

結核耐性培地の力価検定法に関する検討

金 沢 裕・倉 又 利 夫

新潟鉄道病院

受付 昭和 39 年 12 月 16 日

STUDIES ON THE ASSAY METHOD OF MICROBIOLOGICALLY
ACTIVE CONCENTRATIONS IN THE SENSITIVITY TEST
MEDIA FOR ANTITUBERCULOUS AGENTS

Yutaka KANAZAWA and Toshio KURAMATA*

(Received for publication December 16, 1964)

The thin agar diffusion method, using rapidly growing saprophytic mycobacteria or malachite-green low-sensitive bacteria as test organisms, was applied to the assay of microbiologically active concentrations in the sensitivity test media for antituberculous agents.

1) In the experiment, tested agents, basal media, applied test organisms and the resulted assayable ranges were as follows :

INH, Ogawa's 3% KH_2PO_4 egg medium, Mycob. H-7, $>0.08 \mu\text{g/ml}$.

Ethambutol, Ogawa's 3% KH_2PO_4 egg medium, Mycob. H-7, $>1 \mu\text{g/ml}$.

Ethionamide, Ogawa's 3% KH_2PO_4 egg medium, Mycob. 238, $>20 \mu\text{g/ml}$.

Kirchner's agar medium, Mycob. 238, $>5 \mu\text{g/ml}$.

Sulfisoxazole, Ogawa's 3% KH_2PO_4 egg medium, Mycob. H-7 or E. coli K-12, $>10 \mu\text{g/ml}$.

Cycloserin, Kirchner's agar medium, Mycob. H-7 or E. coli K-B, $>20 \mu\text{g/ml}$.

Viomycin, Kirchner's agar medium, Mycob. H-7, $>10 \mu\text{g/ml}$.

Kanamycin, Kirchner's agar medium, Mycob. H-7, E. coli K-B or Kleb. PCI 602, $>5 \mu\text{g/ml}$.

Streptomycin, Ogawa's 3% KH_2PO_4 egg medium, Mycob. H-7 or Kleb. PCI 602, $>5 \mu\text{g/ml}$.

Capreomycin, Kirchner's agar medium, Mycob. H-7, $>10 \mu\text{g/ml}$.

2) Stabilities of the antituberculous agents in the sensitivity test media during storage were determined by these methods.

Streptomycin and sulfisoxazole were highly stable, without any remarkable deteriorations even after 6 months' storage at 37°C . Kanamycin, ethambutol, viomycin and capreomycin kept their active concentrations at 4°C but were remarkably deteriorated at 37°C during 6 months' storage. INH ($5, 1 \mu\text{g/ml}$) was stable at 4°C but unstable at 37°C during 3 months. Ethionamide, cycloserin and INH ($0.1 \mu\text{g/ml}$) decreased in their active concentrations at 4°C during 3 months.

* 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、その培地の使用目的から微生物学的方法が適当と考えられる。結核耐性培地の力価も Streptomycin, Kanamycin, Viomycin, Cycloserin などは、当然抗生物質製剤基準¹⁾による Bio-assay で測定可能と思われた。これらの耐性培地の検定法としては Streptomycin については猪野²⁾, Kanamy-

cin について岩田³⁾の報告もある。しかし岩田らも認めているように、実際は雑菌防止のためにあらかじめ培地に添加されてある Malachite-green, または私どもも今回経験したことであるが、基礎培地としての Kirchner 培地またはその成分の Albumin の一部の市販品に、同様な目的で加えられている Penicillin が B. subtilis PCI

219, *Staphylococcus* FDA 209 P 株などの検定菌に強い発育阻止作用を呈するので、製剤基準に掲載されている検定法は必ずしも適用され難いことが判明した。

