみられており²⁶⁾²⁷⁾, これは Dubos 培地に含まれている界面活性剤により, 薬剤が菌に浸潤しやすくなったためであろう²⁸⁾²⁹⁾とされている。アルブミン加培地またはアルブミン・Fe 加培地に比し血清加培地で INH の抗菌力が強く表現されたのも, 血清は薬剤に対する菌の感受性を高める働きをも有するのか, または増殖菌にのみしか働かない INH³⁰⁾が, 菌の発育がもつとも良好であつた血清加培地でより強く作用したためかは明らかではないが, DHSM, VM または KM のように血清加培地またはアルブミン加培地でその抗菌力に差がみられない場合もあり, これらの機序については今後の検討にまたなければならぬ。

5) 1314 Th

供試3培地での1314 Th の抗結核菌力表現の差異は図5のごとくであつた。

Fig. 5. Comparison of the In Vitro Activity of Ethionamide Against $H_{37}Rv$ in the Kirchner's Semi-Solid Agar Media Added with Horse Serum, Surem Albumin "Eiken", or Serum Albumin "Eiken" plus Ferric Ammonium Citrate



この生存曲線から明らかなように, 1314 Th もアルブミン加培地でその抗菌力が減弱されている。すなわち, 薬剤無含有対照培地で, 血清加培地に $27.7 \times 10^6/mg$, アルブミン加培地に $7 \times 10^6/mg$ の生菌単位数が数えられた菌が, 1314 Th $4mcg/ml$ 含有血清加培地では 4.7×10^4 (約0.17%) と減少していたが, アルブミン加培地ではまだまだ菌発育阻止作用がみられていない。また $8mcg/ml$ では血清加培地で約10 (約0.000036%) の生存菌を数えるのみであつたのに対し, アルブミン加培地ではまだ 10^6 (約25%) の菌数が認められた。しかしアルブミン加培地にクエン酸鉄アンモニウムを $50mg/l$ 添加

した培地中での抗菌力は血清培地中でのそれと匹敵する発育阻止力を示すようになり, このアルブミン・Fe 加培地と血清加培地との生存菌数には $1 \sim 4mcg/ml$ の間で1 order の差のみみられなくなつた。

血清加培地に比しアルブミン加培地で薬剤の抗菌力が減弱して現わされるという現象は INH でもみられたが, INH の場合はアルブミン・Fe 加培地でも Fe を含まない培地と同様にその抗菌力が減弱されていた。これに反して 1314 Th はアルブミン加培地ではその抗菌力が低下して示されるが, これにクエン酸鉄アンモニウムが添加されるとその培地中での抗菌力は血清加培地でのそれに近く増強して現わされるようになった。

血清加 Youmans 培地と Tween-Albmin 培地での 1314 Th 抗菌力についてみると, Rist³¹⁾ は血清加 Youmans 培地で, Steenken³²⁾ らは Tween-Albmin 培地で強い抗菌値を得ているが, 1314 Th の抗菌力の低下は合成培地に Tween 80 を加えただけでもみられており³³⁾, これらの培地組成を異にする血清またはアルブミン加培地間での抗菌力の比較と, 培地組成は同じで, ただ添加血液成分のみを異にする培地を使用しての著者の成績とを同一には論じられないであろう。ただ遠藤ら³⁴⁾ は 10% Albmin 加キルヒナー液体培地に $H_{37}Rv$ 株を $10^{-2}mg$ 接種したときの 1314 Th の最小発育阻止濃度は $5mcg/ml$ であつたと報告しており, 著者の 10% アルブミン加キルヒナー半流動培地での成績と大きな開きがあるが, その原因については明らかではない。

結 論

キルヒナー半流動培地を基本培地として, これに添加される血液成分が抗結核剤の抗菌力に及ぼす影響を DHSM, VM, KM, INH および 1314 Th の5種の薬剤について試験菌の生存曲線の面から比較した。その結果,

1) DHSM, VM および KM のような抗生物質に関しては, キルヒナー半流動培地に添加される馬血清を市販アルブミンで置きかえても, そこで現わされる抗菌力は馬血清加培地におけるほとんど差がみられなかつた。

2) 合成剤である INH および 1314 Th はアルブミン加キルヒナー半流動培地では, 馬血清添加培地に比し抗菌力が減弱して示された。しかし 1314 Th ではアルブミン加キルヒナー半流動培地にクエン酸鉄アンモニウムを補えば馬血清加培地での抗菌力にはほぼ匹敵する程度にまで抗菌力が増強して現わされた。

3) 馬血清培地は, すべての薬剤の抗菌力をもつとも安定して示し, 菌の発育ももつとも良好であつた。

4) キルヒナー半流動培地に添加する血液成分として市販アルブミンを代用することに対しては, 必ずしも満足する結果は得られず, とくにこの培地が勝れた抗菌力検査用培地とは認めがたかつた。

稿を終わるにのぞみ、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、技術的援助をいただいた赤松現文教官に謝意を表する。

