

結核菌の寒天高層混積培養に対する 1314 TH の作用について

岡本 亨吉・照沼 毅陽

国立療養所村松晴嵐荘

受付 昭和 42 年 8 月 9 日

ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF ETHIONAMIDE
ON THE TUBERCLE BACILLI IN A SEMISOLID
DUBOS AGAR MEDIUM*

Kokichi OKAMOTO and Kiyo TERUNUMA

(Received for publication August 9, 1967)

The authors have described a method for evaluation of antimycobacterial activity of tuberculostatica and the serum from patient under treatment with them. The drug solution or the serum was superposed on an agar medium in a test tube in which tubercle bacilli were diffusely inoculated. The bacilli in the upper zone of the medium were inhibited to grow into colonies. Only the bacilli which had been suspended in a limited zone below the growth inhibitory area could grow into colonies. The latter zone with bacterial colonies appeared as a turbid disc in the transparent agar medium. The depth of the growth inhibitory zone is related to the concentration of the drug.

Streptomycin, kanamycin, viomycin, PAS, isoniazid, cycloserin, ethionamide and ethambutol were tested.

In the case of ethionamide, the pattern of the colonial disc was quite different from that in the cases of all other drugs.

The purpose of this paper is to report the specific ethionamide action observed in this way.

(1) 1314 TH solution (10~2.5 mcg/ml) which was superposed on the agar plug in a test tube made a colonial disc (5 mm thick) develop in about a week incubation in a certain depth from the surface of the medium (20~2 mm) in accordance with the drug concentration. In some more days incubation thereafter, appeared a niveau in the disc where bacterial colonies grew distinguishably larger in number and size than in the other area. As SM, PAS, INH resistant bacilli were not inhibited to grow in the top zone of the medium by SM, PAS, INH, the growth inhibition in this zone is to be attributed to the antimycobacterial activity of the drug.

(2) Mix ethionamide simultaneously with tubercle bacilli in the agar medium, so can be seen the same growth pattern as in (1) with quite a low concentration of the drug (2.5~0.15 mcg/ml). Growth inhibition by such a low concentration of a drug was considered note-worthy.

(3) The location and the appearance of the colonial disc was affected by the amount of inoculum. $5 \times 10^4/ml$ bacilli brought up a growth niveau, but $5 \times 10^2/ml$ did not. There were not so many colonies on any plane as to make the niveau visible.

It was considered that the antimycobacterial activity of a drug should be studied in relation to the number of bacilli and the amount of drug and the amount of penetrating oxygen.

(4) The formation of a growth niveau was not attributed to propylene glycol which was used to dissolve ethionamide.

* From National Sanatorium Muramatsu-Seiran-so, Tokai-Mura, Ibaraki-Ken, Japan.

(5) Sera from patients who received ethionamide were tested. They were superposed on agar media. They were proved to inhibit the bacilli to grow in the top area, consequently allowing colonies develop in a limited zone at a certain depth of the medium. In these cases, clonial discs were not marked with a distinguishable growth niveau. It was considered that the activity of ethionamide might be changed to some extent in vivo.

緒 言

われわれは結核菌の Dubos 寒天高層混積培養上に抗結核薬溶液等を重層しておく、薬剤濃度に応じて、寒天柱の深部に集落の層が出来ることを知り、この方法によつて、各種抗結核薬の試験管内および体内抗菌力を検討してきた^{1)~7)}。

この間 1314 TH 溶液を重層したときに現われる集落層の様相が他の薬剤溶液(SM, PAS, INH, CS, Eb, KM, VM)を重層したときに現われる集落層の様相と異なり、きわめて独特なものであることを観察した。すなわちいずれの薬剤溶液を重層して培養しても、4~5 日で集落の層が見え始め、その層の厚さは約 5 mm であり、一様な混濁に近い観を呈する。

しかるに 1314 TH 溶液重層の場合にのみ、その後の培養に伴い、一様な混濁の中にきわめて明瞭な薄い別の層が発達してくるのである。この所見の一部については、すでに本誌 39(10)に報告した。