私どもはさきに迅速発育型の雑菌性抗酸菌 (rapid grower) を検定菌とする薄層平板拡散法で INH⁴⁾, Ethambutol⁶⁾, Ethionamide⁷⁾ など抗結核剤の体液中濃度測定法ならびに [INH 耐性培地の力価測定法⁵⁾] について報告した。このさいの検定菌株は当然 Malachite-green, Penicillin に感受性が低いので、結核耐性培地の力価測定法に役立つ可能性があると考えられる。私どもは今回 PAS を除く INH, Streptomycin, Kanamycin, Ethionamide, Sulfa 剤, Ethambutol, Cycloserin, Viomycin, Capreomycin などの抗結核剤耐性培地の力価を、これらの測定法を用い 2 日以内の期間で測定しうることを知り、また 2, 3 の薬剤については Malachite-green の作用を受け難い抗酸菌以外の菌株についても検定菌としての有用性を検討し、さらに実際に保存による培地力価の変動を上記の方法で測定したので報告する。

実験材料

基礎培地：3% 第一磷酸カリ含有小川培地、または Albumin 加 Kirchner 寒天培地 (栄研) pH 6.0 を用いた。

耐性培地：Table 1 のように各薬剤ごとに調製した培地を検体とした。ただし標示濃度は実際の含有 (添加) 濃度を示した。

検定菌：

1) M. H-7 株：私どもの土壌から分離した INH, Ethambutol 高感受性の rapid grower M. H-7 株を、Ethionamide を除くすべての薬剤に対して用いた。

2) M. 238 株：同様私どもの土壌から新たに分離した雑菌性抗酸菌である rapid grower M. 238 株を Ethionamide 測定に用いた。

3) 抗酸菌以外の菌株：抗生剤の検定菌として用いられている *B. subtilis* PCI 219, *E. coli* NIHJ, *E. coli* K-

12, *E. coli* K-B, *Klebsiella* PCI 602 についても検定菌としての有用性を検討した。

検定用培地：

1) M. H-7 株には Albumin 加 Kirchner 寒天培地 (栄研)、または Tryptosoy 寒天培地 (栄研) に雑菌防止のために Malachitegreen を 0.0005%, Penicillin を 2 u/ml 程度加えて使用した。

2) M. 238 株には Mueller-Hinton 変法 (感性ディスク用培地一日水) を用いた。

3) その他の菌株、すなわち *E. coli*, *Klebsiella*, *B. subtilis* には Mueller-Hinton 変法 (感性ディスク用培地) を用いた。なお Kanamycin, Streptomycin, Viomycin 検定には培地の pH は 7.8 に、Cycloserin には pH 6.5 に補正後使用した。

実験方法

検定菌液調製：

1) M. H-7 株, M. 238 株は、Tryptosoy 寒天培地または 1% 小川培地 48 時間培養菌苔 2 白金耳を滅菌生食水 2 ml に可及的均等に浮遊 (試験管壁で十分粉碎し、ピペットでパンピングするなどして) してのち数分間静置し、粗大菌塊の沈下をまつて上層菌液を接種菌液とした。

2) *E. coli*, *Klebsiella* は菌苔 1 白金耳を 2 ml の生食水に均等に浮遊し接種液とした。

3) *B. subtilis* PCI 219 は約 10^9 /ml に芽胞を含有する菌液を調製、保存して使用した。

検定平板の調製：

1) M. H-7 株は溶解 50°C 程度に保つた前記寒天培地に、前述接種菌液を 0.2% に加え混和接種し、底の平らな規格型シャーレに 5 ml 宛均等に分注し、水平において固めた。

2) M. 238 株は、規格型シャーレにあらかじめ 5 ml 宛分注した培地上に、接種菌原液を 20 倍に稀釈してその 1 滴 (0.03 ml 程度) を滴下し、20 コ程度の小ガラス玉 (直径 3~5 mm) をゆりうごかして均等に表面接種した。

3) *E. coli*, *Klebsiella*, *B. subtilis* は接種菌液を 0.2% に溶解した培地に加え混和し、5 ml 宛規格型シャーレに分注し水平に固めた。