文 献

- 1) 賀来隆二：本誌投稿中。
- 2) 高橋昭三：結核の臨床，3：550，昭30。
- 3) Dubos, R. J., and Davis, B. D.: *J. Exp. Med.*, 83: 409, 1946.
- 4) Dubos, R. J., and Middlebrook, G.: *Am. Rev. Tuberc.*, 56: 334, 1947.
- 5) Dubos, R. J.: *Exp. Med.*, 85: 9, 1957.
- 6) Davis, B. D., and Dubos, R. J.: *ibid.*, 86: 215, 1957.
- 7) Hirsch, J. G.: *Am. Rev. Tuberc.*, 70: 955, 1954.
- 8) Hirsch, J. G.: *ibid.*, 70: 977, 1954.
- 9) 橋本達一郎：医学と生物学，40：14，昭31。
- 10) Lewin, E., and Hirsch, J. G.: *Am. Rev. Tuberc.*, 71: 447, 1955.
- 11) 岡捨己 他：文部省化学研究費，結核研究班，細菌学の研究科会，昭30。
- 12) 岡捨己・庄司真・佐藤正弘・菅原庸雄・北島栄一：日本医事新報，16535：3，昭30。
- 13) 松村晴正：広島医学，6：1，昭33。
- 14) 小川辰次・大谷典子：結核，36：32，昭36。
- 15) Karlson, A. G., and Ikemi, Y.: *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 27: 239, 1952.
- 16) Barry, V. C., Conalty, M. L., and Caffney, E. E.: *Lancet*, 1: 979, 1953.
- 17) Barry, V. C., Conalty, M. L., Gaffney, E. E., and Winder, F.: *ibid.*, 2: 253, 1953.
- 18) Fischer, M. W.: *Am. Rev. Tuberc.*, 66: 626, 1952.
- 19) Fischer, M. W.: *ibid.*, 69: 797, 1954.
- 20) Cohn, M. L., Oda, U., Kovitz, C., and Middlebrook, G.: *Am. Rev. Tuberc.*, 70: 465, 1954.
- 21) Cohn, M. L., Kovitz, C., Oda, U., and Middlebrook, G.: *ibid.*, 70: 641, 1954.
- 22) Barry, V. C., Conalty, M. L., Denny, J. M., Gaffney, E. E., and Winder, F.: *ibid.*, 71: 785, 1955.
- 23) Pansy, F. E., Koerber, W. L., Stander, H., and Donovick, R.: *ibid.*, 68: 284, 1953.
- 24) Lewin, E., and Hirsch, J. G.: *Am. Rev. Tuberc.*, 71: 732, 1955.
- 25) 勝沼六郎：結核研究の進歩，1：51，昭28。
- 26) 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。
- 27) 早坂聰考：*J. Antibiotics, Ser. B.*, 8: 215, 昭30。
- 28) Williston, E. H., and Youmans, G. P.: *Am. Rev. Tuberc.*, 59: 336, 1949.
- 29) 津久間俊次：京大結核紀要，4：165，昭31。
- 30) Schaefer, W. B.: *Am. Rev. Tuberc.*, 69: 125, 1954.
- 31) Rist, N.: *Bull. Internat. Union against Tuberculosis.*, 28: 208, 1958.
- 32) Steenken, W. Jr., and Montalbino, V.: *Am. Rev. Resp. Disease*, 81: 761, 1960.
- 33) Knight, R. A., Dufour, A. P., and Selin, M. J.: *Transactions 20th Conf. on the Chemotherapy of Tuberculosis, V. A. A. F.*, 154, 1961.
- 34) 遠藤次夫・日比準一・杉山正暉：*Chemotherapy*, 10: 101, 昭37。
- 35) Dubos, R. Jr., and Middlebrook, G.: *Am. Rev. Tuberc.* 56: 334, 1947.

Expressions of the In Vitro Activity of Antituberculous Chemotherapeutics Depending on Different Colony-Countable Media. Report II. Variation of Drug Activity in Kirchner Semi-Solid Agar Medium Added with Horse Serum Commercially Available Albumin.

Using Kirchner semi-solid agar as a basal medium, the effect of adding blood components upon the in vitro antituberculous activity of dihydrostreptomycin, viomycin, kanamycin, isoniazid, and ethionamide was examined, particularly by the quantitative analysis of survival curves of $H_{37}Rv$ organisms.

Materials and Methods: I) Test medium; a) Kirchner semi-solid agar medium added with horse serum in 10%, b) Kirchner semi-solid agar medium added with albumin "Eiken" in 10%, c) Kirchner semi-solid agar medium added with albumin "Eiken" and ferric ammonium citrate. II) Test drugs; a) dihydrostreptomycin sulfate (DHSM), b) viomycin (VM), c) kanamycin sulfate (KM), d) isoniazid, e) ethionamide. III) Test organisms; $H_{37}Rv$ tubercle bacilli. Dissolving of drug samples, inoculation of test bacilli, and reading of drug activity were done in the same way as that described in the

previous report¹⁾. When ferric ammonium citrate was used, it was added to the basal medium in the concentration of 50 mg/l. This consideration came from our observation that if it was not added isoniazid-resistant tubercle bacilli were extremely poor in growth in Kirchner liquid medium added with albumin, and that this might be an obstacle to drug-sensitivity test in clinical laboratory.

Results: I) Concerning DHSM, VM, and KM, there was no significant variation in the expression of their antibacterial activity depending upon the kind of added protein factors to the basal medium, namely, horse serum or albumin solution. II) The activity of INH and ethionamide was expressed in

a lower way in the medium with albumin than in those with horse serum. This decreased activity of ethionamide in the media with albumin was restored by added ferric ammonium citrate to almost the same grade as that in the media with horse serum. Regarding INH, however, this phenomenon was not observed. III) In the media added with horse serum, the activity of all the test drugs was expressed more regularly, and the bacillary growth was more abundant. IV) The medium added with albumin instead of horse serum was not proved satisfactory as the medium for drug-sensitivity test of tubercle bacilli.