後日、著者らは期せずして、Schmiedel⁸⁾が Sauton 寒天高層混積培養に 1314 TH 溶液をも混積したさいに、独特な集落層を観察した報告に接したので、これを追試して著者らの所見と比較検討した。

他にこのような所見の報告がないので、ここに報告する。

実験方法

1. 結核菌の Dubos 寒天混積培養：各組成成分を 2 倍にしてある Dubos 液（以下これを Dubos 2 と仮称する。）で菌液を調製して、2 ml ずつ Widal 管に分注する。ついで溶解した 0.5% 寒天液を 50°C に保温して、その 2 ml を分注混和して、冷水中で凝固せしめる。ついで薬剤溶液 1 ml を寒天柱の上に静かに重層して、パラフィルムかアルミ箔で蓋を施し、37°C で培養する。ゴム栓で密封すると菌は増殖しないので不可である。

薬剤溶液も混積する場合には、薬剤溶液を Dubos 2 で調製して、薬剤溶液と菌液と寒天液とを混和したときの終末の培養基が Dubos 培地の組成を保つように留意する必要がある。

供試した Dubos 培地は市販のものであり、したがってアルブミン液も付属のものである。

寒天は Difco Special Agar Noble を使用した。

2. TH 溶液の調製：ツベルミン原末（明治製薬）を Propylene Glycol に 1 mg/ml の割合に溶解せしめ、蒸留水で 10 倍希釈して、100°C、30 分間滅菌した後、所要濃度に希釈して使用する。重層する場合は蒸留水で希釈し、混積する場合は Dubos 2 で希釈した。

3. 供試菌株：各種抗結核薬の抗菌力を比較検討するために、業室で分離した SM, PAS, INH 感受性菌を数年来小川培地に継代保存した菌株を主として供試した。（栗原株）

4. 接種菌量：供試菌株の Dubos 培養 14~21 日の菌液の 1,000 倍希釈液 0.1 ml を 3% 小川培地に移植して集落数を算定すると約 500~1,000 であつた。すなわち Dubos 培養の生菌数は $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ ml と諒承している。通常上記菌液を調製するには、Dubos 2 に対して、Dubos 培養を 1% の割合に浮遊せしめたので、終末の接種菌量は 5×10^4 /ml くらいであると諒承している。

接種菌量によつて集落層の様相が著しく相違することは数次報告したところであり、後述もするけれども、厳密な計数は煩瑣であるので、通常、よく増殖したとみえる Dubos 培養を基準にした。

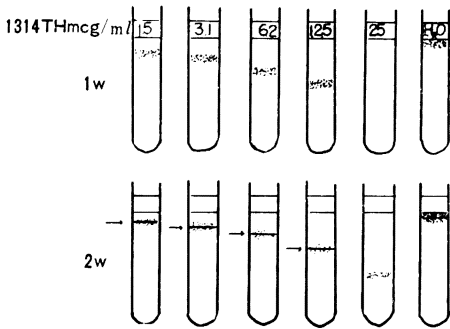
実験成績

実験 1. TH 溶液を重層して培養するときに、きわめて薄い集落層が現われること

実験方法の項で述べたとおり結核菌（栗原株）を混積した寒天柱の上に 1314 TH 溶液を重層して培養した。TH 溶液は 25 mcg/ml 以下倍数希釈した液各 1 ml を重層した。集落発生の所見は図 1 に示した。

図にみるように集落層の独特な所見は培養 10~14 日ころに現われてくる。上段のスケッチにみるとおり、培養 5~7 日で集落が肉眼で認められるようになる。H₂O を重層した寒天柱においては、その上面から数 mm の間の菌が増殖して集落にまで発達する。1.5 mcg/ml 液を重層した寒天柱においては、その上面から数 mm の間に混積せられてあつた菌は増殖を起こさないで、この部分は透明なままである。この層の下部数 mm の間の菌が増殖して集落にまで発達し、それらが集落層を形成する。さらにこの下部の菌は増殖を起こさないで、

