

Cycloserine の耐性検査と結核菌の発育に 適する培地の pH 域

田 村 昌 敏・高 野 了

国 立 新 潟 療 養 所

受付 昭和 41 年 6 月 15 日

SUITABLE pH REGION FOR RESISTANCE TEST OF CYCLOSERINE AND FOR THE GROWTH OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Masatoshi TAMURA and Satoshi TAKANO

(Received for publication June 15, 1966)

In the resistance test on cycloserine (CS), the suitable pH of the condense water of 1% Ogawa egg media and of the basal medium of Kirchner semi-liquid agar media is 6.8, as it was already researched by us. In order to determine the suitable pH region for resistance media to CS, five pH grades (6.4~7.4) were adopted with 6.8 at the center, and the influence of media on the growth of *M. tuberculosis* was observed.

1% Ogawa egg media and Kirchner semi-liquid agar media were used. It was proved by a preparatory test that pH of the condense water of 1% Ogawa egg media became 6.4, 6.6, 6.8, 7.0 and 7.2 when basal media were adjusted to 3.8, 5.0, 5.6, 6.0 and 6.4 with HCl and NaOH and egg was added to each of them. Then CS was added to each of them so that the concentration of CS may become 0, 10, 20, 30 and 50 mcg/ml. They were mixed sufficiently, and dispensed into test tubes in 5 ml each. After the adjustment of pH of the basal medium of Kirchner semi-liquid agar media to 6.4, 6.6, 6.8, 7.0 and 7.2 with HCl and NaOH, they were sterilized and albumin (Eiken) was added at the rate of 10% to each of them. The pH of the media was not influenced by this addition of albumin. Furthermore, CS was added to each of them so that its concentration may become 0, 10, 20, 30 and 50 mcg/ml, and mixed thoroughly. They were dispensed into test tubes in 5 ml each. Prior to use, Kirchner semi-liquid agar media were kept in an incubator at 37°C for 24 hours to confirm sterility.

The following 8 strains were used for the studies :

H₃₇Rv, Aoyama-B, 3 strains isolated from sputa of pulmonary tuberculosis patients never treated with antituberculous drugs, 1 strain from those never treated with CS but treated with other antituberculous drugs and 2 strains from those treated with CS and other antituberculous drugs.

From the 3 weeks old cultures of these strains on 1% Ogawa egg media emulsions were made in a concentration of approximately 1 mg/ml employing electric photometer and were diluted 10 times, respectively. The 0.1 ml each of the emulsions was inoculated into the media. Incubation period was 6 weeks at 37°C, and the growth states of the colonies were observed.

Generally, the growth of the strains isolated from sputa of pulmonary tuberculosis patient are more apt to be influenced by the pH of media than that of H₃₇Rv. Particularly, the suitable

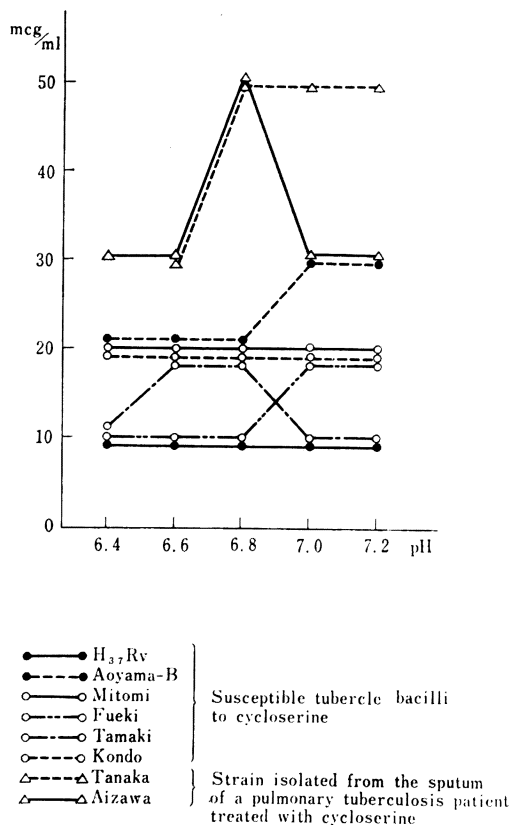
* From Niigata National Sanatorium, Akasakacho, Kashiwazaki City, Niigata Prefecture, Japan.

