

1% 小川培地と Albumin 加 Kirchner 半流動培地における
接種菌量ならびに培養期間が α -ethyl-thioisonicotinamide
(1314 TH) の結核菌最低発育阻止濃度に及ぼす影響

田村昌敏・山崎 彰

国立新潟療養所

受付 昭和 42 年 11 月 13 日

EFFECTS OF QUANTITY AND CULTURE PERIOD OF INOCULATED
BACILLI ON THE MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION OF
 α -ETHYL-THIOISONICOTINAMIDE (1314 TH) TO THE
GROWTH OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Masatoshi TAMURA and Akira YAMAZAKI

(Received for publication November 13, 1967)

Studies were made about the effect of the amount of bacilli for inoculation and the period of incubation on the minimal inhibitory concentration of 1314 TH to the growth of *Myc. tuberculosis*.

One % Ogawa's media and Kirchner's semi-liquid agar media with albumin in 10% were used. The concentrations of 1314 TH of the media were so prepared as to become 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 mcg/ml respectively. These media were mixed thoroughly, dispensed into test tubes in 5 ml quantity, and used after being stored in an incubator at 37°C for 24 hours in order to confirm the sterility. In consideration of our previous experience, the inoculations were made immediately after the preparation of the media.

Three strains were used for this experiment, that is, H₃₇Rv, Aoyama-B and a strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient without any history of previous treatment.

These strains were planted on 1% Ogawa's egg media, and 2 week old cultures were always used for the experiment. Bacillary suspensions were prepared from these cultures, and by using electric photometer the amounts for inoculation were so prepared as to become 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ and 10⁻⁴ mg in 0.1 ml. After the inoculation, the media were incubated at 37°C for 6 weeks and submitted to the weekly observation of the growth of colonies.

The following results were obtained.

The minimal inhibitory concentration of 1314 TH to the growth of *Myc. tuberculosis* tends to become higher with the increasing amount of inoculum.

In either medium the effect of incubation period on the minimal inhibitory concentration was very marked, the latter increasing obviously with prolonged incubation period. Such effect was more obvious in 1% Ogawa's medium than in Kirchner's medium.

When in Ogawa's medium 10⁻³ mg of inoculum was employed, the minimal inhibitory con-

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

concentrations of 1314 TH were 5 mcg/ml, 20 mcg/ml and 50 mcg/ml respectively in 2 week-, 3 week- and 4~5 week-old cultures. The corresponding values in Kirchner's medium were 5 mcg/ml and 10 mcg/ml in 2 week- and 3 week-old cultures.

The marked rise in the minimal inhibitory concentration observed in the case of prolonged incubation period is probably due to the decrease of drug potency by the effect of a high temperature of the incubator.

既報の実験¹⁾に続いて接種菌量と培養期間とが、 α -ethyl-thioisonicotinamide (以下 1314 TH と略) の結核菌最低発育阻止濃度 (以下 MIC と略) に及ぼす影響について、1% 小川培地と Albumin 加 Kirchner 半流動培地を用いて実験を行ない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

実験は 1% 小川培地と Albumin (栄研) を 10% の割合に加えた Kirchner 半流動培地 (以下それぞれ 1% 小川, K 半流動と略) を用いて行なつた。培地中の 1314 TH の濃度は、それぞれ 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 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。なお K 半流動は調製後

37°C 孵卵器に 24 時間収めて雑菌混入のないことを確かめたものを使用した。

既報の実験の成績に鑑み、本実験においては、培地調製後ただちに菌株の接種を行なつた。

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 菌株を使用した。

3) 接種菌量ならびに判定

実験には供試菌株を 1% 小川に植え継いで 2 週間のものを用いた。比濁法によつて 1, 10⁻¹, 10⁻² および 10⁻³ 倍希釈して均等化した菌液の 0.1 ml, すなわち 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ および 10⁻⁴ mg ずつ各培地に接種した。菌株接種後 37°C 孵卵器に収め、1 週より 6 週まで毎週観察して集落の発育の状況ならびに程度を記載して成績を判定比較した。

Table 1. Influence of Quantity and Culture Period of Inoculated Bacilli on the Minimal Inhibitory Concentration of 1314 TH to Mycobacterium Tuberculosis (1% Ogawa's medium)

