

耐性培地の保存温度ならびに保存期間が α -ethyl-thioisonicotinamide (TH) の結核菌最低発育阻止濃度に及ぼす影響に関する研究

田村 昌敏・山崎 彰

国立新潟療養所

受付 昭和 42 年 1 月 26 日

EFFECTS OF TEMPERATURE AND PERIOD OF PRESERVATION OF RESISTANT MEDIA ON MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION OF α -ETHYL-THIOISONICOTINAMIDE (1314 TH) TO THE GROWTH OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Masatoshi TAMURA and Akira YAMAZAKI

(Received for publication January 26, 1967)

Studies were made about the effects of temperature and period of preservation of 1314Th resistant media on the minimal inhibitory concentration of 1314Th to the growth of *Myc. tuberculosis*.

One % Ogawa's media and Kirchner's semi-liquid agar media with albumin in 10% were used. The latter media were used after being stored in an incubator at 37°C for 24 hours in order to confirm the sterility. The concentration of 1314Th of the media were so prepared as to become 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 and 300 mcg/ml respectively. The resulting media were stored at 5°C, 20°C, 30°C and 37°C for 1, 2, 3, 4 and 8 weeks before the use.

Three strains were used for this experiment, that is, H₃₇Rv, Aoyama B and a strain isolated from the sputum of a tuberculous patient. These strains were planted on 1% Ogawa's media weekly before the experiment, and 2 weeks old cultures were always used for the experiment.

The following results were obtained.

1) Immediately after the preparation of 1% Ogawa's media, the minimal inhibitory concentration of 1314 Th to the growth of *Myc. tuberculosis* was 20 mcg/ml after 3 weeks' cultivation and 50 mcg/ml after 4 weeks' cultivation. In the case of Kirchner's media, the corresponding values were 10 mcg/ml after 3 weeks' cultivation and 10~20 mcg/ml after 4 weeks' cultivation.

2) When 1% Ogawa's media were stored at 5°C, the minimal inhibitory concentration was almost the same as in the media immediately after the preparation, up to 8 weeks of the preservation period. In the case of Kirchner's media, the corresponding value was almost unchanged up to 4 weeks of preservation.

3) At higher preservation temperatures, the antibacterial activity of the media decreased, the degree of decrease being more marked with 1% Ogawa's media. Also with longer preservation period of the media, the decrease of the antibacterial activity became more obvious.

4) More uniform results of the minimal inhibitory concentration of 1314 Th were obtained with 3 weeks culture than with 4 weeks one.

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

5) For the resistance test of 1314 Th, Kirchner's semi-liquid agar media with 10% albumin is more suitable than 1% Ogawa's media, since the effect of preservation at higher temperature is smaller in the former media.

1956年 Liebermann らが α -ethyl-thioisonicotinamide (以下 TH と略) を合成してからすでに 10 年の歳月を閲した。TH の結核菌最低発育阻止濃度 (以下 MIC と略) は使用培地の種類により、また同一培地でも諸家によつて著しく異なっている。われわれは当所の研究検査科の日常検査として昭和 35 年 TH の耐性検査が取扱われるようになって以来、TH 使用の有無に関係なく同じ患者より分離した菌株における耐性値に著しい動揺のあることに困惑してきた。

いかなる因子が TH の耐性値に最も影響を与えるのであろうか、そして常に安定した信頼性の高い成績を得るためには、いかなる点に注意して耐性検査を行なつたらよいか、この問題は結核の治療ならびに耐性検査にたずさわる者にとつて一つの関心事であると考え、現在耐性値に影響を与える因子と考えられている諸条件にき逐一実験を試みることとした。まず最初にわが国において耐性検査に最も広く用いられている 1% 小川培地と、いずれの抗結核剤にも安定した抗菌力を示すといわれている Kirchner 半流動培地 (以下それぞれ 1% 小川, K 半流動と略) を用いて、耐性培地の保存温度ならびに保存期間が、TH の MIC に及ぼす影響について実験を試み、いささか知見を得たのでその成績を報告する。