pH region for the growth of the strains isolated from sputa of pulmonary tuberculosis patients treated with antituberculous drugs is restricted. *M. tuberculosis* isolated from the sputa of pulmonary tuberculosis patients grows well in the following conditions. The pH range favorable for the growth is 6.6~7.0 in 1% Ogawa egg media and 6.8~7.0 in Kirchner semi-liquid agar media.

In 3 weeks old cultures, the minimal inhibitory concentration of CS to the susceptible strain of *M. tuberculosis* was 10~20 mcg/ml both in 1% Ogawa egg media with condense water of pH 6.8, and in Kirchner semi-liquid agar media with basal fluid of the same pH.

既報の実験¹⁾によつて Cycloserine (以下 CS と略)の耐性検査に用いる培地の pH は、1% 小川培地 (以下 1% 小川と略) においては凝固水の、また Kirchner 半流動培地 (以下 K 半流動と略) にあつては基汁の pH 6.8 が適当であることを知つた。今回は CS の耐性培地に適する pH 域を知るために、兩種培地の pH を 6.8 を中心として小刻みに調製して実験を行ない、知見を得たのでその成績を報告し、あわせて結核菌の発育に及ぼす培地 pH の影響について考察を試みたいと思う。

Fig. 1. Minimal Inhibitory Concentration of Cycloserine on 1% Ogawa Egg Media to *Mycobacterium Tuberculosis* after 3 Weeks' Cultivation



実験の方法

1) 使用培地

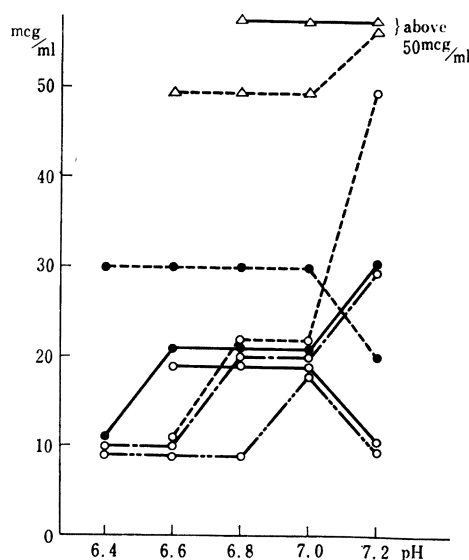
(a) 1% 小川培地

予備実験によつて原液を HCl および NaOH を用いて pH がそれぞれ 3.8, 5.0, 6.0, 6.4 になるように修正し、これに全卵を加えて調製すると、出来上がった培地の凝固水の pH はそれぞれ 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2 になることを知つた。そこで HCl および NaOH を用いて出来上がった培地の pH がそれぞれ 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2 になるように原液を修正し、さらに CS の濃度がそれぞれ 0, 10, 20, 30, 50 mcg/ml になるように加えて十分混和した後、中試験管に 5 ml ずつ分注して調製した。

(b) Kirchner 半流動培地

HCl および NaOH を用いて基汁の pH をそれぞれ

Fig. 2. Minimal Inhibitory Concentration of Cycloserine in Kirchner Semi-liquid Agar Media to *Mycobacterium Tuberculosis* after 3 Weeks' Cultivation



Notes: The same to Fig. 1.

