

直立拡散法の基礎的研究

第2報 接種菌並びに注入薬剤に関する検討

楊 維垣・田島 洋・飯尾正明・菅沼昭男

谷崎雄彦・川瀬留吉・馬場治賢

国立中野療養所

受付 昭和40年5月12日

FUNDAMENTAL STUDY ON THE VERTICAL DIFFUSION METHOD*

II-Report. About the Bacilli Species and the Drugs

Ikan YO, Yo TAJIMA, Masaaki IIO, Akio SUGANUMA, Katsuhiko TANIZAKI,

Tomekichi KAWASE and Harukata BABA

(Received for Publication May 12, 1965)

In the previous study, we reported about the measurement methods in the vertical diffusion method. In this report, the relationship between the bacilli species and the length of inhibition zones of the instilled drugs was studied.

1) Five different quantities of B. C. G. were inoculated on 3% Ogawa media. After 2 days' incubation in horizontal state, the 5 different doses of INH were poured into the bottom of the media and kept in vertical state for 4 weeks. It was found that the length of inhibition zone was the longer when the quantity of inoculum was smaller (Tab.1 and Fig.1).

2) Directly after the inoculation of 0.05 mg of 5 different species of mycobacteria (B.C.G., M. Fortuitum. H₇, M. Smegmatis and M. Phlei) on 1% Ogawa media, Ethambutol and INH were poured each into the bottom of them in different doses. The incubating period was 3 weeks for B. C. G., 2 weeks for M. Fortuitum, and 4 days for the others. To measure the Ethambutol, M. Phlei was most suitable as seen in Fig.2. Because by using this bacillus, not only the measurement was possible at a very low concentration of the drugs, but also the inclination of the inhibition zone by different doses was the slowest.

For INH, B. C. G. was most suitable in the above meaning (Fig.3). Thus, each drug has its most suitable bacillus for the vertical diffusion method.

Next, we compared B. C. G. and H₉₇Rv, but there was no difference between them (Fig.4).

3) The preservable period of B. C. G. was much influenced by the presence of NaOH. B. C. G. diluted by water was preservable at least for 10 days in the refrigerator or even at room temperature (winter), although the growth of bacilli became worse by 2 hours' contact with 1% NaOH at room temperature (winter) and the length of inhibition zone became longer accordingly. When they were preserved for more than 2 days with NaOH at room temperature, growth of bacilli became so scanty that the inhibition zone could not be formed (Tab. 2).

4) The preservable period of INH solution showed the same tendency as in the case of the bacilli, that is, INH solution diluted by water was preservable at least for 60 days in condition of under 10°C (Tab.3). But if INH was diluted with 1% NaOH, it was certainly destroyed. Table 4 and Figure 5 showed this clearly. INH solution diluted by 1% NaOH was boiled for 5 minutes and preserved for 30 minutes at room temperature (summer).. With this

* From National Nakano Sanatorium, 14-2, 3-chome Egota, Nakano-ku, Tokyo, Japan.

INH solution, the inhibition zone was almost lost. By INH solution with NaOH, preserved at 31°C for an hour, the length of inhibition zone became shorter, and when it was preserved for 4 hours, the inhibition zone was almost lost. When it was preserved in the refrigerator, the preservable time became only a little longer.

So if NaOH was added to INH to avoid the growth of saprophytes, it was recommended to use it as soon as possible at the room temperature.

5) 0.05 mg of B. C. G. was inoculated on 3% Ogawa media. After 2 days' incubation in horizontal state, 0.5γ of INH was poured into the bottom of it and kept in horizontal state at 37°C. INH solution was drawn out after various times as shown in Fig.6 and then the media were kept again in the incubator for 3 weeks.

The length of inhibition zone was the same when the INH solution was drawn out after 12 hours' contact with the media. It was proved that 12 hours' contact of INH solution with the media was enough for the determination of the inhibition zone. From this result and that of the previous report that the length of inhibition zone became shorter, if the drug instillation was retarded, we concluded that the inhibition zone was decided by two factors, that is, the diffusion's speed of the drug and the growth's speed of the bacilli.