実験の方法

1) 使用培地

実験には 1% 小川と 10% Albumin (栄研) 加 K 半流動とを用いた。培地の調製にあつては、まず 10 ml の propylen glycol に 300 mg の TH を溶解して原液を作つた。10 mg/ml の濃度までは TH の結晶の析出を防ぐために、この原液をさらに propylen glycol で希釈して用いた。それ以下の濃度については原液を蒸留水で希釈し、各培地中に含まれる TH の濃度が、それぞれ 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 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 ずつ分注して使用培地を調製した。なお K 半流動は調製後 37°C 孵卵器に 1 昼夜納めて雑菌混入のないことを確かめたものを使用した。

このようにして調製した培地は、ただちにそれぞれ 5°C 冷蔵庫と 20°C, 30°C および 37°C 孵卵器に分納し、1~8 週間貯蔵して実験に使用した。

2) 供試菌株

実験には H₃₇Rv, 青山-B および未治療肺結核患者の

喀痰より分離した 1 株の計 3 菌株を用いた。

3) 菌株の接種法

供試菌株は実験培地接種にさきだち毎週新たに 1% 小川に植え継ぎ、実験培地に接種するさいには常に 2 週間培養したものを用いた。かくして菌株は比濁法によつて 10⁻² 倍希釈して均等化した菌液となし、その 0.1 ml を各培地に接種した。なお菌株の接種は各温度に 0~8 週間保存した培地の 1 系列につき、培地調製直後から 8 週間まで毎週行なつた。

4) 判定

培地に菌株接種後 2 週より 6 週まで毎週観察して集落の発育状況ならびに程度を記載し、成績を判定比較した。

実験の成績

1) 1% 小川培地

調製直後の 1% 小川 TH 耐性培地における TH の MIC は、表 1 に示すごとく 3 供試菌株とも 3 週間培養においては 20 mcg/ml, 4 週間培養においては 50 mcg/ml であつた。

耐性培地調製後、各温度に 1 週間から 8 週間保存した後に、菌株を接種した 1% 小川耐性培地における TH の MIC は、表 2 に示すごとくである。すなわち、

(a) 5°C に保存した場合。培地の保存期間が 1 週から 8 週までの MIC は 3 週間培養で 20 mcg/ml, 4 週間培養で 50 mcg/ml であつて、調製直後の培地に菌株を接種した場合と同じであつた。

(b) 20°C に保存した場合。保存期間が 1~2 週の MIC は、3 週間培養で 20 mcg/ml, 4 週間培養で 50

Table 1. Minimal Inhibitory Concentration of TH to Mycobacterium Tuberculosis with 1% Ogawa's Egg Media Used Directly after Adjustment

Strain	Culture week	mcg/ml									
		0	1	5	10	20	50	100	200	300	
H ₃₇ Rv	III	###	###	+	95	—	—	—	—	—	
	IV	###	###	+	116	15	—	—	—	—	
Aoyama-B	III	###	###	+	25	—	—	—	—	—	
	IV	###	###	+	120	5	—	—	—	—	
Tamaki*	III	###	###	40	3	—	—	—	—	—	
	IV	###	###	151	17	8	—	—	—	—	

* A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient untreated with antituberculous drug

mg/ml であつて、調製直後の培地における MIC と等しかつた。保存期間が 3~4 週の MIC は 3 週間培養で 50 mcg/ml, 4 週間培養で 100 mcg/ml。さらに保存期間 8 週の MIC は 3 週間培養で 50 mcg/ml, 4 週間培養で 200 mcg/ml であつた。

(c) 30°C に保存した場合。保存期間 1 週の MIC は 3 週間培養で 20 mcg/ml, 4 週間培養で 50 mcg/ml であり、調製直後の培地における MIC と等しかつた。保存期間が 2 週の MIC は 1 段階ずつ高くなつて、3 週間培養で 50 mcg/ml, 4 週間培養で 100 mcg/ml であつた。保存期間が 3~4 週の MIC はさらに 1 段階ずつ高くなつて、3 週間培養で 100 mcg/ml, 4 週間培養で 200 mcg/ml であつた。保存期間 8 週の MIC は 3~4 週間培養とも 300 mcg/ml で(卍)の集落の発育を認めた。

(d) 37°C に保存した場合。保存期間 1 週の MIC は 3~4 週間培養とも 50 mcg/ml であつて、3 週間培養においてすでに調製直後のものより 1 段階高かつた。保存期間 2 週の MIC は 3 週間培養で 100 mcg/ml, 4 週間培養で 200 mcg/ml であつた。保存期間 3 週の MIC はさらに高くなり、3 週間培養で 300 mcg/ml, 4 週間培養では 300 mcg/ml で(+)の集落を認めた。保存期間 4 週では 3 供試菌株とも 3~4 週間培養において(卍~卍)の集落の発育を認めた。さらに保存期間 8 週の場合は 3~4 週間培養で、3 供試菌株とも(卍)の集落を認めた。