6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2 に修正減菌後, アルブミン(栄研)を10%の割合に加えた。このように10%の割合にアルブミンを加えても各培地のpHには変動は認められない。これにCSの濃度がそれぞれ0, 10, 20,

30, 50mcg/ml になるように加えて十分混和した後, 中試験管に5mlずつ分注調製し, さらに37°C 孵卵器内に24時間おさめて雑菌混入のないことを確かめたものを使用した。

Table 1. Influence of pH of 1% Ogawa Egg Media on the Growth Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Culture week	pH of condense water				
		6.4	6.6	6.8	7.0	7.2
H ₃₇ Rv	II	15	50	60	60	50
	III	++	++	++	++	++
	IV	++	+++	+++	+++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+++
Aoyama-B	II	+++	++	++	++	++
	III	+++	+++	+++	+++	+++
	IV	+++	+++	+++	+++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+++
Mitomi*	II	—	—	—	—	—
	III	++	+++	+++	+++	+++
	IV	+++	+++	+++	+++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+++
Fueki*	II	—	—	—	—	—
	III	120	++	++	++	+++
	IV	++	++	++	+++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+++
Tamaki*	II	—	—	—	—	—
	III	++	++	++	++	60
	IV	++	++	+++	+++	+++
	V	++	+++	+++	+++	+++
Kondo**	II	—	—	—	—	—
	III	++	++	++	++	++
	IV	+++	+++	+++	+++	++
	V	+++	+++	+++	+++	+++
Tanaka***	II	—	—	—	—	—
	III	—	80	++	71	60
	IV	130	++	+++	++	130
	V	++	++	+++	++	++
Aizawa***	II	—	—	—	—	—
	III	120	90	110	++	50
	IV	++	++	+++	+++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+++

* A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with antituberculous drugs. (X)

** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with cycloserine but treated with other antituberculous drugs. (Y)

*** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient treated with cycloserine and other antituberculous drugs. (Z)

Table 2. Influence of pH of Kirchner Semi-liquid Agar Media on Growth of Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Culture week	pH of basal medium				
		6.4	6.6	6.8	7.0	7.2
H ₃₇ Rv	II	—	40	+	+	—
	III	+	+	++	+++	+
	IV	+	++	+++	+++	+++
	V	++	+++	+++	+++	+++
Aoyama-B	II	+	+++	+++	++	+
	III	+++	+++	+++	+++	++
	IV	+++	+++	+++	+++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+++
Mitomi*	II	—	5	30	+	+
	III	—	++	++	++	++
	IV	5	++	+++	++	+++
	V	+	++	+++	+++	+++
Fueki*	II	—	—	—	—	—
	III	30	+	+	+	+
	IV	50	+	++	++	++
	V	50	+	+++	+++	+++
Tamaki*	II	—	—	++	++	++
	III	30	+	++	++	++
	IV	40	+	++	+++	+++
	V	50	+	+++	+++	+++
Kondo**	II	—	—	—	—	—
	III	—	+	+	+	30
	IV	—	+	+	++	+
	V	25	+	+	++	+
Tanaka***	II	—	—	—	—	—
	III	—	+	+	+	+
	IV	+	+	++	++	++
	V	+	++	++	++	++
Aizawa***	II	—	—	+	+	+
	III	—	—	++	+++	++
	IV	—	+	+++	+++	+++
	V	+	+	+++	+++	+++

* A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with antituberculous drugs. (X)

** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with cycloserine but treated with other antituberculous drugs. (Y)

*** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient treated with cycloserine and other antituberculous drugs. (Z)

2) 供試菌株ならびに判定

人型結核菌 H₃₇Rv 株, 青山-B 株, 抗結核剤で未治療の肺結核患者の喀痰より分離した(以下Xと表わす)株 3, 抗結核剤で既治療であるが CS では未治療の肺結核患者の喀痰より分離した(以下Yと表わす)株 1 および CS と他の抗結核剤で既治療の肺結核患者の喀痰より分離した(以下Zと表わす)株 2 の計 8 菌株を実験に用いた。各菌株は 1% 小川に植え継いで 3 週間培養した後, 比濁法によつて 10⁻² 倍希釈して均等化し, その菌液の 0.1 ml をそれぞれの培地に接種して, 37°C 孵卵器におさめて 2 週より 6 週まで毎週観察し, 集落の発生状況ならびに程度を記載して成績を判定比較した。

