

Mycobacterium parafortuitum を検定菌とする  
Isoniazid, Ethambutol の濃度測定法

金 沢 裕・倉 又 利 夫

新 潟 鉄 道 病 院

東 村 道 雄

国 立 療 養 所 中 部 病 院

受付 昭和 42 年 9 月 1 日

ASSAY METHOD FOR MICROBIOLOGICALLY ACTIVE ISONIAZID  
AND ETHAMBUTOL LEVELS IN BODY FLUIDS BY THE AGAR  
PLATE DIFFUSION TECHNIQUE USING MYCOBACTERIUM  
PARAFORTUITUM AS TEST ORGANISMS\*

Yutaka KANAZAWA, Toshio KURAMATA and Michio TSUKAMURA

(Received for publication September 1, 1967)

In vitro susceptibility to antituberculous drugs, of 8 strains of *Mycobacterium parafortuitum*, which had been isolated from soil, were determined by the plate dilution method using trypticase soy agar. The results obtained revealed a profound susceptibility of these strains to kanamycin, streptomycin, viomycin, isoniazid and ethambutol, except PAS, ethionamide and cycloserin.

Among the 8 strains examined, strain H-7 and strain 305 exhibited remarkably profound susceptibility to isoniazid with the minimum inhibitory concentration of 0.015 and 0.031  $\mu\text{g/ml}$  respectively. Moreover, strain 314 was also highly sensitive to ethambutol with the minimum inhibitory concentration of 0.031  $\mu\text{g/ml}$ .

Assay method for isoniazid and ethambutol in body fluids using *M. parafortuitum* H-7 as a test organism was reported previously. In further pursuit of the investigation, we have examined of the usefulness and efficiency of the assay system for the microbiologically active levels of antituberculous agents in body fluids, using two other strains of *M. parafortuitum*.

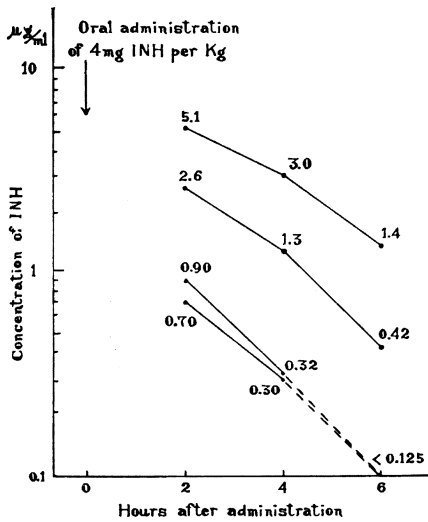
In the assay for isoniazid (INH) by the thin-layer cylinder-plate technique, using *M. parafortuitum* 305 as a test organism, serum levels more than 0.1  $\mu\text{g/ml}$  was measured within 36 hour incubation. *M. parafortuitum* 305 was most sensitive to free-INH, moderately sensitive to its metabolic hydrazone types and resistant to acetyl-INH and isonicotinic acid.

It was also found to be fully practicable to assay ethambutol levels in body fluids by the thin-layer cylinder-plate method using *M. parafortuitum* 314 as a test organism, where serum concentration more than 0.1  $\mu\text{g/ml}$  was measured within 36 hour incubation.

\* From Niigata Railway Hospital, Ryusakuba, Niigata, Japan.



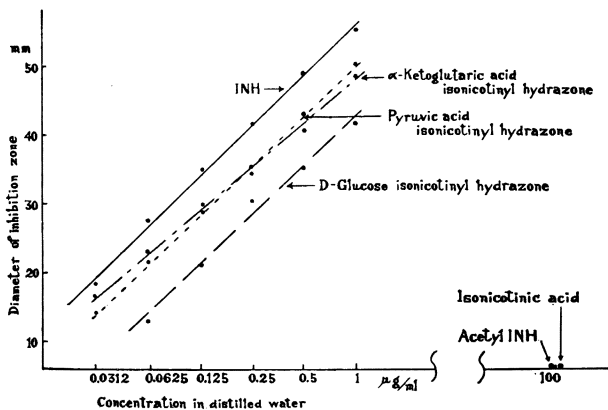
Fig. 2. Microbiologically Active INH Level in Serum Assayed by the Thin-layer Cylinder-plate Method Using *M. parafortuitum* 305 as a Test Organism