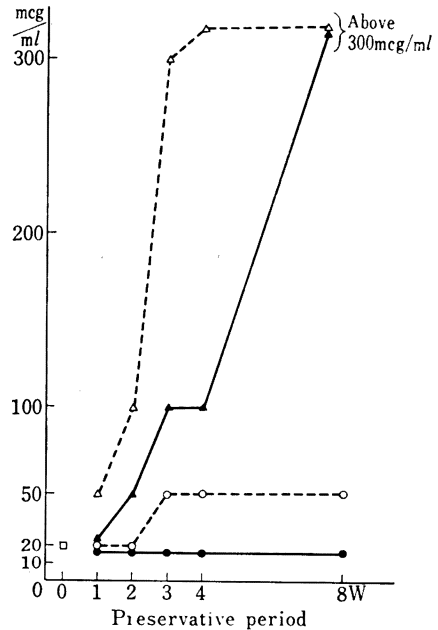
上述の 1% 小川耐性培地調製後の各保存温度における保存期間と MIC との相関曲線は、図 1 に示すごとくである(3 供試菌株が等しい曲線を描くのと、4 週間培養の MIC は不安定なので、ここには 3 週間培養の H₃₇Rv の曲線のみ掲げる)。すなわち 1% 小川における TH の MIC は保存温度が 5°C の場合には保存期間が 1~8 週まで、20°C の場合には 1~2 週まで、そして、30°C の場合には 1 週までは調製直後の培地と等しかつた。しかし 1% 小川における TH の MIC は保存温度によつてきわめて著しい影響を受け、保存温度が高くなるにつれて急に高くなり、また保存期間が延長するに従つて高く表現されてくる。換言すれば 1% 小川耐性培地における TH の抗菌力は、培地の保存温度の高い場合にはきわめて短期間に、また低い場合には比較的徐々に低下していくことが認められる。

2) Kirchner 半流動培地

調製直後の K 半流動における MIC は、表 3 に示すごとく 3 供試菌株とも 3 週間培養において 10 mcg/ml であつたが、4 週間培養においては分離株は 10 mcg/ml で、2 標準株は 20 mcg/ml であつた。

耐性培地調製後、各温度に 1 週間から 8 週間保存した後に、菌株を接種した K 半流動耐性培地における TH の MIC は、表 4 に示すごとくである。すなわち、

Fig. 1. Relation between Preservation Period of Media and Minimal Inhibitory Concentration of TH to H₃₇Rv (3 weeks' cultivation at each preservative temperature with 1% Ogawa's egg media after adjustment)



- Minimal inhibitory concentration on the resistance media directly used after adjustment
- Minimal inhibitory concentration on the resistance media preserved at 5°C
- Minimal inhibitory concentration on the resistance media preserved at 20°C
- ▲—▲ Minimal inhibitory concentration on the resistance media preserved at 30°C
- △---△ Minimal inhibitory concentration on the resistance media preserved at 37°C

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration of TH to Mycobacterium Tuberculosis with Kirchner's Semi-liquid Agar Media Used Directly after Adjustment

Strain	Culture week	mcg/ml									
		0	1	5	10	20	50	100	200	300	
H ₃₇ Rv	III	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	
	IV	卍	卍	卍	2	—	—	—	—	—	
Aoyama-B	III	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	
	IV	卍	卍	卍	13	—	—	—	—	—	
Tamaki*	III	卍	卍	卍	35	—	—	—	—	—	
	IV	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	

Note: The same as in Table 1.