実験の成績

1) 結核菌の発育に及ぼす培地 pH の影響

(a) 1% 小川培地

表 1 に示すごとく, 2 週間培養においては集落の発育が出揃っていない。3 週間培養における pH 6.4 では集落の発育が一のものは Z 株に 1, + のものは X 株 Z 株各 1, ++ は H₃₇Rv 株, X 株 2 および Y 株, 卍は青山-B 株。pH 6.6 では + は Z 株 2, ++ は H₃₇Rv 株, X 株 2 および Y 株, 卍は X 株 1, 卍は青山-B 株。pH 6.8 では + は Z 株 1, ++ は H₃₇Rv 株と X 株 2, Y 株, Z 株 1, 卍は X 株 1, 卍は青山-B 株。pH 7.0 では + は Z 株 1, ++ は H₃₇Rv 株, X 株 2, Y 株, Z 株 1, 卍は

Table 3. Influence of pH of 1% Ogawa Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Cycloserine to Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Culture week	pH of condense water																								
		6.4					6.6					6.8					7.0					7.2				
		mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml				
		0	10	20	30	50	0	10	20	30	50	0	10	20	30	50	0	10	20	30	50	0	10	20	30	50
H ₃₇ Rv	III	++	—	—	—	—	++	—	—	—	—	++	—	—	—	—	++	—	—	—	—	++	—	—	—	—
	IV	++	2	—	—	—	+++	5	—	—	—	+++	30	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	30	—	—
	V	+++	70	—	—	—	+++	10	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	50	—	—	+++	+++	80	—	—
Aoyama-B	III	+++	+++	—	—	—	+++	+++	—	—	—	+++	+++	—	—	—	+++	+++	41	—	—	+++	+++	++	—	—
	IV	+++	+++	38	—	—	+++	+++	60	—	—	+++	+++	80	—	—	+++	+++	+	10	—	+++	+++	+++	++	—
	V	+++	+++	43	6	—	+++	+++	+	7	—	+++	+++	+	10	—	+++	+++	+	+	—	+++	+++	+++	+++	—
Mitomi*	III	++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	—	—	—
	IV	+++	+	40	—	—	+++	+	110	—	—	+++	+++	80	—	—	+++	+++	+	—	—	+++	+++	+++	—	—
	V	+++	+	+	40	—	+++	+	+	60	—	+++	+++	+	53	—	+++	+++	+++	+	—	+++	+++	+++	+++	—
Fueki*	III	120	—	—	—	—	++	—	—	—	—	++	—	—	—	—	++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—
	IV	++	76	—	—	—	++	60	—	—	—	++	80	—	—	—	+++	+++	+	—	—	+++	+++	+	80	—
	V	+++	+	50	—	—	+++	+	60	—	—	+++	+	68	—	—	+++	+++	+++	+	—	+++	+++	+++	+	—
Tamaki*	III	++	—	—	—	—	++	20	—	—	—	++	20	—	—	—	++	—	—	—	—	60	—	—	—	—
	IV	++	48	—	—	—	++	45	—	—	—	+++	40	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	—	—	—
	V	++	63	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	130	—	—	+++	+++	+	—	—
Kondo**	III	++	10	—	—	—	++	90	—	—	—	++	70	—	—	—	++	+	—	—	—	++	+	—	—	—
	IV	+++	39	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	—	—	—	+++	+++	80	—	—
	V	+++	+	—	—	—	+++	+	—	—	—	+++	+++	20	—	—	+++	+++	30	—	—	+++	+++	+	—	—
Tanaka***	III	—	—	—	—	—	80	75	78	—	—	++	+	130	90	—	71	80	95	70	—	60	50	50	50	—
	IV	130	110	90	70	—	++	+	+	10	1	+++	+++	+	+	—	++	+	+	+	30	130	120	120	150	20
	V	++	+	+	5	—	++	+	+	20	3	+++	+++	+	+	20	++	+	+	+	60	++	+	+	+	60
Aizawa***	III	120	90	50	—	—	90	90	80	—	—	110	100	95	80	—	++	+	130	—	—	50	50	40	—	—
	IV	++	+	+	25	—	++	+	+	30	3	+++	+++	+++	35	5	+++	+++	+++	+++	80	+++	+++	+++	+++	+
	V	+++	+++	+++	80	2	+++	+++	+++	90	35	+++	+++	+++	180	40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

