INH 耐性培地の力価測定法に関する検討

金沢　裕・倉又利夫

新潟鉄道病院

受付　昭和39年1月22日

STUDIES ON THE ASSAY METHOD OF ISONIAZID POTENCY IN THE SENSITIVITY TEST MEDIUM

Yutaka KANAZAWA and Toshio KURAMATA*

(Received for publication January 22, 1964)

Microbiologically active isoniazid (INH) concentration in the sensitivity test medium was assayed to the lower limit of 0.08 μg/ml, by the thin-agar cylinder-plate method using INH highly sensitive rapid grower i.e., Mycobacterium H-7 as a test organism.

INH potency in the sensitivity test medium during storage or incubation was investigated as follows:

1) In the solid egg medium (Ogawa's 1% KH_2PO_4), no remarkable decrease of INH activity was observed under the conditions of heating at 90°C for 60 minutes or storage at 4°C for 3 months. Whereas, deterioration of INH potency was observed after storage at 4°C for more than 3 months and within 2 months incubation at 37°C.

2) In Dubos' liquid medium, all of INH and its derivatives i.e., IHMS, INHG, IP, which proved to be microbiologically active, decreased in their potencies and were inactivated within 2 weeks incubation at 37°C.

* From Niigata Railway Hospital, 104—3, Ryusakuba, Niigata, Japan.

結核耐性培地の力価測定法としては，ストレプトマイシン，カナマイシンについては，当然抗生物質の製剤基準[1]に示されているカップ法[2)3)]に準じて検定が可能であり，これらの耐性培地の検定法についての猪野[4]，岩田ら[5]の報告もある。

一方 INH 耐性培地の力価は従来は，耐性の判明した人型結核菌を接種し，その耐性度で間接的に推定する方法（小川ら）[6]，または人型結核菌を検定菌とする直立拡散法（工藤）[7]で測定する方法が報告されている。しかしいずれも判定までに2～3週を要し，その期間中における力価の変動による誤差をさけることはできないわけである。

私ども[8)9)]は，さきにあらたに分離した INH 高度感受性の rapid grower Mycobacterium H-7 株を検定菌とし，0.1 $\mu g/ml$ 以上を2日以内に測定しうる薄層寒天平板法による血清中 INH 濃度測定法[10]を確立した。今回は本法の応用としての INH 耐性培地の力価測定法について実験したので報告する。

実験方法

サンプルの調製：Table 1 に示すように，被検および原培地を粉砕均等化して，被検培地の抽出液および同一条件の標準サンプルを調製する。

検定菌液調製：Tween 80 (0.05%) 含有普通ブイヨンに，M. H-7 株1白金耳を接種し 24 時間培養する。本菌液は冷室に保存1カ月菌数の減少なく使用することができる。

検定用培地：血清またはアルブミン加 Kirchner 寒天培地を用いる。精製脱脂寒天使用のペプトン不含有培地（Mueller-Hinton 培地）も十分用いられる。INH はペプトンにより不活性化されることがあるので，ペプトン含有普通寒天培地は好適でない。雑菌の混入を完全に防止する意味で malachit green 濃度を 0.0005% まで増加し，またペニシリンを 2 u/ml 程度加えても検定菌の発育に影響のない成績も得えられているが，普通はその必要はない。

Table 1. Assay Method for INH Potency in Solid Egg Medium

Test sample	Standard sample
Egg medium containing INH (e.g. 6.0 ml)	Egg medium without INH (e.g. 6.0 ml)
↓	↓
Break up and homogenize	
	↓ Add standard stock solution of INH to make to contain standard concentration (e.g. 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 μg/ml)
Add 1/3 volume (2.0 ml) of distilled water and mix.	
↓	↓
Keep for approximately 6 hours at room temperature and shake to mix at times.	
↓	↓
Centrifuge at 3,000 r.p.m. for 10 minutes, then pipette up the supernatant as sample.	
↓	
Assay microbiologically active INH potency by the cylinder-plate method using M. H-7 as test organism.	