われわれは第1報¹⁾で、直立拡散法の測定方法について検討し、一般に測定基点として使われている液面は不定の動点であることを認めた。さらに阻止帯は注入した薬液の量とは直接的には無関係であつて注入薬剤の総重量によつて決定されることを確認した。すなわち注入液量が阻止帯と直接的関係がない以上不定の動点である液面を測定基点として採用するべきでなく、管底を測定基点とするべきであると結論した。

次に菌接種から薬剤注入までの期間および培養期間は阻止帯に影響を与える因子であり、菌接種当日薬剤を注入したほうが實際上操作が簡便でありかつ阻止帯も長くなるので好都合であると報告した。

その他測定上の誤差についての検討を行なつたが、今回は第2報として接種菌および注入薬剤と阻止帯との関

係についての2,3の実験成績を報告する。

[I] 接種菌量

接種菌量の阻止帯に及ぼす影響を検討する目的で次の実験を行なつた。BCG 菌液 5, 0.5, 0.1, 10⁻², 10⁻³mg/cc の5組を作り、その0.1ccずつを3%小川培地(斜面培地)に1組40本あて接種した(すなわち接種された菌量は0.5, 0.05, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴mgである)。菌接種後菌液を十分に培地全面にゆきわたらせたのち37°C、2日間水平に静置、INH水溶液 3, 1, 0.5, 0.3, 0.1γ/0.5cc

Table 1. Fluctuation of Inhibition Zone of INH According to the Quantities of Inoculated Bacilli

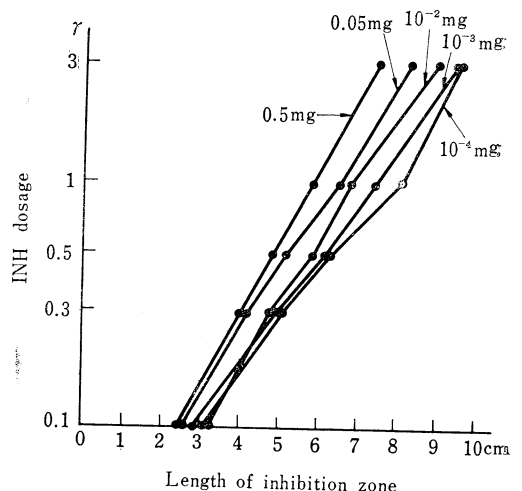
INH instillation into the 3% Ogawa media which were inoculated with BCG and incubated for 2 days at 37°C.

Reading was made after 4 weeks' incubation

Quantities of BCG (mg)	Instilled INH dosage				
	3γ	1γ	0.5γ	0.3γ	0.1γ
0.5	7.28	5.71	4.69	3.96	2.35
0.05	8.14	6.36	4.98	4.14	2.39
10 ⁻²	8.79	6.63	5.68	4.69	3.18
10 ⁻³	9.37	7.28	6.05	4.76	2.68
10 ⁻⁴	9.38	7.88	6.07	5.00	3.06

Length of inhibition zone is an average of 8 media of each group.

Fig. 1. Fluctuation of Inhibition Zone of INH According to the Quantities of Inoculated Bacilli
INH instillation into the 3% Ogawa media which were inoculated with BCG before 2 days and kept in 37°C, Reading ; after 4 weeks of incubation



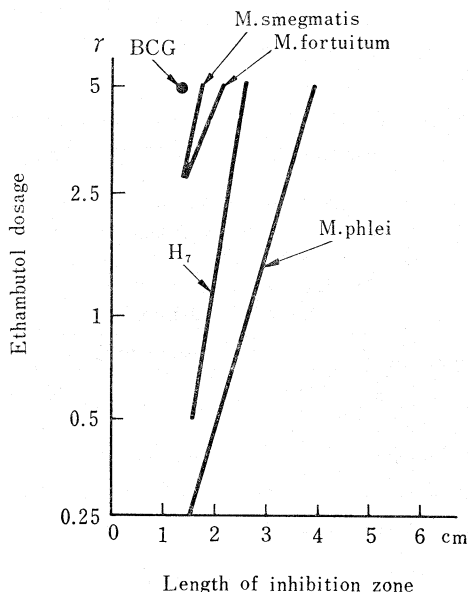
の5段階を1段階につき培地8本あて各組にそれぞれ0.5ccずつ注入、直立に保つて37°C4週間培養した。以上の実験によつて得られた阻止帯の高さは表1、図1に示すとおりで、たとえばINH 1rでは接種菌量の多い組から順に阻止帯の高さは5.7, 6.4, 6.6, 7.3, 7.9cmであり、またINH 0.3rでは4.0, 4.1, 4.7, 4.8, 5.0cmとなつているごとく、0.3r以上ではすべて接種菌量が少ないほど阻止帯は長くなる傾向を示した。