* A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with antituberculous drugs. (X)

** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient, untreated with cycloserine but treated with other antituberculous drugs. (Y)

*** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient treated with cycloserine and other antituberculous drugs. (Z)

X株1, 冊は青山-B株。pH 7.2 では+は X株1, Z株2, 冊は H₃₇Rv 株, Y株, 冊はX株2, 冊は青山-B株であつた。すなわち pH 6.8 を中心として 6.6~7.0 で菌の発育は良好であるが, それより酸性側ないしアルカリ性側に傾くと, ことに分離菌株の発育が悪くなる傾向が現われてくる。

(b) Kirchner 半流動培地

表2に示すごとく, この培地においても2週間培養では集落の発育が出揃っていない。3週間培養では集落の発育が一のもの X株1, Y株, Z株2, +は H₃₇Rv 株, X株2, 冊は青山-B株。pH 6.6 では-は Z株1, +は H₃₇Rv 株, X株2, Y株, Z株1, 冊は X株1, 冊は青山-B株。pH 6.8 では+は X株1, Y株,

Z株1, 冊は H₃₇Rv 株, X株2, Z株1, 冊は青山-B株。pH 7.0 では+は X株1, Y株, Z株1, 冊は X株2, 冊は H₃₇Rv 株, 青山-B株, Z株1。pH 7.2 では+は H₃₇Rv 株, X株1, Y株, Z株1, 冊は青山-B株, X株2, Z株1であつた。すなわち pH 6.8, 7.0 において各菌株とも発育がよく, 次が7.2, 6.6, 6.4 の順であつて, pH が 6.8~7.0 より酸性側ないしアルカリ性側に傾くに従つて菌の発育が悪くなる傾向があるが, そのうちでも既治療分離株は酸性側における発育が悪い。

2) CS 耐性培地の pH が結核菌最低発育阻止濃度に及ぼす影響

(a) 1% 小川培地

Table 4. Influence of pH of Kirchner Semi-liquid Agar Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Cycloserine to Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Culture week	pH of basal medium														
		6.4					6.6					6.8				
		mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml				
		0	10	20	30	50	0	10	20	30	50	0	10	20	30	50
H ₃₇ Rv	III	+	-	-	-	-	+	5	-	-	-	++	5	-	-	-
	IV	+	-	-	-	-	++	10	-	-	-	+++	13	-	-	-
	V	++	-	-	-	-	+++	+	-	-	-	+++	+	-	-	-
Aoyama-B	III	+++	+	40	-	-	+++	+	40	-	-	+++	+	30	-	-
	IV	+++	+	+	-	-	+++	+	+	-	-	+++	+	+	-	-
	V	+++	+	+	-	-	+++	+	+	-	-	+++	+	+	-	-
Mitomi*	III	-	-	-	-	-	++	40	-	-	-	++	+	-	-	-
	IV	5	4	-	-	-	++	+	-	-	-	++	+	+	-	-
	V	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-	++	+	30	-	-
Fueki*	III	30	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	40	-	-
	IV	50	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	13	-	-	-
	V	50	-	-	-	-	+	10	-	-	-	+++	20	-	-	-
Tamaki*	III	30	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	20	-	-	-
	IV	40	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-
	V	50	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
Kondo**	III	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	30	-	-	-
	IV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	30	-	-	-
	V	25	+	-	-	-	+	20	-	-	-	+	40	-	-	-
Tanaka***	III	-	-	-	-	-	+	+	+	40	-	+	+	+	30	-
	IV	+	40	30	30	-	+	+	+	60	-	++	++	++	+	50
	V	+	40	30	30	-	++	++	++	+	50	++	++	++	+	+
Aizawa***	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	40
	IV	-	-	-	-	-	+	+	20	+	-	+++	+++	+++	+++	+
	V	+	+	-	-	-	+	+	20	+	-	+++	+++	+++	+++	+