検定平板調製：溶解 50°C 程度に保つた前記寒天培地に，M. H-7 株 24 時間ブイヨン培養液を振盪し，0.2% 程度に混和接種し，底の平らな規格型平板に均等に分注し，水平において固める。

培養：1 枚の平板にカップを間隔をおいて 4～5 コ立て，被検および標準サンプル (0.2～0.25 *ml* 程度) を満たす。ただちにフ卵器に入れ 37°C に 48 時間程度培養する。

力価測定法：出現した阻止円を垂直 2 方向から計測しその平均値を求める。半対数方眼紙上に INH 濃度を対数目盛で，阻止円直径を整数目盛でとり，標準曲線を画いてのち被検濃度を求める。

実 験 成 績

培地中 INH 濃度と阻止円の関係：1% KH_2PO_4 小川培地に各種濃度 INH を含有させ，前記操作を行ない，その含有濃度の阻止円の関係を求めた。Fig. 1 のように 0.1～10 *μg/ml* の範囲で，INH 対数濃度と阻止円直径の間にほぼ直線関係の成立することがみられた。すなわち普通のカップ法の方式によつて，培地中 INH 濃度の測定が可能なことが確かめられた。またその最低測定域は培地中濃度 0.08 *μg/ml* 程度であった。

培地中 INH 力価の変動：5, 1, 0.1 *μg/ml* 含有の 1% KH_2PO_4 小川培地について，90°C 60 分加熱および冷所 (4°C) 保存ならびに，37°C フ卵器内における INH 活性濃度の変動について検討した。Fig. 2 に示すように加熱凝固による力価の低下はほとんどみられなかつた。しかし 37°C では冷所に比して力価の低下が早く，37°C 保存では 2 カ月以内に，冷室保存では 3 カ月以後に，20%以上の明らかな力価の低下がみられた。

Fig. 1. Relation between INH Concentration and Diameter of Inhibition Zone
Medium tested : Ogawa's 1% KH_2PO_4 medium

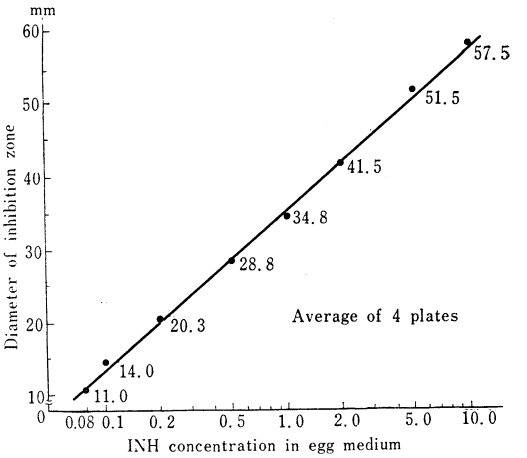


Fig. 2. Stability of INH Potency in Solid Egg Medium (Ogawa's 1% KH_2PO_4) during Storage

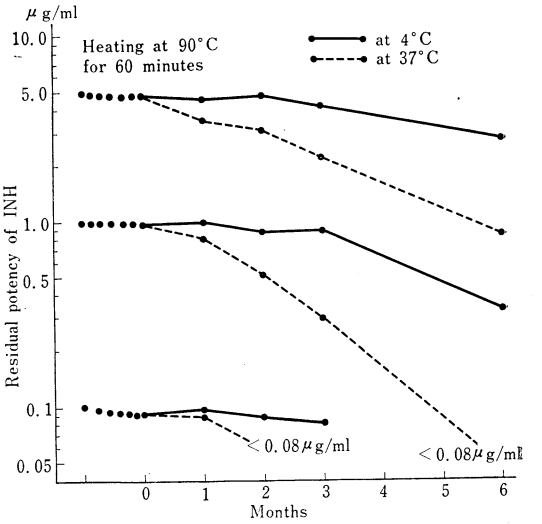
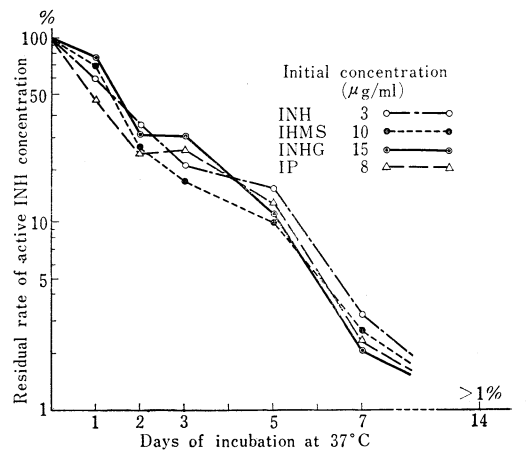