Strain	Culture week	Quantity of inoculated bacilli																							
		10 ⁻¹ mg				10 ⁻² mg				10 ⁻³ mg				10 ⁻⁴ mg											
		0	1	5	10	20	50	100	200	0	1	5	10	20	50	100	200	0	1	5	10	20	50	100	200
H ₃₇ Rv	I	54	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	###	###	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	III	###	###	###	†	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IV	###	###	###	†	130	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V	###	###	###	†	†	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	VI	###	###	###	†	†	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Aoyama-B	I	75	31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	###	###	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	III	###	###	###	†	71	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IV	###	###	###	†	†	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V	###	###	###	†	†	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	VI	###	###	###	†	†	14	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tamaki*	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	###	###	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	III	###	###	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IV	###	###	†	†	†	120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V	###	###	†	†	†	†	27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	VI	###	###	†	†	†	†	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

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

実験の成績

1) 1% 小川培地における接種菌量および培養期間と1314 TH の結核菌最低発育阻止濃度

1% 小川における接種菌量と培養期間とが, 1314 TH の MIC に及ぼす影響は, 表 1 および図 1 に示すごとくである。すなわち,

(a) 接種菌量 10^{-1} mg の場合

1週間培養(以下1週間と略し, これに準ずる)では2標準株は少数の集落を認めたが, 分離株には集落の発育を認めなかつた。2週間における MIC は, 2標準株は 10 mcg/ml, 分離株は 5 mcg/ml。3週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 20 mcg/ml, 青山-B は 50 mcg/ml。4週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 50 mcg/ml, 青山-B は 100 mcg/ml。5~6 週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 100 mcg/ml, 青山-B は 200 mcg/ml であつた。

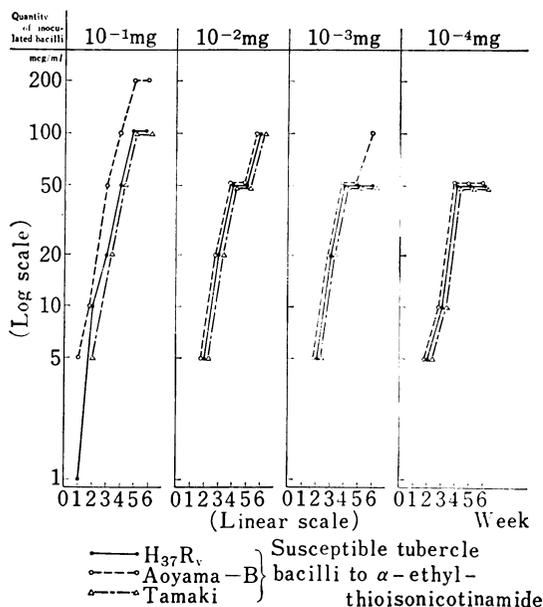
(b) 接種菌量 10^{-2} mg の場合

1週間では3供試菌株とも集落の発育を認めなかつた。2週間における MIC は, 3供試菌株が 5 mcg/ml。3週間では3供試菌株が 20 mcg/ml。4~5 週間では3供試菌株が 50 mcg/ml。6週間では3供試菌株が 100 mcg/ml であつた。

(c) 接種菌量 10^{-3} mg の場合

1週間では3供試菌株とも集落の発育を認めなかつた。2週間における MIC は, 3供試菌株が 5 mcg/ml。3週間では3供試菌株が 20 mcg/ml。4~5 週間では3

Fig. 1. Minimal Inhibitory Concentration of α -ethyl-thioisonicotinamide to Mycobacterium Tuberculosis after 3 Weeks' Cultivation (1% Ogawa's egg media)



供試菌株が 50 mcg/ml。6 週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 50 mcg/ml, 青山-B は 100 mcg/ml であつた。

(d) 接種菌量 10^{-4} mg の場合

1週間では3供試菌株とも集落の発育を認めなかつた。2週間における MIC は, 3供試菌株が 5 mcg/ml。3週間では3供試菌株が 10 mcg/ml。4~5 週間では3供試菌株が 50 mcg/ml であつた。

すなわち接種菌量の多い場合には1週間で集落の発育を認めるが, 少ない場合には2週間で以降になつてはじめて集落の発育を認める。概して接種菌量が多くなると MIC は高く表現される傾向が認められる。しかし 1314 TH の感受性株に対する MIC は, 接種菌量に関係なく, 培養の週の延長とともに急激に上昇し, 4~5 週以降はだいたい横這い状態を示してくる。