Fig. 1. Antimycobacterial Activity (Dubos agar)



この層もまた透明なままである。3.1 mcg/ml 液を重層した寒天柱においては、その上面から約 7 mm 下方に集落層が形成せられた。以下濃度に応じて深部に集落層が現われたことが示されている。12.5 mcg/ml 液重層の寒天柱では集落層の出現が 1~2 日遅延する。25 mcg/ml 液重層では、いまだ集落が出来ていない。

さらに培養を続けて 7~14 日にいたると、下段のスケッチのようになった。すなわち 1.5~12.5 mcg/ml 液を重層した寒天柱において、さきにもえていた集落層の中に、紙片を挟んだようにみえるきわめて明瞭な集落の層が発達してきた。これはやや大きい集落の集合である。25 mcg/ml 液を重層してあつた寒天柱においては、約 20 mm 深部に集落層が遅れてみえたけれども、個々の集落は小さく、集落数が少なく、集落層の厚さも薄い。

以上は 1 実験例の所見であり、集落層が形成せられる位置は実験ごとに多少の相違があつたのであり、1.5 mcg/ml 液を重層しても、H₂O を重層した所見と同じであることもあつた。これは主として混積菌量による相違であると思われる。

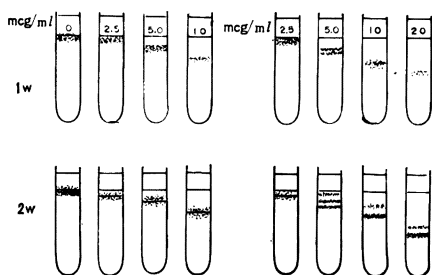
実験 2. 1314 TH と 1321 TH との比較

1321 TH は塩野義製薬から提供せられた。1314TH と同様に溶解した。供試菌株は栗原株を含む 10 株で、いずれも TH 未使用患者喀痰から分離せられた結核菌である。栗原株の培養所見を図示すると図 2 のようである。

1314 TH 溶液重層の場合の所見は上述の実験の所見

Fig. 2.

1314 TH Superposition 1321 TH Superposition



と変わらなかつた。すなわち 2.5~10 mcg/ml 液重層の場合、最初に濃度に応じて深部に集落層が形成せられ、時を経て、その中に一段と明瞭な薄い集落層が発達した。

1321 TH 溶液重層の場合は、同一 Lot の混積培養に対して、2.5 mcg/ml 液重層では 1314 TH と同様であつたけれども、5.0 mcg/ml 以上重層のときは、それぞれ分離した 3 層または 2 層の集落層が出来た。

他の菌株の場合には、最初に現われる集落層の位置が薬剤濃度に応じて深いことは一般であつたけれども、時を経て現われる集落層は互いに分離した 2~3 層であつたことがあり、この場合、薄い集落層が出来なかつたことがある。

また集落層の深さは、菌株間で多少ばらつきがあつた。

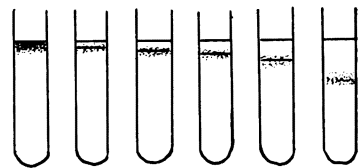
実験 3. TH 溶液重層と混積

TH 混積の手順を表示すれば次表のように表わすことができる。

試験管番号	1	2	3	4	5
Dubos 2	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
TH 10 mcg/ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Dubos 2	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Dubos 2 菌液	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
0.5% 寒天	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
TH 終末濃度 mcg/ml	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15

本項の実験では、TH 溶液重層も同時に実施した。このさい Dubos 2 菌液は上記表のと同じ菌液を供試した。したがつて終末の接種菌量は、TH 混積の場合は重層の場合の 1/2 になつた。所見は図 1 と図 3 に示した。

Fig. 3. Antimycobacterial Activity



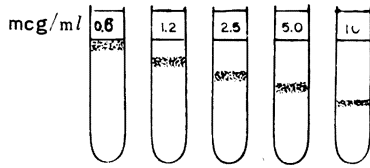
1314TH mcg/ml 0, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5