(a) 5°C に保存した場合。保存期間が 1~3 週までの MIC は、3 供試菌株とも 3 週間培養で 10 mcg/ml, 4 週間培養で 20 mcg/ml であつて、標準株では調製直後の培地における MIC と等しかつた。しかし分離株では 3 週間培養では等しかつたが、4 週間培養では 1 段階

高かった。保存期間4週のMICは3週間培養では3供試菌株とも10 mcg/mlであつたが、4週間培養では青山-Bと分離株とは20 mcg/ml、 $H_{37}Rv$ は50 mcg/mlであつた。保存期間8週のMICは3供試菌株とも3週間培養で20 mcg/ml、4週間培養で50 mcg/mlであつた。

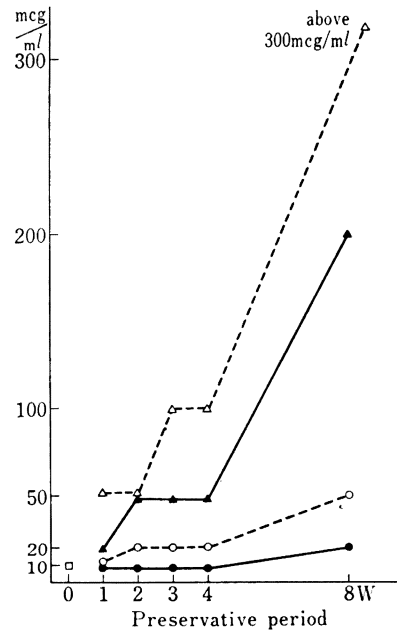
(b) 20°Cに保存した場合。保存期間1週のMICは3週間培養では3供試菌株10 mcg/mlであつたが、4週間培養では青山-Bと分離株とは20 mcg/mlで、 $H_{37}Rv$ は50 mcg/mlであつた。保存期間2週におけるMICは3週間培養で3供試菌株20 mcg/mlであつたが、4週間培養では分離株は20 mcg/ml、2標準株は50 mcg/mlであつた。保存期間3~4週のMICは3供試菌株3週間培養で20 mcg/ml、4週間培養で50 mcg/mlであつた。保存期間8週のMICは3供試菌株3~4週間培養とも50 mcg/mlであつた。

(c) 30°Cに保存した場合。保存期間1週のMICは3週間培養では3供試菌株20 mcg/mlであつたが、4週間培養では2標準株は20 mcg/mlで分離株は50 mcg/mlであつた。保存期間2~3週のMICは3~4週間培養で3供試菌株とも50 mcg/mlであつた。保存期間4週のMICは3供試菌株3週間培養で50 mcg/ml、4週間培養で100 mcg/mlであつた。保存期間8週のMICは3供試菌株3週間培養で200 mcg/ml、4週間培養で300 mcg/mlであつた。

(d) 37°Cに保存した場合。保存期間1週のMICは3~4週間培養で3供試菌株とも50 mcg/mlであつた。保存期間2週のMICは3供試菌株とも3週間培養で50 mcg/ml、4週間培養で100 mcg/mlであつた。保存期間3週のMICは3~4週間培養とも100 mcg/ml。保存期間4週のMICは3週間培養で100 mcg/ml、4週間培養で200 mcg/mlであつた。保存期間8週のMICは3~4週間培養とも300 mcg/mlで(冊)の集落の発育を認めた。

上述のK半流動耐性培地調製後の各保存温度における保存期間とMICとの相関曲線は、図2に示すごとくである(この培地においても3週間培養で3供試菌株が、安定した等しい曲線を描くので、 $H_{37}Rv$ の3週間培養の曲線のみを掲げる)。すなわちK半流動におけるTHのMICは、保存温度が5°Cの場合には保存期間1~4週まで、また20°Cの場合には1週まで調製直後の培地と等しかつた。しかしK半流動におけるTHのMICも保存温度によって著しい影響を受け、保存温度が高くなるに従つて高く、また保存期間が延長するほど高く表現される。換言すればK半流動耐性培地におけるTHの抗菌力は、培地の保存温度の高い場合には急速に、また低い場合には徐々に低下していくことが認められる。

Fig. 2. Relation between Preservation Period of Media and Minimal Inhibitory Concentration of TH to $H_{37}Rv$ (3 weeks' cultivation at each preservative temperature with Kirchner's semi-liquid agar media after adjustment)



Note: The same to as in Fig. 1.