【II】 接種菌の種類

BCG, M. Fortuitum, M. Smegmatis, M. Phlei, H₇株の5菌種を対象として接種菌の種類と阻止帯との関係をEthambutol (以下E.B.と略す)ならびにINHについて検討した。

上記の各菌種とも0.05mg(0.1cc)を1%小川培地(斜面培地)に30本あて接種、直後にE.B.水溶液5, 2.5, 1, 0.5, 0.25r/0.5ccの5段階を0.5ccずつ各菌種ともに1段階につき培地6本にそれぞれ注入、37°Cに直立に培養した。BCGは3週間、M. Fortuitumは2週間、他は4日にて判定した。阻止帯の高さは図2に示すとおりである。すなわちM. Phleiがもつとも曲線の傾斜が

Fig. 2. Variations of Inhibition Zone of Ethambutol According to the Differences of Bacilli Species

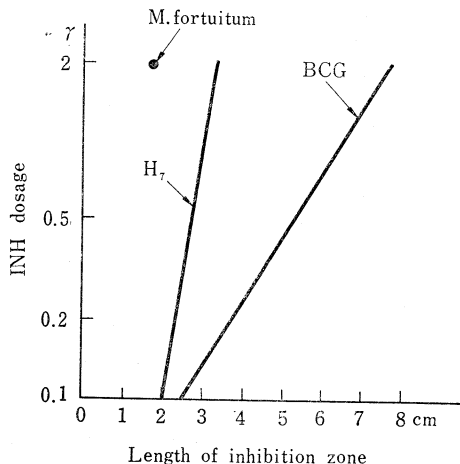


ゆるく、H₇, M. Fortuitum, M. Smegmatisの順に傾斜が急となつており、かつM. PhleiはE.B. 0.25rまで測定可能であるが、H₇は0.5r、M. FortuitumおよびM. Smegmatisは2.5r、BCGは5r以下では阻止帯を形成しなかつた。

次にE.B.のかわりにINH 2, 0.5, 0.2, 0.1r/0.5cc

の4段階を0.5ccずつ、各段階ともに培地6本ずつに注入した。注入直前に上記5種類の菌種をそれぞれ接種した1%小川培地を使用した。他はすべて上の実験と同条件で施行した阻止帯が図3である。すなわちBCGおよびH₇はINH 0.1rまで測定可能であつたが、M.

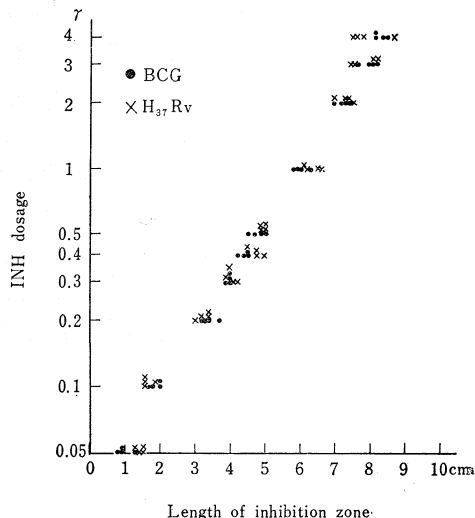
Fig. 3. Variations of Inhibition Zone of INH According to the Differences of Bacilli Species (1% Ogawa media)



Fortuitumは2rが測定可能限界であり、M. PhleiおよびM. Smegmatisは阻止帯を形成しなかつた。またINHに対するこれらの阻止帯の曲線はBCGがもつともゆるい傾斜を示した。

以上図2、図3にみられるように接種菌の種類によつてその形成される阻止帯の傾斜は明らかに異なるが、ま

Fig. 4. Inhibition Zone of INH by BCG or H₃₇Rv Inoculum quantity; 0.05 mg 3% Ogawa media.. Reading; after 3 weeks' incubation.