受性であり、また *M. parafortuitum* 314 株は ethambutol に 0.0312 µg/ml の MIC で H-7 (H-8) 株, *M. smegmatis* 607 株より高感受性を示した。

*M. parafortuitum* 305 株を検定菌とする INH の濃

Fig. 3. Relation between Various Kinds of Metabolites of INH and the Diameter of Inhibition Zone in the Thin-layer Cylinder-plate Method Using *M. parafortuitum* 305 as a Test Organism



Metabolites of INH	Concentration in distilled water (µg. ml)					
	100	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
INH	55.1	49.0	41.8	35.1	27.7	18.2
Pyruvic acid isonicotinylnyl hydrazone	50.0	43.1	34.2	28.9	22.0	14.3
D-Glucose isonicotinylnyl hydrazone	41.8	35.8	30.1	21.5	12.9	0
α-Ketoglutaric acid isonicotinylnyl hydrazone	48.7	40.6	35.0	30.0	22.9	16.3
Isonicotinic acid	0					
1-isonicotinylnyl-2-acetyl hydrazone	0					

度測定法の検討

*M. H-7* 株を用いる INH 濃度測定法についてはすでに<sup>3)4)</sup> たびたび報告したので、今回は *M. parafortuitum* 305 株を用いる INH 濃度測定法に検討を加えた。

検定菌液調製：検定菌を Trypticase soy broth 5 ml に 2 白金耳を接種，24 時間培養する。

検定平板作製：培養菌液上層部を、0.2% に 50°C に溶解した寒天培地に接種し，5 ml ずつ平板に分注して固める。

培養：円筒（カップ）を立てて被検体を満たしただけに 37°C に培養し，出現した阻止円直径を計測した。

薬剤濃度と阻止円の関係：Fig. 1 のように血清中 INH の対数濃度と阻止円直径の間にはほぼ直線関係が成立し，また血清中最低測定可能濃度は 0.1 µg/ml であった。また計測に十分な阻止円出現時間は 36 時間以内であった。

血清中濃度測定成績：実際に INH 服用中の血清中濃度を測定し，Fig. 2 のように代謝型の推定に役立つことを確かめた。

INH の代謝物 (metabolites) に対する本測定法の感度：本測定法の INH の各種代謝物に対する感受性を，本法を行なった場合のおのおのによつて形成された阻止円の大きさから推定した。Fig. 3 に示すようにその感受性は free INH に最も高く，free INH > pyruvic acid isonicotinylnyl hydrazone ≅ α-ketoglutaric acid isonicotinylnyl hydrazone > D-glucose isonicotinylnyl hydrazone の順であったが，acetyl INH ならびに isonicotinic acid には感受性は全くみられなかつた。すなわちさきに *M. H-7* 株<sup>3)</sup> について得た成績とはほぼ同様であつた。

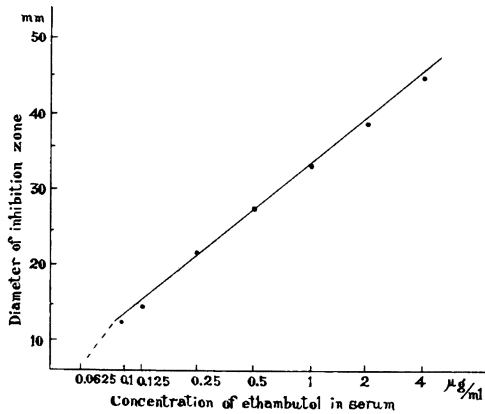
*M. parafortuitum* 314株を検定菌とする ethambutol 濃度測定法の検討