被検サンプルの調製：

1) Table 2 に示すように被検および新たに調製した標準濃度の培地を、キルクボーラーなどで円柱ブロックを打ち抜いて測定用サンプルとした。

2) ただし小川培地使用の場合、90°C、60 分加熱凝固前後の力価は、

Table 1. Sensitivity Test Media Used in the Experiment

Antituberculous agent	Basal medium	Concentration added $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	Ogawa's 3% KH_2PO_4 egg medium	100, 50, 20, 10
INH	"	5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.08
Ethambutol	"	40, 10, 5, 2
Sulfisoxazole	"	100, 50, 20, 10, 5
Ethionamide	"	100, 50, 20, 10, 5
"	Kirchner's agar medium	20, 10, 5
Kanamycin	"	100, 50, 20, 10, 5
Viomycin	"	100, 50, 20, 10
Cycloserin	"	100, 50, 20, 10
Capreomycin	"	100, 10

Table 2. Assay Method for Microbiologically Active Potency in Solid Sensitivity Test Medium

Test samples : Solid sensitivity test media	Standard samples : Newly prepared solid media containing standard drug concentrations.
↓	
Punch out cylinder blocks (8~10 mm in diameter, 3~5 mm in altitude) from solid medium.	
↓	
Assay microbiologically active drug potency of test samples by the thin agar diffusion method.	

INH 培地測定にさきに私どもが用いたと同様な抽出法 (Table 3) を行なつて被検サンプルを作製した。

検定操作:

- 1) 平板に被検ならびに標準サンプルとしての円柱ブロックを検定培地と密着するように置いた。
- 2) 抽出液の場合は平板上にカップを立て、被検ならびに標準サンプルを充たした。

培 養:

- 1) M. H-7 株, M 238 株使用平板はただちにフ卵器に入れ, 37°C に 48 時間程度培養する。
- 2) E. coli, Klebsiella, B. subtilis は 4 時間程度 15°C 以下に放置後, 37°C に 12~16 時間培養した。

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、半対数方眼紙上に、薬剤濃度を対数目盛で、阻止円直径を整数目盛でとり標準曲線を書いてのち、被検体の阻止円直径に相当する薬剤濃度を求めて被検濃度とした。

Fig. 1. Antimicrobial Activity of Malachitegreen against Various Test Organisms: Relation between Diameter of Inhibition Zone and Concentration of Malachitegreen by the Thin Agar Diffusion Method

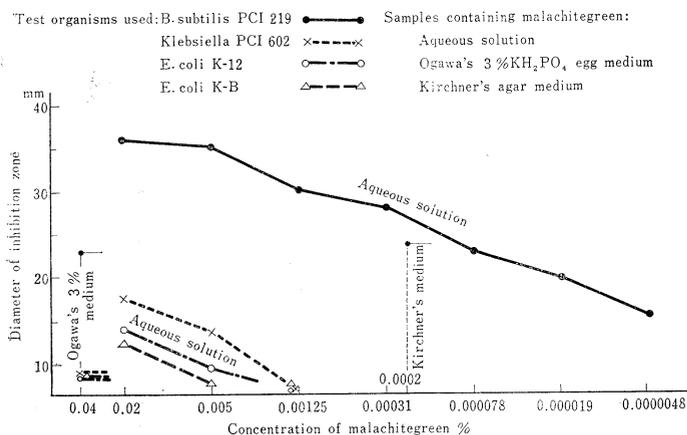


Table 3. Assay Method for Microbiologically Active Potency in Solid Egg Sensitivity Test Medium after Heating

Test sample : Egg medium to be tested (e.g. 6.0 ml)	Standard sample : Egg medium without antituberculous agent (e.g. 6.0 ml)
↓	
Break up and homogenize	
↓	
Add newly prepared solution of drug to make to contain standard concentrations	
↓	
Add 1/3 volume (e.g. 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 drug concentration by the thin agar cylinder-plate method.	