考 案

THの結核菌に対するMICについては、戸田ら¹⁾は最初10%牛血清加K培地で1.0 mcg/mlと報告し、後に0.8 mcg/mlであると述べている。河盛ら²⁾によればDubos液体、小川およびKirchner寒天(以下K寒天と略)で5 mcg/mlである。W. Steenken et al.³⁾によれば $H_{37}Rv$ はTween-Albumin培地で1.6 mcg/ml、10%馬血清加Proskaner-Beck培地で12.5 mcg/mlである。堂野前ら⁴⁾は10%牛血清Albumin加Dubos液体培地では1~5 mcg/mlで、1%小川では10~25 mcg/mlであつた。また堂野前⁵⁾はTH既使用株を含む151株について、小川と10%馬血清加K寒天で、THの耐性を比較した結果、小川の10 mcg/ml耐性はK寒天の1 mcg/mlに、25 mcg/mlは5 mcg/mlに、また50 mcg/mlは10 mcg/mlにそれぞれ匹敵するものもつとも多かつた。またK半流動とK寒天との比較でもほぼ同様な成績を得た。北本ら⁷⁾はYoumans培地で2~5 mcg/ml。石田ら⁸⁾は $H_{37}Rv$ に対するDubos-Albumin液体培地では3.1 mcg/ml、1%小川の分離株に対しては25~50 mcg/ml。篠島ら⁹⁾はKirchnerおよびDubos液体培地では5~2.5 mcg/ml、K寒天では2.5~1.5 mcg/ml、小川では40 mcg/ml。月居ら¹⁰⁾は10%牛血清加K液体培地における $H_{37}Rv$ およびそのSM, INH,

PAS 耐性株に対しては 0.8~1 mcg/ml であるが、患者よりの 3 剤耐性の分離株では抗菌力はやや低かった。M¹⁶ F. Grumbach¹¹⁾ は Youmans 培地で 1.2 mcg/ml。川合¹²⁾ は培地によつて著差があり、10% 牛血清加 K 液体および寒天ではほぼ同じで 0.625~1.25 mcg/ml であるが、Tween-Albumin 培地では 5 mcg/ml、1% 小川では 31.3 mcg/ml であつた。N. Rist¹³⁾ は Youmans-serum 培地で 0.5 mcg/ml であると述べている。既報¹⁴⁾のごとくわれわれが TH の溶媒に Pyridine を用い K 半流動で行なつた実験では 5 mcg/ml であつた。

上述のごとく TH の結核菌に対する MIC は、使用培地によつて著しく異なるのみならず、同じ組成の培地を用いた場合にも研究者によつて著差がある。TH の耐性検査が当所の研究検査科の日常検査として取扱われるようになったのは昭和 35 年からである。最初のうちは K 寒天を、ついで K 半流動を用いて耐性検査を行なつてきたが、TH 使用の有無に関係なく同一患者の喀痰より分離した菌株において、耐性値に著しい変動が認められるためにはなほだ困惑してきた。

由来、抗結核剤の耐性検査の成績に影響を及ぼす因子としては、接種菌量、培地の種類および pH、培地調製後の保存条件、培養期間、菌液作製条件などがあげられている¹⁵⁾。今回は培地調製後の保存温度と保存期間とが、TH の MIC にどのような影響を与えるか、現在わが国で各種抗結核剤の耐性検査に最も広く用いられている 1% 小川と、最も安定した抗菌力を示すといわれている K 半流動¹⁶⁾ を用いて実験を行なつた。賀来¹⁷⁾ は馬血清加 K 半流動は抗菌力を最も安定して示し、菌の発育も良好であるが、馬血清を市販 Albumin で代用すると必ずしも満足する効果は得られないと述べている。しかしわれわれはいつでも入手できる市販の Albumin (栄研) を K 半流動に加えて実験を行なつた。

上述のごとく調製直後の 1% 小川における TH の MIC は、3 供試菌株が 3 週間培養においては 20 mcg/ml で、4 週間培養においては 50 mcg/ml であつた。また K 半流動における TH の MIC は、3 週間培養においては 3 供試菌株が 10 mcg/ml であつたが、4 週間培養においては分離株は 10 mcg/ml であつて、2 標準株は 20 mcg/ml であつた。すなわち TH の結核菌に対する MIC は、1% 小川のほうが K 半流動より 3 週間培養において 1 段階、4 週間培養において 1~2 段階高く表現されてくる。

耐性培地を 5°C に保存した場合における 3 週間培養の MIC は、1% 小川においては保存期間が 1~8 週まで、また K 半流動においては 1~4 週まで調製直後の培地におけると等しかつた。しかし両培地とも保存温度が高いほど、また保存期間が長くなるほど MIC は高く表現される。換言すれば TH の抗菌力は耐性培地調製後の保存