* A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with antituberculous drugs. (X)

** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with cycloserine but treated with other antituberculous drugs. (Y)

*** A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient treated with cycloserine and other antituberculous drugs. (Z)

表3, 図1に示すごとく, 1% 小川3週間培養におけるCSの結核菌最低発育阻止濃度(以下MICと略)は, pH 6.4において10 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株2, 20 mcg/mlは青山-B株, X株1, Y株であつて, Z株のうち1株は30 mcg/ml, 3週で集落の発育のなかつた1株は4週間培養で50 mcg/mlであつた。pH 6.6において10 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株1, 20 mcg/mlは青山-B株, X株2, Y株, 30 mcg/mlはZ株2。pH 6.8において10 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株1, 20 mcg/mlは青山-B株, X株2, Y株, 50 mcg/mlはZ株2。pH 7.0において10 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株1, 20 mcg/mlはX株2, Y株, 30 mcg/mlは青山-B株, Z株1, 50 mcg/mlはZ株1。pH 7.2において10 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株1, 20 mcg/mlはX株2, Y株, 30 mcg/mlは青山-B株, Z株1, 50 mcg/mlはZ株1であつた。すなわち3週間培養におけるCS未治療株のCSに対するMICはpH 6.8~6.6において10~20 mcg/mlであるが, 6.4ではやや低く, 7.0, 7.2ではやや高く表現される傾向がうかがわれる。しかして4週間培養においてはその傾向が一段と強く現われてくると同時に, 集落の発育にバラツキも現われはじめる。

(b) Kirchner 半流動培地

表4, 図2に示すごとく, K半流動3週間培養におけるCSのMICは, pH 6.4において10 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株2, 30 mcg/mlは青山-B株であつて, 3週に集落の発育をみなかつたX株1は4週間培養で, またY株とZ株1とは5週間培養で20 mcg/mlであつた。pH 6.6において10 mcg/mlはX株2, Y株, 20 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株1, 30 mcg/mlは青山-B株。50 mcg/mlはZ株1であつて, 3週に集落の発育をみなかつたZ株1は4週間培養で50 mcg/mlであるが, 成績にバラツキが認められる。pH 6.8において10 mcg/mlはX株1, 20 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株2, Y株, 30 mcg/mlは青山-B株, Z株2のうち1株は50 mcg/mlで発育が阻止されたが, 他の1株は集落の発育をみた。pH 7.0において20 mcg/mlはH₃₇Rv株, X株3, Y株30 mcg/mlは青山-B株, Z株2のうち1株は50 mcg/mlで発育阻止され, 他の1株は発育をみた。pH 7.2において10 mcg/mlはX株2, 20 mcg/mlは青山-B株, 30 mcg/mlはH₃₇Rv株, 50 mcg/mlはX株1, Y株であつたが, Y株にはバラツキが認められる。Z株2はいずれも50 mcg/mlでは発育は阻止されなかつた。すなわち3週間培養における供試菌株のCSに対するMICはpH 6.8~7.0においてCS未使用株では10~20 mcg/mlであるが, これよりpHが酸性側に傾くに従つて, 集落の発育は悪くなりバラツキが出てきてMICは低くなつてくる。またアルカリ性側に傾くと集落の発育にバラツキが現われ, MICは高くな