実施方法：前述の *M. parafortuitum* 305 株について実施したのと全く同様の方法で行なつた。すなわち Tween 80 0.05% 含有 broth 24 時間培養菌液を Trypticase soy 寒天に 0.2% に接種し，5 ml ずつシャーレに分注し，水平に固めた。ついで円筒を立てて，各種濃度の薬剤を含む血清を満たしてただちに培養した。

薬剤濃度と阻止円の関係：Fig. 4 に示すように血清中 ethambutol の対数濃度と阻止円直径の間には直線関係が成立し，最低 0.1 µg/ml まで測定可能であつた。

体液中濃度測定成績：実際に ethambutol 服用時の血清中，肋水中濃度を測定し，Fig. 5 のような成績が得られ，血清中，

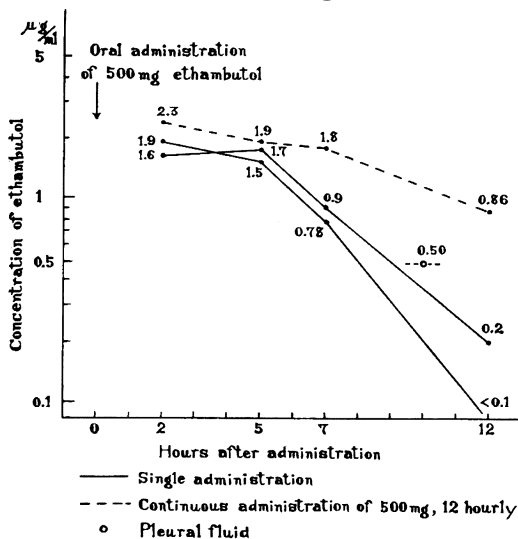
Fig. 4. Relation between Concentration of Ethambutol in Serum and Diameter of Inhibition Zone by the Thin-layer Cylinder-plate Method Using *M. parafortuitum* 314 as a Test Organism



Concentration in serum (µg/ml)	Diameter of inhibition zone (mm)*
4	45.15 ± 1.46
2	39.30 ± 0.92
1	33.53 ± 0.72
0.5	27.83 ± 0.88
0.25	21.90 ± 1.05
0.125	13.85 ± 1.13
0.1	11.30 ± 1.04
0.0625	0

\* Fiducial limit of mean value ( $\alpha=0.05$ )

Fig. 5. Microbiologically Active Ethambutol Level in Serum Assayed by the Thin-layer Cylinder-plate Method Using *M. parafortuitum* 314 as a Test Organism



肋水中に十分有効濃度を保つことが確かめられた。

測定実施法

以上の成績から次のような測定法が適当と考えられた。

検定菌：INH には *M. parafortuitum* 305, ethambutol には *M. parafortuitum* 314

接種菌液：Tween 80 0.05% 含有 Trypticase soy broth 5 ml に菌苔 2 白金耳程度を接種，24 時間培養しその上層部を使用

検定平板作製：Trypticase soy 寒天培地を溶解 50°C 前後に保ち，前項の検定菌液を 0.2% に混和し，5 ml ずつ，内径 90 mm の規格型シャーレ（またはプラスチックシャーレ）に分注し水平に固める。

標準ならびに被検サンプル調製：化学療法剤を使用していない人からの正常血清（または血漿）に INH または ethambutol を 8, (4), 2, (1), 0.5, (0.25), 0.125 µg/ml の 4 倍（または 2 倍）希釈系列に含むサンプルを調製し標準とする。薬剤服用後，採取血清（または血漿）を被検体とする。（ただし ethambutol の場合はアルカリ側で阻止円が拡大する傾向があるので，pH 7.8 の Buffer で血清を 2 倍に希釈して，標準ならびに被検サンプルを調製すると，血清 pH の差による変動をさけることができる。）

培養：作製寒天平板に円筒を立て，標準ならびに被検サンプルを満たし，ただちに 37°C に培養する。

力価測定：36 時間程度培養後に出現した阻止円直径を直角 2 方向から計測し，その平均を求める。半対数方眼紙上に阻止円直径を整数目盛でとり，標準サンプルの成績から標準曲線を描く，ついで被検体の阻止円直径から相当する薬剤濃度を求める。