[図2は胸部臨床で発表²⁾したが、接種菌量およびM. Fortuitumの判定日は誤りであつたので本論文のごとく訂正する]

た注入薬剤によつてもそれぞれ阻止帯は異なつた傾斜を示す。すなわち E. B. に対する M. Phlei, INH に対する BCG のごとく各測定薬剤にもつとも適当と思われる菌種が存在し、菌種の違いによつて阻止帯はまったく異なつた高さを示した。

次に BCG と H₃₇Rv とを比較した。3% 小川培地に BCG, H₃₇Rv とともに 0.05 mg (0.1 cc) をおのおの 40 本ずつ接種, 37°C 2 日間静置後, INH 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 γ/0.5 cc の 10 段階についておのおの培地 4 本あて 0.5cc ずつ注入し, 直立に 37°C 3 週間培養した。図 4 のごとく BCG と H₃₇Rv とでは阻止帯の高さに差を認めなかつた。

【III】 菌液保存可能期間

滅菌蒸留水で作製した 5 mg/cc BCG 菌液をさらに滅菌蒸留水および 1% NaOH 水でそれぞれ 0.5 mg/cc 菌液に作製し, それをおのおの室温 (冬期) および冷蔵庫に分けて保存した。同時に 1 γ/cc INH 液 (滅菌蒸留水で稀釈) を調整し, 冷蔵庫に保存した。上記の菌液および INH 液を使用して次の実験を行なつた。蒸留水稀釈群, 1% NaOH 稀釈群ともに菌液作製後 2 時間 (室温保存のみ), 2, 4, 6, 8, 10, 40 日後 (ただし 40 日は水稀釈の冷蔵庫保存分のみ) に 3% 小川培地 (斜面) 各 4 本あて菌液 0.1cc を接種, すぐに INH 液 0.5 cc を注入, 37°C 3 週間直立に培養した。菌液, INH 液, 培地はすべて同時に作製されたものを使用した。

以上の実験による阻止帯の高さは表 2 のごとく, 蒸留水稀釈菌液では室温保存において 2 時間から 10 日までの阻止帯は 5.3, 5.6, 5.4, 5.1, 5.5, 5.1 cm であるが, 冷蔵庫保存の 2 日から 40 日までの阻止帯は 5.3, 5.2,

Table 2. Preservable Period of BCG (Inoculum quantity of BCG; 0.05mg, Instillation of INH; 0.5γ, 3% Ogawa media, Reading; after 3 weeks' incubation)

From the time of preparation of BCG suspension to inoculation	BCG diluted with dest. water		BCG diluted with 1% NaOH	
	Room temp.	Refrigerator	Room temp.	Refrigerator
2 hours	cm		6.70*	—
2 days	5.28	—	* *	6.40*
4 days	5.60	5.28	* *	6.80*
6 days	5.43	5.20	* *	7.67*
8 days	5.10	5.10	* *	6.90*
10 days	5.48	5.40	* *	6.23*
40 days	5.08	4.68	* *	—
	—	6.28	—	—

Note: 1) * Growth of bacilli was very bad, especially after 2 days of presevation, showing less than 30 colonies.

** There were only one or 2 colonies, being impossible to mesure by vertical diffusion method.

2) Length of inhibition zone is an average of 4 media.

3) Room temperature in winter.

5.1, 5.4, 4.7, 6.3 cm である。すなわち室温でも冷蔵庫に保存した菌液でも大体 10 日間くらいは阻止帯に有意の差はなく, したがつて 10 日間は保存可能であつた。しかし 1% NaOH で稀釈した菌液を使用した群は, 室温に 2 時間放置したものですでに菌の繁殖状態は悪くなり, 阻止帯も 6.7 cm と長くなつている。2 日以上室温に放置したものは 1~2 コロニーの菌をみるのみで阻止帯を形成せず, 冷蔵庫に保存したのもでも菌の繁殖は培地にパラパラ散在する程度で, ほとんどが 30 コロニー以下であつた。すなわち雑菌防止のために菌液に 1% NaOH を加え 2 時間以上放置すると阻止帯は著明な影響を受ける成績を示した。

【IV】 INH 液の保存可能期間

前記 BCG 菌液の保存可能期間の検討に使用した INH 液は作製後冷蔵庫に保存し, 必要に応じて使用に供したが, 当然菌液のみでなく INH 液および培地の保存による影響も考慮しなければならない。(培地の保存可能期間は次報の予定)