温度が高い場合には短期間に、また低い場合には比較的徐々に低下していく。しかし 1% 小川のほうが保存温度によつて受ける影響はより著しかつた。

上述のごとく 3 週間培養の MIC は各供試菌株で一一致をみるが、4 週間ではバラツキがでてくる。また図 1, 2 にみるごとく、耐性培地を 30°C~37°C に保存すると速やかに力価が低下していくから、耐性検査のさいに菌株接種後、孵卵器内においても速やかに力価の低下することが推察される。以上の点から TH の耐性検査にわたつては、培養期間の短いほうが温度による影響が少なく、安定した成績が得られるものと考えられる。したがつて 3 週間培養の成績で判定するほうがよいと思う。

次に TH に対する耐性検査は小川培地で十分できる⁶⁾といわれている。しかし上述のごとく 1% 小川は孵卵器内の温度によつてきわめて著しい影響を受け、速やかに抗菌力が低下していくから、TH の耐性検査にあたり安定した成績を得るためには、温度による影響の比較的小さい K 半流動を用いるほうがよいと思う。

結 論

H₃₇Rv、青山-B および未治療肺結核患者の喀痰より分離した 1 株の 3 菌株を用いて、1% 小川耐性培地と 10% Albumin 加 Kirchner 半流動耐性培地調製後の保存温度と保存期間とが、TH の結核菌最低発育阻止濃度及ぼす影響について実験を行ない、次の成績を得た。

1) 調製直後の培地における TH の結核菌に対する MIC は、1% 小川培地においては 3 週間培養で 20 mcg/ml、4 週間培養で 50 mcg/ml であつた。また 10% Albumin 加 Kirchner 半流動培地においては 3 週間培養で 10 mcg/ml、4 週間培養で 10~20 mcg/ml であつた。

2) 耐性培地を調製後 5°C に保存した場合における 3 週間培養の TH の結核菌に対する MIC は、1% 小川培地では保存期間 1~8 週まで、また 10% Albumin 加 Kirchner 半流動培地では 1~4 週まで変化を認めなかつた。

3) 両培地とも保存温度が高くなると速やかに抗菌力が低下していくが、1% 小川培地のほうがことにはなほだしかつた。また保存期間が長くなるに従つて、両培地の抗菌力も低下していく。

4) TH の結核菌に対する MIC は 3 週間培養では安定しているが、4 週間ではバラツキがでてくるから、3 週間の成績で判定するほうがよいと思う。

5) TH の耐性検査には 1% 小川培地よりも保存温度~孵卵器内影響の比較的小さい Kirchner 半流動培地のほうが適すると考えられる。

本論文の要旨は昭和 41 年 10 月 5 日第 21 回国立病院療養所総合医学会において報告した。

稿を終わるにのぞみ、ご校閲を賜わつた所長江川三二博士に感謝するとともに、本研究は厚生省一般研究費と第一製薬株式会社より α -ethyl-thioisonicotinamide 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) 戸田忠雄他 3, 日本臨床結核, 18 : 862, 1959.
- 2) 戸田忠雄・久恒和仁 : 結核研究の進歩, 30 : 82, 1961.
- 3) 河盛勇造他 7, 結核, 35 : 68, 1960.
- 4) Steenken, W., Jr. et al. : Am. Rev. Resp. Dis., 81 : 761, 1960.
- 5) 堂野前維摩郷他 : 日本医事新報, 1897 : 9, 1960.
- 6) 堂野前維摩郷 : 結核, 37 : 349, 1962.
- 7) 北本治他 8 : 最新医学, 15 : 2988, 1960.
- 8) 石田二郎他 8 : 最新医学, 16 : 188, 1961.
- 9) 箆島四郎他 11 : 内科の領域, 9 : 457, 1961.
- 10) 月居典夫他 8 : 呼吸器診療, 16 : 736, 1961.
- 11) M¹¹° Grumbach, F. : Rev. Tub. Pneum., 25 : 1365, 1961.
- 12) 川合満 : 京都大学結核研究所紀要, 13 : 184, 1965.
- 13) Noel Rist : Selected Papers, 8 : 24, 1964.
- 14) 田村昌敏・井貝宗吉 : 総合医学, 18 : 703, 1961.
- 15) 室橋豊穂 : 結核, 38 : 372, 1963.
- 16) 賀来隆二 : 結核, 38 : 517, 1963.
- 17) 賀来隆二 : 結核, 38 : 556, 1963.