

## Rapid Grower Mycobacterium H-7 株の 抗結核薬に対する感受性

石 黒 早 苗

国立神奈川療養所

受付 昭和 42 年 7 月 1 日

### STUDIES ON SENSITIVITY OF A RAPID GROWER MYCOBACTERIUM STRAIN H-7 FOR ANTITUBERCULOUS DRUGS\*

Sanae ISHIGURO

(Received for publication July 1, 1967)

Studies were made about whether it is possible or not to make a rapid measurement of serum drug concentration of various antituberculous drugs by using a rapid grower mycobacterium H-7 strain.

By using Ogawa's 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  egg medium, the minimum inhibitory concentrations of the test drugs after five days' incubation at 37°C were obtained as follows: SM: 5 mcg/ml, PAS: > 10 mcg/ml, INH, IHMS, INHG: 0.25 mcg/ml, CS: 25 mcg/ml, TH: > 100 mcg/ml.

No difference in antibacterial activities was observed among INH, IHMS and INHG.

When examinations were made after 14 days' incubation at 37°C, the antibacterial activities of SM, INH and its derivatives decreased slightly showing a few colonies at the one order higher level.

From the results obtained, it can be assumed that the Mycobacterium H-7 strain is available as the test organism for the rapid measurement of serum concentration of SM, INH, INHG, CS, especially of INH and its derivatives.

#### 目 的

さきに金沢裕らは<sup>1)2)</sup>、新たに分離した INH 高度感受性の非病原性抗酸菌 Rapid Grower Mycobacterium H-7 株を検定菌として、0.1 mcg/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 濃度測定法を発表したが、たまたま本菌を入手し、各種抗結核薬について薬剤感受性を測定したので報告する。

#### 実 験 方 法

表 1 に示すように実験を行なった。

培地: 1% 小川培地で SM, CS, TH については 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 mcg/ml に, PAS

については 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.063, 0.031 mcg/ml に, INH については 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.063, 0.031, 0.016 mcg/ml に薬剤をそれぞれ添加した培地を作製し, それぞれをその表示濃度とした。INH 誘導体 (IHMS および INHG) については INH の量に換算した量を添加した。別にこれらの薬剤を加えない培地を対照とした。

使用菌株および培養方法: Rapid Grower M. H-7 株を滅菌濾紙で吸湿し, 直示天秤で秤量し, 水晶球の入った滅菌摩砕コルベンにとり, 手振法で均等化し, 蒸留水を加え, 1mg/ml の菌液を作製した。ついで滅菌蒸留水を加え  $10^{-2}$  から  $10^{-7}$  まで希釈し, そのうちの  $10^{-2}$  および  $10^{-3}$  希釈菌液を上記の各希釈系列の培地 2 本に,

\* From Kanagawa National Sanatorium, Ochiai Hatano-shi, Kanagawa-ken, Japan.

Table 1. Method of Experiment

Culture medium	Ogawa's 1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> egg medium
Drugs added	mcg/ml
SM } CS } TH }	100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0
PAS	10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.063, 0.031, 0
INH } IHMS } INHG }	4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.063, 0.031, 0.016, 0
Strain used	Rapid Grower Mycobacterium H-7
Amount of inoculum	10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 0.1 ml 10 <sup>-2</sup> ~10 <sup>-7</sup> 0.1 ml—Measurement of number of viable organisms

Table 2. Antimycobacterial Activity for SM and PAS in Vitro

		10 <sup>-2</sup> 0.1 ml inoculation									
		mcg/ml									
Incubation period		100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0
SM	5 days	—	—	—	—	—	2.5	3+	4+	4+	4+
	1 week	—	—	—	—	—	2.5	3+	4+	4+	4+
	2 weeks	—	—	—	—	0.5	2.5	3+	4+	4+	4+
Incubation period		mcg/ml									
Incubation period		10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0
PAS	5 days	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	1 week	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	2 weeks	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