実験成績

Malachite-green の抗酸菌以外の検定菌に対する発育阻止力:

Malachite-green の各種濃度の水溶液, Malachite-green を 0.04% に含有する 3% 小川培地および 0.0002% に含有する Kirchner 寒天培地の各検定菌に対する発育阻止力を検討した。すなわち溶液はカップに入れ、培地は円柱ブロックを検定平板上において、培養後出現した

阻止円を計測した。Fig. 1 に示すように Malachite-green 水溶液は、0.000048% の低濃度まで B. subtilis PCI 219 に対して阻止円を示し、また Kirchner, 小川培地も同様に、含有 Malachite-green による発育阻止力を示した。したがって培地の力価検定菌としては B. subtilis PCI 219 は不適であることがあきらかであつた。E. coli, Klebsiella は 0.005% 以上の Malachite-green 水溶液により阻止円形成がみられたが Kirchner 寒天培地, 3% 小川培地に前述の規定濃度に含有されたさいには阻止円がみられなかつた。したがってこれらの菌株は培地中薬剤濃度測定用の検定菌としてはある程度使用可能であると考えられた。

培地中薬剤濃度と阻止円の関係：

上述の菌株中から可及的鋭敏な菌株を選択して、各薬剤について培地内濃度と阻止円直径の関係を求めた。Fig. 2 に示すように、いずれの薬剤でも培地内薬剤濃度と阻止円直径の間にほとんどの濃度の幅ではほぼ直線関係が成立し、したがって従来のカップ法で代表されている平板拡散法と同様な方法で、被検培地中の薬剤濃度の測定が可能と考えられた。ただし図示されるように Viomycin は 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下では阻止円が著しく縮小する傾向が認められた。M. H-7 株は今回実験した薬剤では Ethionamide を除く抗結核剤のすべてにある程度の感受性を示したが、Cycloserin ではやや感度が低く 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の培地中濃度測定は不能であつた。また PAS については上記の菌株を含め 762 株の雑菌性抗酸菌についても検討したが、10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の PAS 濃度に対し阻

止円を生ずる菌株を見出すことはできなかつた。

保存培地の力価の変動：

ついで実際に各種薬剤の耐性培地について、37°C フ卵器内放置と、冷所 4°C 前後放置による活性力価の変動を、M. H-7 株および M. 238 株を検定菌とする前述の方法で測定した。Fig. 3 に示すように、一般に 37°C では 4°C に比し力価の低下が著しく、また高濃度培地より低濃度培地のほうが安定性の低い傾向がみられた。安定性は薬剤によりそれぞれ一定の傾向を示し、37°C、4°C ともに 6 か月以内は全く安定なものは Streptomycin, Sulfisoxazole, 4°C では 6 か月安定であるが 37°C では 6 か月間にやや力価の減弱するもの Viomycin, Kanamycin, Ethambutol, 4°C で 3 か月安定であるが 37°C で力価の減弱するものは INH (5, 1 $\mu\text{g/ml}$), 4°C でも 3 か月以内に力価の減弱のみられたもの INH (0.1 $\mu\text{g/ml}$),

Fig. 2. Relation between Drug Concentration in Mndium and Diameter of Inhibition Zone (Average of 5 plates)