本実験の培養所見で注目せられたことは、TH 混積の場合、きわめて低濃度すなわち、重層法等によつて示された最少発育阻止濃度の約 1/10 までも、濃度に応じて大きな発育阻止帯が示されたこと、および重層の場合と同様に、独特な薄い集落層が出来たことである。

実験 4. 独特な集落層形成は TH 溶液重層または混積の場合だけであること

1) SM, KM, VM, PAS, INH, CS, Eb のそれぞれ適当な濃度の溶液を重層した場合も、寒天柱の上部に発育

Fig. 4. KM Superposition



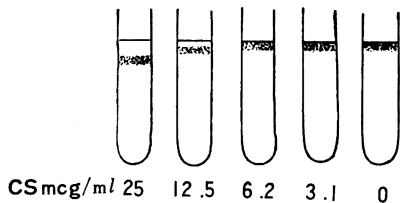
阻止帯を生じ、その下方に集落層が形成せられることはすでに報告したところである²⁾⁶⁾⁷⁾。

その集落層の所見はいずれも同様であり、1例をKMについて図示すれば図4のごとくである。すなわちKMは1.2~10 mcg/ml 溶液を重層して培養するときは、約1週間で濃度に応じて深部に集落層が現われ、一様な混濁に近い外観を呈する。その後4週間くらい培養を続けても、集落層は濁度を増すだけである。

2) TH の溶媒 (Propylene Glycol) の影響ではないこと

CS 溶液重層と混積を TH のそれと同条件で検査した。ただし CS は Propylene Glycol に溶けにくいので、その 10 mg/9 ml 水溶液に Propylene Glycol 1 ml を添加して、100°C、30 分間滅菌後 H₂O で倍数希釈して供試した。すなわち CS 溶液 0.1 ml + Dubos 2 菌液 2 ml + 寒天液 2 ml を混積した。培養所見は図5のごとくであった。すなわち 25 mcg/ml 混積で約 8 mm の発育阻止帯の下方に 5 mm の集落層が形成せられ、6.2 mcg/ml 以下では阻止帯を生ずることなく、上面から下方に同様な集落層が出来た。この所見は CS 水溶液を混積した場合も同様であり、また同濃度の水溶液を重層した場合も同様であった。

Fig. 5. Antimycobacterial Activity CS in Agar Medium

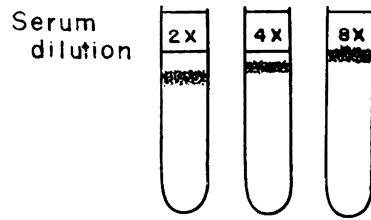


3) TH 200 mg 内服 4 時間後の血清の抗菌力 TH 200 mg 内服 4 時間後の血清を重層することにより生ずる阻止帯の大きさを比較することによつて、血清の抗菌力を検討したことはすでに報告した⁶⁾。

このさい TH 溶液の重層を対照とした。対照の所見は、毎回図1のごとくであり、血清重層の場合はけつして集落層の中に別の集落層をみることはなかつたのである。血清重層の場合の1例の所見を図示すれば図6のごとくである。

実験 5. 接種菌量について

Fig. 6. Serum Antimycobacterial Activity 1314 TH 200 mg 4 hrs



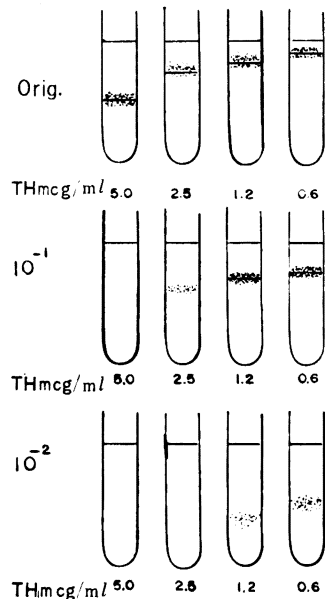
Dubos 液培養の菌液を Dubos 2 に対して 5% の割合に浮遊した菌液を原液として、これを Dubos 2 で 10 倍、100 倍に希釈した菌液をそれぞれ 10⁻¹ 菌液、10⁻² 菌液と仮称する。