Number of viable organisms 17×10<sup>7</sup>/mg

Table 3. Antimycobacterial Activity for INH, IHMS and INHG in Vitro

		10 <sup>-2</sup> 0.1 ml inoculation									
		mcg/ml									
Incubation period		4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0.016	0
INH	5 days	—	—	—	—	—	27.5	2+	3+	4+	4+
	1 week	—	—	—	—	—	33	2+	4+	4+	4+
	2 weeks	—	—	—	—	—	2	33	3+	4+	4+
Incubation period		mcg/ml									
Incubation period		4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0.016	0
IHMS	5 days	—	—	—	—	—	3	51.5	2+	4+	4+
	1 week	—	—	—	—	—	9	64	2+	4+	4+
	2 weeks	—	—	—	—	—	1	9	64	2+	4+
Incubation period		mcg/ml									
Incubation period		4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0.016	0
INHG	5 days	—	—	—	—	—	1	32	2+	4+	4+
	1 week	—	—	—	—	—	4	45	2+	4+	4+
	2 weeks	—	—	—	—	—	1	5	45	2+	4+

Number of viable organisms 17×10<sup>7</sup>/mg

0.1 ml ずつ接種, 37°C の孵卵器に培養し, 5日, 1週, 2週にそれぞれ判定した。別に 10<sup>-2</sup> から 10<sup>-7</sup> までの菌液をそれぞれ 0.1 ml ずつ対照培地 2本に接種し, 生菌単位数を計測した。

実験成績

表2に示すごとく H-7 株の 10<sup>-2</sup> 希釈菌液 0.1 ml 接種における SM の最低発育阻止濃度 (以下 M.I.C.) は 5日および1週判定では 5 mcg, 2週判定では 10 mcg で1段階の上昇がみられた。PAS では最高濃度の 10 mcg に発育がみられ, M.I.C. は測定できなかった。

表3に示すごとく INH の M.I.C. は 5日および1週判定では 0.25 mcg, 2週判定では 0.5 mcg で1段階の上昇がみられた。INH の誘導体である IHMS, INHG の M.I.C. は INH 同様 5日および1週判定では 0.25 mcg, 2週判定では 5 mcg で1段階の上昇がみられた。

表4に示すごとく CS の M.I.C. は 5日, 1週, 2週

Table 4. Antimycobacterial Activity for CS and TH in Vitro

		10 <sup>-2</sup> 0.1 ml inoculation									
		mcg/ml									
Incubation period		100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0
CS	5 days	—	—	—	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	1 week	—	—	—	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	2 weeks	—	—	—	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Incubation period		mcg/ml									
Incubation period		100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0
TH	5 days	7.5	21	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	1 week	11	26	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	2 weeks	11	26	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

Number of viable organisms 17×10<sup>7</sup>/mg

Table 5. Antimycobacterial Activity for SM and PAS in Vitro

		10 <sup>-3</sup> 0.1 ml inoculation									
		mcg/ml									
Incubation period		100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0
SM	5 days	—	—	—	—	—	0.5	2+	3+	3+	3+
	1 week	—	—	—	—	—	1	2+	3+	3+	3+
	2 weeks	—	—	—	—	—	1	2+	3+	3+	3+
Incubation period		mcg/ml									
Incubation period		10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0
PAS	5 days	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
	1 week	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
	2 weeks	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

Number of viable organisms 17×10<sup>7</sup>/mg

Table 6. Antimycobacterial Activity for INH, IHMS and INHG in Vitro

		10 <sup>-3</sup> 0.1 ml inoculation									
		mcg/ml									
Incubation period	mcg/ml	4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0.016	0
		INH	5 days	—	—	—	—	—	1.5	31	2+
	1 week	—	—	—	—	—	4	58	2+	3+	3+
	2 weeks	—	—	—	—	—	4	58	2+	3+	3+
		mcg/ml									
Incubation period	mcg/ml	4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0.016	0
		IHMS	5 days	—	—	—	—	0.5	6	8.8	2+
	1 week	—	—	—	—	—	0.5	6	98.5	3+	3+
	1 weeks	—	—	—	—	—	0.5	6	98.5	3+	3+
		mcg/ml									
Incubation period	mcg/ml	4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	0.016	0
		INHG	5 days	—	—	—	—	0.5	6.5	78	2+
	1 week	—	—	—	—	—	0.5	6.5	95	3+	3+
	2 weeks	—	—	—	—	—	0.5	6.5	1+	3+	3+

Number of viable organisms 17×10<sup>7</sup>/mg

判定ではいずれも 25 mcg であつた。TH では 5 日, 1 週, 2 週判定ではともに最高濃度 100 mcg まで菌の発育がみられ, M. I. C. は測定できなかつた。

表 5, 6 に示すごとく 10<sup>-3</sup> 接種では SM の M. I. C. は 5 mcg, INH およびその誘導体の M. I. C. は 0.25 mcg で, とともに 10<sup>-2</sup> 接種における判定期間延長による M. I. C. の上昇はみられなかつた。