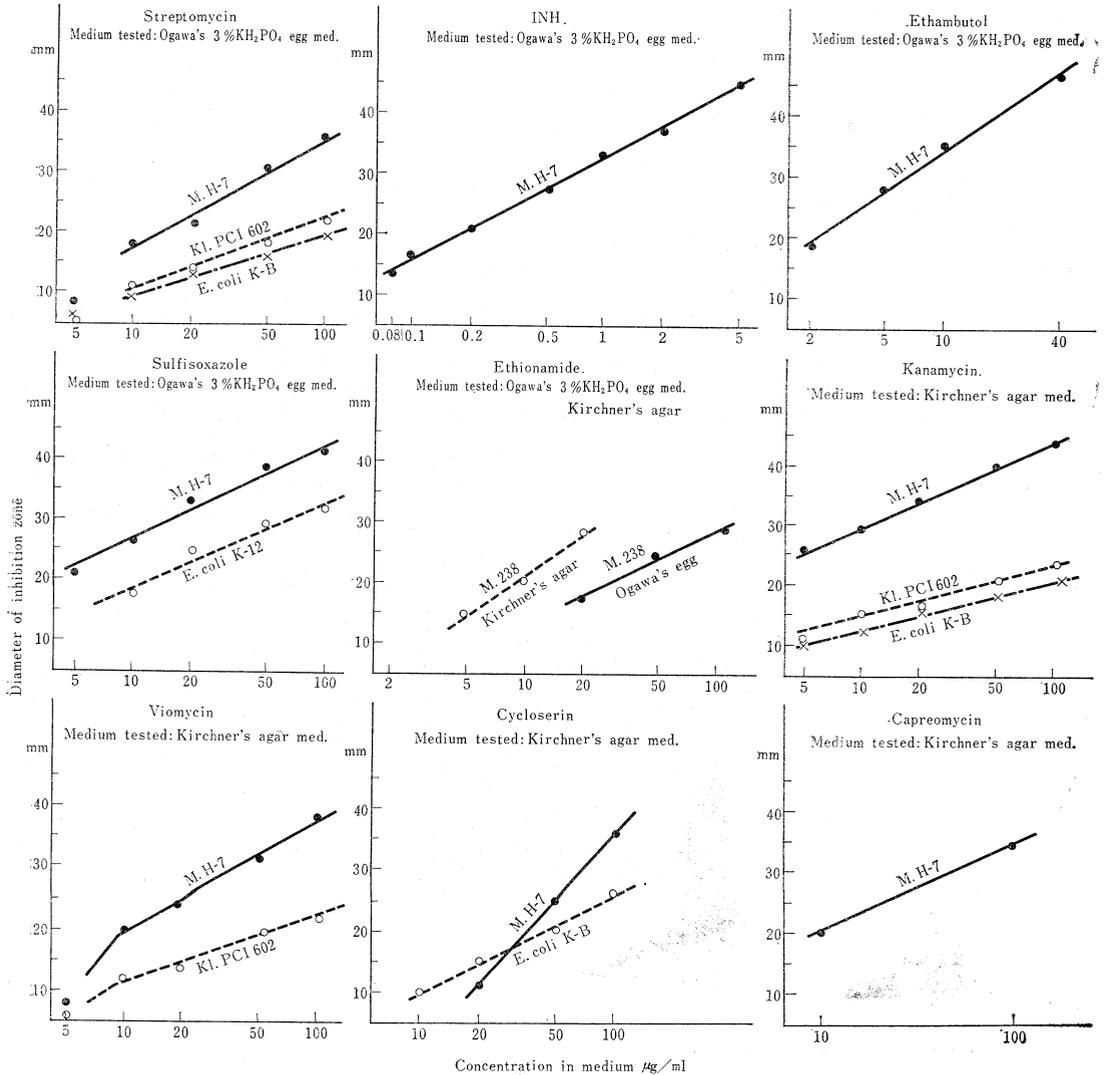