つてくる。しかしてこの培地においてもこれらの傾向は, 4週間培養においていつそう強く現われてくる。

考 案

CSは化学的には弱アルカリ性の場合には安定であるが, 酸性溶液中では不安定である²⁾といわれている一方, 結核菌の発育は培地のpHが弱酸性の場合によい³⁾といわれている。この2点はCSのMICに相反する影響を与える因子のように考えられるので, 1%小川とK半流動とを用いて実験を行なつて, CSのMICの測定には1%小川においては凝固水の, またK半流動においては基汁のpHを6.8に調製した場合が, 最も適当であるとさきに報告した。そのさい培地のpHが結核菌の発育に及ぼす影響についても同時に観察したが, 肺結核患者の喀痰より分離した結核菌の発育は培地のpHに敏感であつて, 1%小川にあつては凝固水のpH 6.8よりわずかに酸性に傾いた側において, またK半流動にあつては基汁のpHがむしろわずかにアルカリ性に傾いた側において, 影響の少ないことを認めた。

CS耐性培地のpHが結核菌のMICに及ぼす影響に関する諸家の論説^{4)~6)}はさきの報告で述べたのでここでは再記しないこととするが, その後Iwaiら⁷⁾, 内藤ら⁸⁾は常法で作製したKirchner液体培地で血清を高濃度に加えたときに結核菌の発育が悪いのは, 牛血清のpHが8.35であるからpHがアルカリ性に傾くためであつて, 結核菌の発育は培地のpHと密接な関連があり, 90%血清加Kirchner液体培地のpHは6.70~7.00の間が適しているといっている。また岡⁹⁾はCSの抗菌力は培地の組成, 保存などでかなり不安定と考えねばならぬといい, 1) 1%小川とSteenken-Smith培地を間接法で比較し, Steenken-Smith培地ではCS未使用株は大方25 mcg/mlで発育が阻止された(22/23)が1%小川ではバラツキが多かつた。2) また間接法で1%小川と0.1%K半流動と比較し, K半流動ではCS未使用株は大方10 mcg/mlで発育が阻止されたが, 1%小川ではバラツキが多く判定に迷う場合があると述べている。私たちはCSの耐性培地の種類¹⁰⁾, 保存法ならびに保存期間¹¹⁾および接種菌量ならびに培養期間¹²⁾が, CSのMICに及ぼす影響についてはすでに報告した。

さて既報の実験に用いた培地のpHの間隔は, 6.8を中心として0.6ずつでありに広きにすぎた感があるので, 今回は実験培地のpHの間隔を6.8を中心に0.2ずつとして, 6.4~7.2の間を5段階に分けて結核菌の発育ならびにCSのMICに及ぼす影響を観察し, 結核菌とくに肺結核患者の喀痰より分離した菌株の発育およびCSの耐性検査に適する培地のpH域の測知につとめ, 上述のごとき成績を得た。

すなわち1%小川では実験の範囲内においてはH₃₇Rv

株と青山-B 株との発育はなんら pH の影響を受けなかった。しかし分離菌株は 6.8 を中心として 6.6, 7.0 では同程度に発育は良好であるが, 6.4 および 7.2 においては発育が悪くなってくる。また K 半流動も実験の範囲内においては H₃₇Rv 株と青山-B 株とは発育に pH の影響を受けないが, 分離菌株は 6.8~7.0 において発育がよく, 次が 7.2, 6.6, 6.4 の順であつた。

このように標準株の発育は培地の pH の影響を受けることが少なく, したがつて培地の pH 域は広いのであるが, 分離菌株の発育は培地の pH の影響を受けやすい。その中でも抗結核剤による既治療株は鋭敏であつて, 発育に適する培地の pH 域は狭い。この点に関しては既報において述べたごとく, 化学療法による菌の生活力の減弱に関連があるのであろう。

既報で CS 感性結核菌に対する pH 6.8 の 1% 小川 4 週間培養における MIC は 20~30 mcg/ml であると述べた。しかし新しい結核菌検査指針¹³⁾に従つて 3 週間培養で判定すれば, 10~20 mcg/ml であつて, 凝固水の pH 6.8~6.6 においては MIC はほぼ等しく, 6.4 になると MIC は低く, 7.0 では MIC は高く表現され, 成績にバラツキが現われはじめてくる。