考 案

各種化学療法剤の体液中濃度測定法としては化学的測定法と微生物学的測定法があるが，微生物学的方法は in vivo における治療効果に結びつく活性値の得られる特徴があると考えられる。

その意味でわれわれは従来から化学的測定法が主に用いられている合成化学療法剤としてのサルファ剤<sup>12)</sup>，ニトロフラン系薬剤<sup>13)</sup>，Nalidixic acid<sup>14)</sup> についても適当な検定菌を選択することにより微生物学的測定の可能であることを報告してきた。

とくにわれわれの用いる薄層平板拡散法は，その操作が簡易で，測定精度がよいので抗生剤の濃度測定の基準とされている Oxford cup 法の応用と考えられる。したがって従来から INH などの抗結核剤の濃度測定に用いられている人型菌を用いる直立拡散法に比し，判定時間が短いこと，混和接種を行なうので阻止帯境界が鮮明な点，また被検体と阻止円はカップで隔てられているので，喀痰などの無菌的でない検体もそのまま測定しうる点などの長所があると考えられる。

今回とくに検討を加えた *M. parafortuitum* は INH, ethambutol, SM, KM, VM などの抗結核剤に感受性

の高い菌株を含んでいることを確かめることができた。

とくに INH 検定菌としては従来報告し、また今回 *M. parafortuitum* に属することが明らかになった H-7 株に、さらに 305 株を追加することができた。本 305 株は H-7 株に比し、わずかに感度が低いようであるが、発育が早く、36 時間で判定可能な阻止円を形成する長所があつた。

また ethambutol 検定菌として見出した *M. parafortuitum* 314 株は、本薬剤検定菌としてわれわれのさきに報告した H-7 株、および Thomas ら<sup>11)</sup>の用いた *M. smegmatis* 607 株に比し、感度が数倍高い長所があり、さらに発育も早く、つねに 36 時間以内に測定可能な阻止円を形成する特徴があつた。

### 結 論

1) *Mycobacterium parafortuitum* は INH, ethambutol, SM, KM, capreomycin, VM などの抗結核剤に高感受性を有する傾向がみられた。

2) *M. parafortuitum* 305 株を検定菌として薄層平板円筒法を行ない、血清中 INH 濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$  以上を 36 時間以内に測定することができた。

本測定法は free INH に最も感度が高く、INH の各種 metabolite にもある程度感性があつたが、イソニコチン酸、アセチル INH には反応を示さなかつた。

3) *M. parafortuitum* 314 株を検定菌として薄層平

板円筒法を行ない、ethambutol の血清中濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$  以上を 36 時間以内に測定することができた。

### 文 献

- 1) 小川政敏：日本臨床結核，16：417，昭 42.
- 2) Schmiedel, A.: Zent. Tbk., 112：8，1958.
- 3) Kanazawa, Y. and Kuramata, T.: Chemotherapy, 11：175，1963.
- 4) Kanazawa, Y. and Kuramata, T.: Chemotherapy, 12：117，1964.
- 5) 田川周幸：Chemotherapy, 13：156，1965.
- 6) 前田徹・田川周幸・和田退蔵・野津手晴男：Chemotherapy, 13：105，1965.
- 7) 金沢裕・倉又利夫：結核，40：108，昭 40.
- 8) 金沢裕・倉又利夫：結核，39：117，昭 39.
- 9) 金沢裕・倉又利夫：日本細菌学会雑誌，21：693，昭 41.
- 10) 東村道雄・外山春雄・水野松司：医学と生物学，70：232，昭 40.
- 11) Thomas, J. P., Baughn, C. O., Wilkinson, R. G. and Shepherd, R. G.: Am. Rev. Res. Dis., 83：891，昭 36.
- 12) 金沢裕・倉又利夫：Chemotherapy, 8：478，1960.
- 13) 金沢裕・倉又利夫：Chemotherapy, 14：39，1966.
- 14) 金沢裕・倉又利夫：Chemotherapy, 14：319，1966.