まず INH 液の保存可能期間についての実験成績を次に記す。BCG 菌液 0.05 mg (0.1 cc) を 3% 小川培地 (斜面) に接種直後, 作製時期および保存方法の異なる 1 γ/cc INH 液をそれぞれ培地 8 本あて 0.5cc ずつ注入した。使用した INH 液は 60 日前および 15 日前に作製 (ともに滅菌蒸留水で稀釈したもの) し, 室温 (冬期 10°C 前後), 冷蔵庫 (0~5°C), 氷室 (-10°C) におおの保存したものと, 使用直前 (1 時間前) に作製したものとである。3 週間 37°C に培養した阻止帯は表 3 のとおりである。使用 1 時間前作製の INH 液では阻止帯は

Table 3. Preservable Period of INH Solution BCG inoculum; 0.05 mg, 3% Ogawa media. Instillation of 0.5 ml of 1γ/ml INH. Reading was made after 3 weeks' incubation.

From the time of preparation of INH solution to instillation	Preservation method		
	About 10°C	0 ~ 5°C	-10°C
1 hour	5.15 cm		
15 days		5.06 cm	
60 days	5.56 cm	5.31 cm	5.16 cm

Length of the inhibition zone is an average of 8 media.

5.2 cm であり, 15 日間冷蔵庫保存した液では 5.1 cm, 60 日間保存したもものでは室温 5.6, 冷蔵庫 5.3, 氷室 5.2 cm であつた。すなわち保存法とほとんど関係なく, INH 液は割合安定で 60 日間は使用に耐えうることを認めた。

しかし菌液と同様雑菌混入防止の意味で NaOH 液を入れた場合は次のごとき実験成績を得た。1 γ/cc INH 液調整の最終段階を 1% NaOH 水で稀釈したものと, 滅菌蒸留水のみで処理した INH 液とを, それぞれ冷蔵庫

Table 4. Effect upon the inhibition zone of INH diluted with 1% NaOH BCG inoculum; 0.05mg. After 2 days' incubation 0.5 ml of 1 γ /ml INH solution was instilled into the bottom of 3% Ogawa media. Reading was made after 3 weeks' incubation

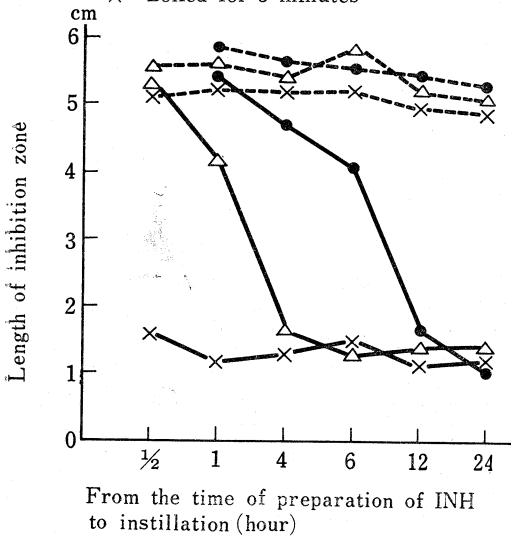
From the time of preparation of INH solution to instillation (hour)	Water solution of INH			1% NaOH solution of INH		
	4 $^{\circ}$ C	Room temp. (31 $^{\circ}$ C)	Boiled for 5 minutes	4 $^{\circ}$ C	Room temp. (31 $^{\circ}$ C)	Boiled for 5 minutes
0.5	— cm	5.58 cm	5.25 cm	— cm	5.38 cm	1.48 cm
1	5.85	5.73	5.38	5.58	4.13	1.10
4	5.70	5.45	5.33	4.70	1.70	1.38
6	5.55	5.80	5.18	4.08	1.35	1.38
12	5.43	5.25	4.80	1.43	1.35	1.18
24	5.25	5.10	4.80	1.05	1.10	1.10

Length of inhibition zone is an average of 4 media (for 24 hours' group, it is an average of 2 media).