また pH 6.8 の K 半流動における CS 感性菌に対する MIC も, 4 週間培養では 20~30 mcg/ml と述べたが, 新しい指針に従つて 3 週間培養で判定すれば, 不完全発育阻止の青山-B 株を除き, 10~20 mcg/ml であつた。なおこの培地においては基汁の pH 6.8~7.0 において MIC はほぼ等しいが, pH が酸性側に傾くに従つて MIC は低くなり, 菌の発育は次第に悪くなる。なおアルカリ側に傾くと MIC は高くなるばかりでなく, バラツキが現われてくる。

すなわち今回の実験においても, CS の結核菌に対する抗菌力は, 両培地とも pH が酸性側において強く, アルカリ性側において弱く表現される傾向が認められた。

上述のごとく 1% 小川も K 半流動もともに 4 週間培養ではバラツキが現われたり, MIC が高く表現される場合があるから, 耐性検査には 3 週間培養の成績をもつて判定するのが適當のように考えられる。

結 論

H₃₇Rv 株, 青山-B 株, 抗結核剤で未治療の肺結核患者の喀痰より分離した 3 株, 抗結核剤で既治療であるが CS では未治療の肺結核患者の喀痰より分離した 1 株および CS と他の抗結核剤で既治療の肺結核患者の喀痰より分離した 2 株の計 8 菌株を用いて実験を行なつた。1% 小川培地においては凝固水の, また Kirchner 半流

動培地においては基汁の pH をそれぞれ 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2 になるように, HCl と NaOH とを用いて修正調製して, 結核菌の発育および CS の最低発育阻止濃度に及ぼす影響について実験を行ない, 次の成績を得た。

1) 標準結核菌の発育は, 1% 小川培地においては凝固水の, また Kirchner 半流動培地においては基汁の pH 6.4~7.2 の範囲内では同程度に良好であるが, 一般に肺結核患者の喀痰より分離した結核菌は, 培地の pH によつて発育が影響を受けやすく, 1% 小川培地にあつては凝固水の pH 6.8 を中心として 6.6~7.0 において, また Kirchner 半流動培地にあつては基汁の pH 6.8~7.0 において発育が良好である。

2) CS の耐性検査に適する培地の pH 域は, 1% 小川培地においては凝固水の pH 6.8~6.6 であつて, Kirchner 半流動培地においては基汁の pH 6.8~7.0 であつた。

3) CS 感性結核菌に対する CS の最低発育阻止濃度は, 凝固水の pH 6.8 の 1% 小川培地も, 基汁の pH 6.8 の Kirchner 半流動培地も, 3 週間培養で判定すれば 10~20 mcg/ml である。

本論文の要旨は昭和 41 年 6 月 7 日第 41 回日本結核病学会において報告した。

稿を終るに当たりご校閲を賜つた所長江川三二博士に深謝するとともに, 本研究は厚生省一般研究費と塩野義製薬株式会社より Cycloserine の純末の供与を受けて行なわれたことを記して謝意を表明する。

文 献

- 1) 田村昌敏・高野了: 結核, 40: 213, 1965.
- 2) 工藤祐是・吉川澄子: 結核, 38: 73, 1963.
- 3) 小川辰次: 結核菌検索の基礎と応用, 1951.
- 4) William Steenken・Emanuel Wolinsky: Am. Rev. Tuberc., 72: 539, 1955.
- 5) Haruo Nishimura・Masafumi Shimohira: Annual Report of Shionogi Research Laboratory, No. 7, 435: 1957.
- 6) 五味二郎 他: 最新医学, 18: 1644, 1963.
- 7) K. Iwai・S. Tsukuma et al.: Acta Tuberc. Jap., 14: 65, 1965.
- 8) 内藤益一 他: 日本胸部臨床, 25: 231, 1966.
- 9) 岡捨己: 日本胸部臨床, 24: 430, 1965.
- 10) 田村昌敏・井貝宗吉・高野了: 医療, 20: 71, 1966.
- 11) 田村昌敏・高野了: 医療, 20: 573, 1966.
- 12) 田村昌敏・高野了: 医療, 20: 948, 1966.
- 13) 厚生省監修: 結核菌検査指針, 1964.