TH 10 mg/ml Propylene Glycol 液を 100°C、30 分間滅菌後 Dubos 2 で 10 倍希釈 3 回、5 倍希釈 1 回で 20 mcg/ml 液を作り、以下倍数希釈した。

各菌液 1 ml、各濃度 TH 液 1 ml、寒天液 2 ml を混積して培養した。すなわち終末 TH 濃度は 5~0.6 mcg/ml である。

集落層形成の所見は図7に示した。すなわち原菌液混積のときは、TH 濃度に応じて、上面から約 20~0.5 mm の部に集落層が出来始め、時を経て、その中に別に薄い集落層が発達してきた。

Fig. 7. Amount of Inoculum



10⁻¹ 菌液混積の場合は、TH 5 mcg/ml で菌の増殖は全く阻止せられ、2.5 mcg/ml で 15 mm 深部に少数の集落が生じ、1.25 mcg/ml では原菌液と 2.5 mcg/ml の場合よりも深い部に明瞭な集落層が形成せられ、0.6 mcg/ml でも同様、接種菌量が多いときよりも明らかに

より深い部に集落層が出来た。

10^{-2} 菌液混積の場合は TH が低濃度のところで、もつと深い部に集落が現われてくるけれども、集落は小さく、数が少ないので集落層の上下境界は認めにくい。

原菌液混積では全管に、 10^{-1} 菌液混積では 1.25 mcg/ml と 0.6 mcg/ml で集落が多く、集落層の境界は明瞭であり、このような場合には、時を経て、その中に一段と明瞭な集落層が発達してきた。

集落数が少ない集落層にはこのような現象がみられなかった。

考 察

われわれは上記のうち、重層法によって日常臨床に使用せられる抗結核薬の試験管内抗菌力とこれらの投与を受けた患者血清の抗菌力とを検討してきたのであるが、TH の検討に及んで、TH 溶液を重層して培養したときに形成せられる集落層の様子が他の薬剤溶液を重層した場合と異なり、上記のように独特なものであり、かつまた TH を服用した患者血清を重層したときには、この独特な様子が現われないことを知つたので、改めて他の薬剤の場合と比較検討しなければならないと思う。

(1) 重層の場合

感受性菌の混積培養上にいずれの薬剤溶液を重層した場合も濃度に応じて深部に集落層が形成せられ、SM, PAS, INH 耐性菌では SM, PAS, INH を重層しても、その表層発育は阻止せられなかつた¹⁾⁴⁾⁵⁾のであるから、表層の発育阻止帯は薬剤の抗菌作用を表現するものであると考えてきた。

発育阻止帯の下部までは最少発育阻止濃度まで拡散して、この部の菌の発育を阻止するので、外界から拡散してくる酸素はこの部で菌によつて消費せられることなく下方に達する。拡散する薬剤濃度が最少発育阻止濃度以下になるところで、酸素の供給を得た菌が増殖を開始する。この部分では引き続き供給せられる酸素を消費するために、その部分より下方への酸素供給を中絶する。もともと培地中に含まれていた酸素の量は菌の発育を維持するために十分ではないので、外界からの供給を絶たれた下層では、集落の発育が起らない。一応以上のように考えていた。

TH 重層の場合にのみ実験成績の項に述べたとおりの独特な集落層の形成せられることについては、酸素分圧の分布に関して、Liesegang の現象から類推せられるであろうと考えられるばかりであつて、いまだ証明の手掛りを得ていない。

TH 内服患者の血清を重層した場合も発育阻止帯が出来るけれども、TH 溶液重層の場合に形成せられる独特な集落層が形成せられないことは、TH が体内で変化して、安定な抗菌活性物質になることを示唆するものでは