Fig. 5. Effect Upon the Inhibition Zone of INH Diluted with 1% NaOH

Inoculum; BCG 3% Ogawa media, Reading after 3 weeks

- 1% NaOH solution of INH
- Water solution of INH
- Preserved at 4 $^{\circ}$ C
- △ Room temperature (31 $^{\circ}$ C)
- × Boiled for 5 minutes



(4 $^{\circ}$ C), 室温 (31 $^{\circ}$ C) および 100 $^{\circ}$ C の水浴中で5分煮沸後室温に保存した3種類にさらに分けて実験に供した。BCG菌液 0.05mg (0.1cc) 接種後 37 $^{\circ}$ C に2日間水平に静置した3%小川培地に、上記の6種類のINH液をおののおの薬液調整後30分、1, 4, 6, 12, 24時間目に0.5ccずつ、1群培地4本ずつ注入(24時間目のみは2本ずつ)、37 $^{\circ}$ C 3週間培養した。阻止帯は表4, 図5に示すように滅菌蒸溜水のみで処理したINH液はいずれの保存法でも大体同じ高さであるが、1% NaOH水で処理したINH液については、煮沸群では薬剤調整後30分に注入したものでもすでに阻止帯はほとんど液面に接するまでに低下し、室温(夏期)保存群では1時間で阻止帯

の短縮を認め、4時間以後は液面近くまで低下した。最後に冷蔵庫保存群がもつとも阻止帯の低下速度が遅いが、それでも4時間で短縮を認め12時間以後は完全に阻止帯は低下した。

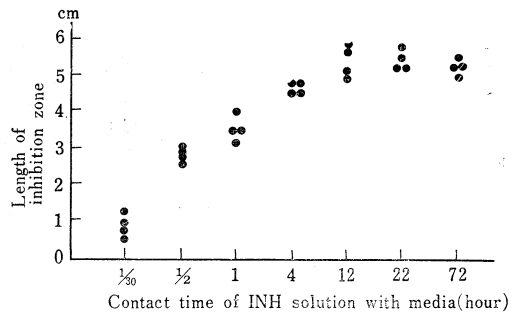
以上表3ならびに表4の実験成績から滅菌蒸溜水で処理したINH液は相当に安定であるが、1% NaOH水で処理したINH液は保存方法すなわち保存温度に

よつて速度は異なるが、とにかくNaOHによつてINHは破壊されることは明らかである。したがつて雑菌防止のためにNaOHを使用する場合は少なくとも1時間以上室温に放置することは避けるべきである。

[V] INH液と培地の接触時間

直立拡散法で注入した薬液と培地の接触する時間と阻止帯との関係について、BCG 0.05mg 接種2日間 37 $^{\circ}$ C 静置した3%小川培地に1 γ /cc INH液 0.5cc 注入、37 $^{\circ}$ C に直立に培養した。INH液注入後2分、30分、1, 4, 12, 22, 72時間の各時間に培地4本ずつピペットで管底の薬液をできるだけ完全に吸い出した。さらに72時間目に全培地についても一回排液しておいてそのまま3週間培養した。阻止帯の高さは各時間順に0.9, 2.8, 3.6, 4.7, 5.5, 5.5, 5.2 cm となつた(図6)。すなわちINH液の培地内における拡散は割合に速やかで、12時

Fig. 6. Connection between the Length of Inhibition Zone and the Contact Time of INH with Media BCG inoculum; 0.05 mg. After 2 days' incubation, 0.5 ml of 1 γ /ml INH solution was instilled into the bottom of 3% Ogawa media. Reading; after 3 weeks' incubation



間以後に薬液を捨てても、もう阻止帯には影響はみられず、12時間以内に拡散された薬剤の菌発育阻止力が阻止帯の高さを決定している。

総括考察

われわれは菌量を少なく接種すれば少ないほど阻止帯は長くなる傾向を認めたが、この点では小川⁹⁾、工藤⁵⁾も大体同様の意味のことを報告している。したがって薬剤濃度測定として小川⁹⁾は $H_{37}Rv$ $10^{-2}mg$ (0.1 cc), Schmiedel⁸⁾は $H_{37}Rv$ 0.05 mg/cc を 2~3 ユーゼ, Grosset^ら⁹⁾は $H_{37}Ra$ 0.005 mg (0.2 cc) と菌量を決めているが、接種菌量が阻止帯に影響する因子である以上当然と思われる。