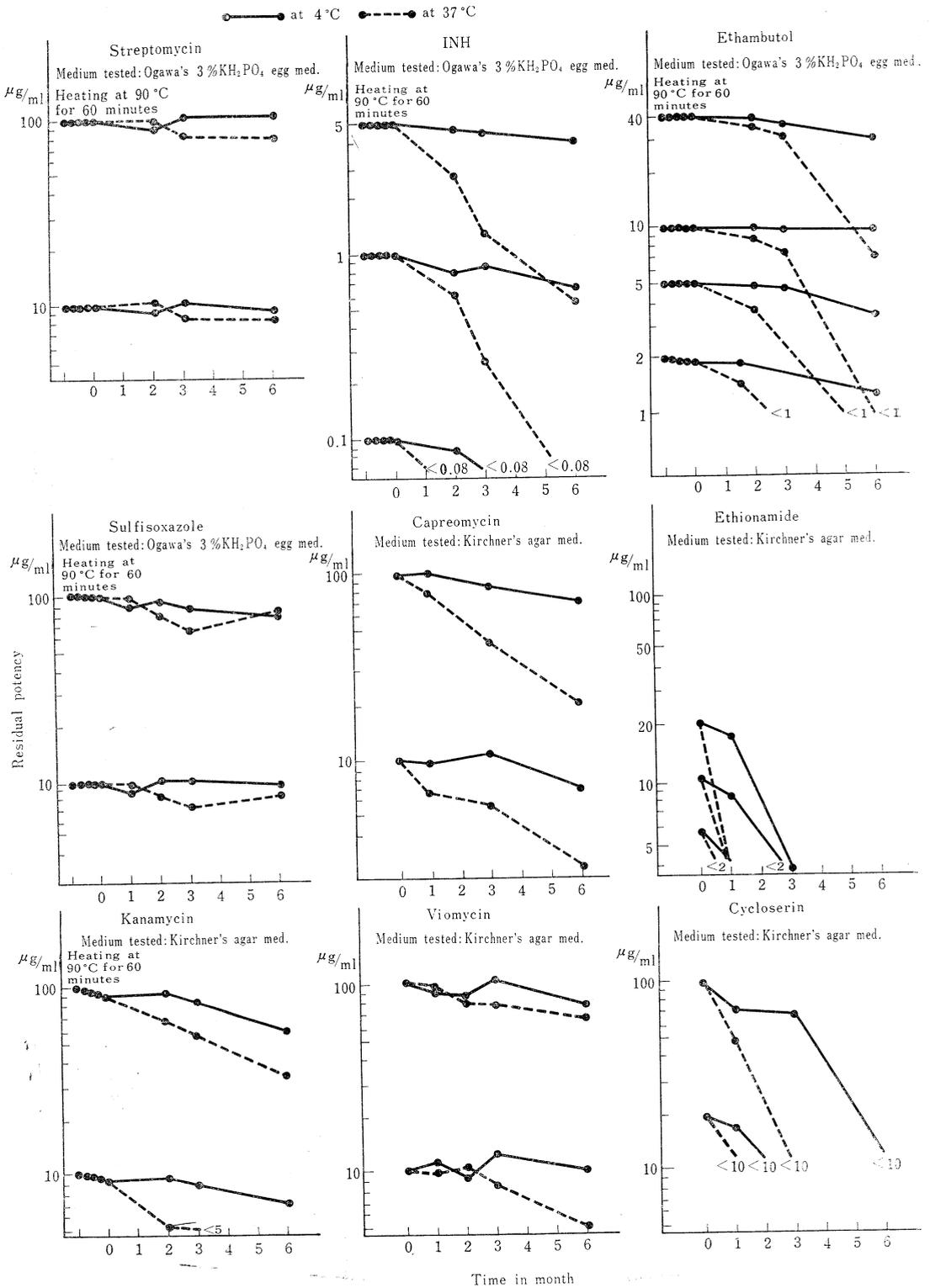