表 7 に示すごとく CS では 10<sup>-2</sup> 接種と同様 25 mcg であり, PAS (表 5), TH では 10<sup>-2</sup> 接種と同様最高濃度段階まで菌の発育がみられた。

考 察

金沢裕<sup>1-4)</sup>らは迅速発育型の非病原性抗酸菌を検定菌として, 2 日以内に測定しうる薄層寒天平板法により, 各種抗結核薬の血中濃度測定法を発表したが, たまたま Rapid Grower M. H-7 株を入手し, 1% 小川培地を用い, 5 日判定で SM, PAS, INH およびその誘導体, CS, TH について薬剤感受性を測定したので比較検討してみた。

SM 感受性については, 金沢<sup>1)</sup>は 3% 小川培地を用い H-7 株に対する抗菌力は 5 mcg/ml であることを認めている。本実験の成績においても 5 mcg/ml であつた。

PAS については, 金沢<sup>1)</sup>は検索した範囲では迅速発育型の雑菌性抗酸菌中には, PAS に高度感受性を有する菌種はなかつたことを認めている。本実験においては H-7 株のみを使用したのであるが, 2 倍数希釈系列

Table 7. Antimycobacterial Activity for CS and TH in Vitro

		10 <sup>-3</sup> 0.1 ml inoculation									
		mcg/ml									
Incubation period	mcg/ml	100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0
		CS	5 days	—	—	—	2+	3+	3+	3+	3+
	1 week	—	—	—	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
	2 weeks	—	—	—	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
		mcg/ml									
Incubation period	mcg/ml	100	50	25	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0
		TH	5 days	1.5	1.7	3+	3+	3+	3+	3+	3+
	1 week	1.5	1.5	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
	2 weeks	1.5	1.5	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

Number of viable organisms 17×10<sup>7</sup>/mg

において最高濃度の 10 mcg/ml まで菌の発育が認められ M. I. C. は測定不能であつた。

INH については金沢<sup>1)</sup>は 3% 小川培地で >0.08 mcg/ml<sup>1)</sup>, 1% 小川培地で 0.1 mcg/ml<sup>2)</sup>, 血清加 Kirchner 寒天培地で 0.125 mcg/ml<sup>4)</sup>。INH 誘導体については, INH と同様であつたことを認めている<sup>2)</sup>。本実験においては 0.25 mcg/ml で, INH とその誘導体との間に抗菌力の差はなかつた。

CS については金沢<sup>1)</sup>は H-7 株, Kirchner 寒天培地を用いて >20 mcg/ml の成績を示された。今回用いた希釈系列においては 1% 小川培地で 25 mcg/ml であつた。

TH については金沢<sup>1)</sup>は H-7 株では測定不能。M. 238 株を用いて, 3% 小川培地では >20 mcg/ml<sup>1)</sup>, Kirchner 寒天培地では >5 mcg/ml, また K-9 株を用いて血清非添加 Kirchner 寒天培地では 25 mcg/ml であつたことを認めた。本実験では検定菌としては, H-7 株のみを使用したののでやはり測定不能であつた。

結 論

1% 小川培地を用い, 5 日判定により M. H-7 株の抗菌力を M. I. C. でみると, SM は 5 mcg/ml, PAS は 10 mcg/ml 以上, INH, IHMS, INHG は 0.25 mcg/ml, CS は 25 mcg/ml, TH は 100 mcg/ml 以上であつて, INH, IHMS, INHG 間に抗菌力の差は認められなかつた。

2 週判定で SM, INH, IHMS, INHG では僅少集落ではあるが, 1 段階の集落発育の, のびがみられたが, 本菌を検定菌とした SM, INH, IHMS, INHG, CS, とくに INH とその誘導体に対する迅速濃度測定が可能であり, 利用価値が考えられる。

(本論文の要旨は 69 回日本結核病学会関東地方会に

において報告した)

終りに臨み、国立神奈川療養所医務課長伊藤忠雄博士のご指導、ご校閲を深謝いたします。なお実験に種々ご援助下さいました検査室先輩諸先生に心からお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 金沢裕・倉又利夫：結核，40：108，昭 40.
- 2) 金沢裕・倉又利夫：結核，39：117，昭 39.
- 3) 金沢裕：結核，37：531，昭 37.
- 4) Kanazawa, Y. : Chemotherapie, 11 : 176, 1963.