なからうかと思われる。

ただし集落層の複雑な模様形成は、混積菌量によつてかなり相違するのであつて、著しく疎であるときは、層の上下界が不明瞭であることは当然であると思われる。

(2) 混積の場合

Lebek⁹⁾¹⁰⁾ が Glycerin を含まない Sauton 寒天混積培養において、大量 (2 mg/5 ml) の人型菌を混積した場合、集落層が寒天柱の深部に形成せられ、Glycerin 添加により集落層が上昇することを報告している。

Schmiedel⁹⁾ はこの実験方法を応用して、微量の抗結核薬が結核菌の呼吸に及ぼす影響を観察したさい、TH 混積だけが Glycerin 含有培地で、濃度に応じて深部に集落層を形成せしめることを報告している。氏はいずれの場合の集落層をも Niveau と表現しているけれども、TH の場合はとくに境界明瞭であることを認めているごとくである。

われわれもまた Dubos 寒天において、TH 重層または混積の場合、他の薬剤の場合と異なつた集落層の形成せられることを認めたのであり、ことに菌量によつては、われわれのいう集落層の中の集落層がみられることを明らかにした。後者の集落層が Niveau という表現にふさわしいと考える。

これらの観察は TH の作用を追求するうえに役立つであろうと考えるのである。

(3) 接種菌量について

薬剤も混積した場合、Schmiedel⁹⁾ は TH 以外の抗結核薬の殺菌濃度以下の濃度では表層発育に影響しなかつたと述べている。これに反して岡本ら¹¹⁾ は SM, PAS, INH の殺菌濃度以下で表層発育が阻害せられ、深部集落層が形成せられることを認めている。

われわれは CS について表層発育が阻止せられることをみる事ができた。

しかし Schmiedel の実験の混積菌量は 2 mg/5 ml、岡本らは 9.5×10^8 /ml と記され、われわれの実験では 5×10^4 /ml くらいである。

集落層の所見は接種菌量によりかなり相違するものであることは数次に報告したところであり、菌と薬剤と培地の相互関係に対する酸素の役割がそれぞれの量的関係において考究せられなければならないと思惟せられるのである。

結 論

結核菌の寒天高層混積培養に 1314 TH $10 \sim 2.5$ mcg/ml 溶液を重層して培養するときは、濃度に応じて深部に集落の層が形成せられる。

集落層の様子は、他の抗結核薬溶液を重層して培養したときの集落層の様子と異なり、独特なものである。す

なわち培養1週間くらいで現われる集落層の中に、時を経て一段と明瞭な薄い層が発達してくる。これを Niveau と表現したい。

TH をも混釈した場合は、2.5~0.15 mcg/ml で同様な表層発育阻止と深部集落層形成がみられた。

1314 TH 200 mg 内服4時間後の患者血清を重層するときは、深部集落層が形成せられるけれども、その模様は TH 溶液重層の場合のような独特なものではない。

1314 TH と 1321 TH とは試験管内で類似の所見を与えた。

以上の所見の理由は明らかにすることはできなかつたけれども、TH の作用を追究するうえに示唆するところがあるであろうと考えられた。

文 献

- 1) 宇都宮利善：結核，35：173，昭35.
- 2) 岡本亨吉・宇都宮利善・古泉桂四郎：結核，35：543，昭35.
- 3) 古泉桂四郎・岡本亨吉：結核，37：18，昭37.
- 4) 岡本亨吉：結核，38：78，昭38.
- 5) 岡本亨吉・藤永亮三・山内秀夫：結核，38：413，昭38.
- 6) 岡本亨吉・照沼毅陽：結核，39：474，昭39.
- 7) 岡本亨吉・照沼毅陽：結核，40：505，昭40.
- 8) Schmiedel, A., Lawonn, H., Gerloff, W. : Beitr. Klin. Tbk., 129, 317 : 1964.
- 9) Lebek, G. : Zbl. Bakt., 173 : 581, 1958.
- 10) Lebek, G. : Zbl. Bakt., 176 : 530, 1959.
- 11) 岡本茂広・金井興美・室橋豊穂：結核，38：551，昭38.