次に接種菌の種類によつて阻止帯が異なることは菌種による薬剤感受性の相違からみても容易に想像されるが、BCG と $H_{37}Rv$ とでは同一の阻止帯を示した。薬剤濃度測定に一般に $H_{37}Rv$ を使用しているようであるが、われわれは感染の危険性からみても BCG の使用をすすめたいと思う。しかし Grosset^ら⁹⁾は BCG と $H_{37}Ra$ を使用し、自然耐性菌が少ない点で $H_{37}Ra$ を推奨している。(われわれは $H_{37}Ra$ の使用経験がないためこの点はさらに検討してみたいと思つている)

BCG 菌液の保存可能期間は菌液の調製に滅菌蒸留水のみを使用すれば室温(冬期)でも 10 日間は保存可能であることを認めた。しかし 1% NaOH で稀釈調製した菌液は調製後 2 時間ですでに使用不能であつた。このことは INH 液でも同様であつて蒸留水のみで処理したものは 2 カ月間の室温保存(冬期)でも使用可能であるが、1% NaOH の混入した INH 液は 1 時間室温保存(夏期, 31°C)ですでに阻止帯に影響を認めた。したがって雑菌防止のために NaOH を混入する場合は、菌液 INH 液いずれについても阻止帯に対する影響を考慮してできるだけ早く使用するべきである。

INH 液を培地内に注入後 12 時間以上経過すれば液を捨てても阻止帯の高さに影響はなかつた。Grosset^ら⁹⁾も 7 時間培地と接触すれば阻止帯は一定の高さになることを認めており、培地内で割合に短時間(12 時間以内)に拡散された薬剤の濃度で阻止帯の高さは決定されている。この成績と前報⁷⁾で報告した菌接種から薬剤注入までの期間が長ければ阻止帯は短くなる実験結果と考え合わせて、阻止帯の高さは注入薬剤の拡散速度と接種菌の

繁殖力(生活力)との 2 つの因子の組合せによつて決定されるものと考えられる。

結 語

(1) 直立拡散法における接種菌および注入薬剤に関する検討を行なつた。

(2) 接種菌量は阻止帯に影響する因子の一つであり、菌量が少ないほど阻止帯は長くなる傾向がある。

(3) E. B. と INH に対する 5 種類の抗酸菌の示す阻止帯はそれぞれ異なり、測定薬剤によつておのおのことも適当な菌種が存在する。すなわち E. B. には M. Phlei, INH には BCG がもつとも低濃度まで測定可能でありかつ阻止帯の傾斜がゆるかつた。しかし BCG と $H_{37}Rv$ の INH に対する阻止帯は一致した。

(4) 滅菌蒸留水で調製した BCG 菌液は冬期室温保存で 10 日間, INH 液は 2 カ月間保存可能であるが、1% NaOH で処理したものは BCG 菌液では 2 時間室温(冬期)保存で、INH 液は 1 時間室温(夏期)保存ですでに使用不能であつた。

(5) INH 液を培地内に注入後 12 時間以上経過すれば注入薬剤を捨てても阻止帯は影響を受けない。すなわち阻止帯の高さは注入薬剤の拡散速度と接種菌の繁殖力との組合せで割合に早期に決定される。

本論文の要旨の一部は第 38 回結核病学会総会(昭和 38. 4) [結核 38 : 8・9, 374] で報告した。

文 献

- 1) 楊維垣 他 : 結核, 40 : 6, 207, 1965.
- 2) 馬場治賢 他 : 日本胸部臨床, 23 : 12, 862, 1964.
- 3) 小川政敏 : 日結, 16 : 6, 417, 1957.
- 4) M. Ogawa : A. R. J. A. T., 3 : 117, 1958.
- 5) 工藤祐是 : 第 38 回結核病学会総会演説(昭 38. 4), 結核 38 : 8・9, 374, 1963.
- 6) A. Schmiedel : Beitr. Klin. Tbk., 112 : 475, 1954.
- 7) A. Schmiedel : Z. Tbk., 112 : 1・2, 48, 1958.
- 8) A. Schmiedel : Beitr. Klin. Tbk., 119 : 206, 1958.
- 9) J. Grosset et G. Canetti : Rev. Tbc. Pneum., 24 : 5・6, 633, 1960.