Fig. 3. Inactivation Rate of INH, IHMS, INHG and IP in Dubos' Liquid Medium at 37°C



液体培地（Dubos 培地）中の INH 濃度の変動：Dubos 液体培地に INH (Isonicotinic acid hydrazide) およびその誘導体である Isonicotinic acid hydrazide Na methansulfonate (IHMS), Isonicotinic acid hydrazide Na-glucuronate (INHG), Isonicotinyl hydrazino pyruvic acid Ca salt (IP) を Fig. 3 に示すようにほぼ相当力価に含有させ，37°C に保つて日を追つて活性力価の消長を検査した。Fig. 3 のようにこれらの誘導体はすべて，Dubos 培地中では INH と同様に添加直後には十分な活性力価を示したが，いずれも比較的急速に抗菌力が低下し，14日以内に全く不活性化されるという成績がえられた。

考　　案

INH の濃度測定法としては生物学的方法と化学的方法が行なわれているが，耐性培地の検定法としては，抗菌力を測定する目的にかなう意味で活性物質濃度を直接測定する生物学的測定法をまず第一に用いるべきと考えられる。

私どもは今回この目的にそう意味で，血中活性濃度測定法と同様な方法，すなわち INH 高感受性 rapid grower M. H-7 株を用いる薄層平板円筒法を行ない，0.1 $\mu g/ml$ までの INH 耐性培地濃度を十分測定しうることを確かめた。本法によれば48時間以内に判定可能であり，少量のサンプル（0.2～0.3 ml 程度）を用い，1枚の平板で数コの検体を処理することができ，混和接種法を行なうので鮮明な阻止円が出現することなど，抗生物質の分野で広く用いらている寒天平板法と同様な長所を有していることも確かめられた。

つぎに本法を用いて INH 耐性培地の力価の変動を検した結果，Dubos 液体培地ではもつとも速やかに力価の減少がみられ，卵培地（1％小川培地）ではこれに比し安定はよいが，冷室（4°C 程度）保存でも3カ月以上で，37°C では2カ月以後には明らかに力価の減少がみられた。したがつて INH 耐性培地の保存性の限界は，冷室保存3カ月程度であろうと考えられた。

結　　論

1) INH 耐性培地の力価測定法として，M. H-7 株を用いる薄層平板円筒法を行ない，INH 濃度 0.08 $\mu g/ml$ 以上の耐性培地の濃度測定が可能であつた。

2) 本法により耐性卵培地中の力価の変動を測定し，加熱凝固（90°C 60分）では力価の低下はほとんどないこと，37°C では1～2カ月で力価が低下するが，冷室（4°C）では3カ月以内には著しい低下はみられなかつた。しかし液体培地（Dubos）では 37°C 2週間内に著しい不活性化が認められた。

文　　献

1) 抗菌性物質製剤基準：厚生省.
2) 宮村定男·金沢裕：薄層カップ法によるペニシリン，ストレプトマイシンの体液中濃度測定法，J. Antibiotics Ser. B, 3 : 295, 1950.
3) 金沢裕・宮村定男・倉又利夫：カップ法によるカナマイシンの体液中濃度測定法，J. Antibiotics Ser. B, 13 : 295, 1960.
4) 猪野茂：結核菌のストレプトマイシン耐性検査法に関する二，三，臨床病理，4 : 288, 1956.
5) 岩田和夫・高橋昭三・藤井隆一・江田亨：カナマイシン耐性検査術式に関する研究，Chemotherapy, 11 (Suppl. June) : 120, 1963.
6) 小川政敏：結核菌の薬剤耐性，最新医学，9 : 2, 1954.
7) 工藤祐是：耐性検査測定法の検討，結核，36 : 480, 1961.
8) 金沢裕・倉又利夫：非病原性抗酸菌を検定菌とする寒天平板拡散法による INH 体液中濃度測定法，Chemotherapy, 10 : 198, 1962.
9) Y. Kanazawa and T. Kuramata : Assay method for biologically active isoniazid in body fluid by agar diffusion method using saprophytic mycobacterium as test organism, Chemotherapy, 11: 176, 1963.
10) 田川周幸：非病原性抗酸菌を指示菌とする INH 血中濃度測定法（金沢氏法の追試成績），結核，38 : 146, 1963.