Fig. 3. Stability of Microbiologically Active Potency in Sensitivity Test Medium during Storage



Ethionamide, Cycloserinであつた。

考 察

化学療法剤の濃度測定法としては微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微生物学的測定法をまず第一に用いるべきと考えられる。私どもはこの目的にそう意味で抗結核剤の血中濃度測定法と同様な方法、すなわち私どもの分離した INH 高感受性 rapid grower M. H-7 株、または M. 238 株を検定菌として用いる薄層平板拡散法でほぼその目的を達することができた。本法によれば 48 時間以内に判定可能であり、少量のサンプルを用い、1 枚の平板で数コの検体を処理することができ、おもに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れている寒天平板拡散法と同様な長所を有していることが確かめられた。しかし私どもの検索した範囲では、迅速発育型の雑菌性抗酸性菌中には PAS に高感受性を有する菌株はなかつたので、PAS については現在のところ本法は適用されないわけである。また培地中の Malachite-green により影響を受けにくく、しかも各種抗結核剤に高感受性を有する検定菌を用いれば、24 時間以内に測定が完了し、さらに好都合と考えられ、この点について検討し、Streptomycin, Kanamycin, Cycloserin, Sulfisoxazole ではその目的を達することができた。またこのさい私どもが報告した Sulfa 剤活性濃度測定法⁸⁾が耐性培地の力価測定にもそのまま利用できることも確かめられた。上述の方法で、PAS を除く各種抗結核剤耐性培地の力価の変動を検討した結果、一般に 37°C では 4°C よりも培地の安定性が低く、また低濃度が高濃度より力価減弱の著明なことが各薬剤共通にみられた。すなわち耐性培地の安定性は薬剤により異なり、室温保存でも 6 カ月安定なものは Streptomycin, Sulfisoxazole, 冷所 3 カ月以内でも力価減弱の明らかなもの INH (0.1 $\mu\text{g/ml}$), Cycloserin, Ethionamide (Kirchner 寒天)であつた。したがって各種培地の保存性についてさらに実験を重ねて、各薬剤ごとにある程度の安全限界を出したほうが实际的であると考えられた。今回の私どもの実験施行の被検培地およびその薬剤濃度はおもに、さきに制定された結核菌検査指針の処方によつたが、私どもの実験終了後に指針の改訂が発表された。新しい指針による指定培地、指定濃度による耐性培地も当然、上述の方法を用いて測定可能と思われ、さらに今後検討する予定である。

結 論

1) 結核耐性培地の力価測定法として、抗生物質製剤基準による検定法は、検定菌が Malachite-green に感受性を示す場合があるので、そのまま適用しにくいことがみられた。

2) 結核耐性培地の力価測定法として、非病原性抗酸菌 rapid grower (M. H-7, M. 238) ならびに Malachitegreen に低感受性の E. coli, Klebsiella のいずれかを検定菌として薄層平板拡散法で、PAS を除くおもな抗結核剤の力価が測定可能であり、その測定可能域は INH : $>0.08 \mu\text{g/ml}$, Ethambutol : $>1 \mu\text{g/ml}$, Ethionamide : $>5 \mu\text{g/ml}$, Sulfisoxazole : $>10 \mu\text{g/ml}$, Cycloserin : $>20 \mu\text{g/ml}$, Viomycin : $>10 \mu\text{g/ml}$, Kanamycin : $>5 \mu\text{g/ml}$, Streptomycin : $>5 \mu\text{g/ml}$, Capreomycin : $>10 \mu\text{g/ml}$ であつた。

3) 保存培地の安定性を本法で測定し、6 カ月 37°C で力価低下のないもつとも安定なもの、Sulfisoxazole, Streptomycin, 4°C 保存でも 3 カ月以内に力価の減弱するもつとも不安定なもの Cycloserin, Ethionamide, INH (0.1 $\mu\text{g/ml}$) があり、INH (1, 5 $\mu\text{g/ml}$), Kanamycin, Viomycin, Ethambutol, Capreomycin はその中間にあり、薬剤の種類により大差のあることが認められた。

文 献

- 1) 抗菌性物質製剤基準：厚生省。
- 2) 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.
- 3) 岩田和夫・高橋昭三・藤井隆一・江田享：カナマイシン耐性検査術式に関する研究, Chemotherapy, 11 (Suppl, June): 120, 1963.
- 4) Y. Kanazawa & 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.
- 5) 金沢裕・倉又利夫：INH 耐性培地の力価測定法に関する検討, 結核, 39: 177, 1964.
- 6) Y. Kanazawa & T. Kuramata: Assay method for biologically active ethambutol in body fluid by agar diffusion method using saprophytic mycobacterium as test organism, Chemotherapy, 12: 177, 1964.
- 7) 金沢裕：非病原性抗酸性菌を検定菌とする寒天平板拡散法による INH ならびに 1314 Th の活性濃度測定法 (続法), 結核, 38: 216, 1963.
- 8) 金沢裕・倉又利夫：サルファ剤の活性濃度測定法ならびに測定成績, Chemotherapy, 8: 478, 1960.