換言すれば, 1% 小川における 1314 TH の MIC は, 接種菌量による影響は比較的少ないが, 培養期間による影響ははなはだ顕著であつた。

2) Kirchner 半流動培地における接種菌量および培養期間と 1314 TH の結核菌最低発育阻止濃度

K 半流動における接種菌量と培養期間とが, 1314 TH の MIC に及ぼす影響は, 表 2 および図 2 に示すごとくである。すなわち,

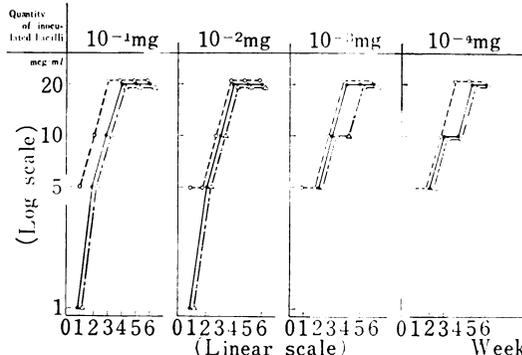
(a) 接種菌量 10^{-1} mg の場合

1週間では $H_{37}Rv$ と分離株の MIC は 1 mcg/ml, 青山-B は 5 mcg/ml。2週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 5 mcg/ml, 青山-B は 10 mcg/ml。3週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 10 mcg/ml, 青山-B は 20 mcg/ml。4~6 週間では3供試菌株が 20 mcg/ml であつた。

(b) 接種菌量 10^{-2} mg の場合

1週間では $H_{37}Rv$ と分離株は 1 mcg/ml, 青山-B は 5 mcg/ml。2週間では3供試菌株が 5 mcg/ml。3週間では3供試菌株が 10 mcg/ml。4~6 週間では3供試菌株が 20 mcg/ml であつた。

Fig. 2. Minimal Inhibitory Concentration of α -ethyl-thioisonicotinamide to Mycobacterium Tuberculosis after 3 Weeks' Cultivation (Kirchner's semi-liquid agar media)



Note: The same to as in Fig. 1.

Table 2. Influence of Quantity and the Culture Period of Inoculated Bacilli on the Minimal Inhibitory Concentration of 1314 TH to Mycobacterium Tuberculosis (Kirchner's semi-liquid agar media)

Strain	Cul- ture week	Quantity of inoculated bacilli																			
		10 ⁻¹ mg					10 ⁻² mg					10 ⁻³ mg					10 ⁻⁴ mg				
		mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml				
	0	1	5	10	20	0	1	5	10	20	0	1	5	10	20	0	1	5	10	20	
H ₃₇ Rv	I	卅	—	—	—	—	卅	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—
	III	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	卅	—	—
	IV	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	2	—	卅	卅	卅	—	—
	V	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	3	—	卅	卅	卅	2	—
	VI	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	3	—	卅	卅	卅	5	—
Aoyama-B	I	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	30	8	—	—	—
	II	卅	卅	25	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—
	III	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	卅	—	—
	IV	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	13	—	卅	卅	卅	10	—
	V	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	17	—	卅	卅	卅	12	—
	VI	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	21	—	卅	卅	卅	17	—
Tamaki*	I	卅	—	—	—	—	卅	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	—	—	—
	III	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	35	—	—	卅	卅	20	—	—
	IV	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	21	—	卅	卅	卅	—	—	卅	卅	35	—	—
	V	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	25	—	卅	卅	卅	1	—	卅	卅	41	2	—
	VI	卅	卅	卅	卅	—	卅	卅	卅	26	—	卅	卅	卅	2	—	卅	卅	卅	3	—

Note: The same as in Table 1.

(c) 接種菌量 10⁻³ mg の場合

1週間では H₃₇Rv と分離株は集落の発育がなく、青山-B の MIC は 5 mcg/ml。2週間では3供試菌株が 5 mcg/ml。3週間では3供試菌株が 10 mcg/ml。4週間では分離株は 10 mcg/ml、2標準株は 20 mcg/ml。5~6週間では3供試菌株が 20 mcg/ml であった。

(d) 接種菌量 10⁻⁴ mg の場合

1週間では H₃₇Rv と分離株は集落の発育がなく、青山-B の MIC は 5 mcg/ml。2週間では3供試菌株が 5 mcg/ml。3週間では3供試菌株が 10 mcg/ml。4週間では H₃₇Rv と分離株は 10 mcg/ml、青山-B は 20 mcg/ml。5~6週間では3供試菌株が 20 mcg/ml であった。

すなわち、この培地においても接種菌量の多い場合には1週間培養においても集落の発育をみるが、少ない場合には2週間以降で集落の発育を認める。そして接種菌量が多くなると MIC は、わずかに高く表現されてくる傾向が伺われる。しかして実験の範囲内における接種菌量では、感受性株に対する 1314 TH の MIC は、培養期間4週までは培養の週の延長とともにだいたい1濃度ずつ上昇し、4~5週間以降はほぼ横這い状態を示した。

換言すれば、K半流動においてもまた 1314 TH の MIC は、接種菌量による影響は少ないが、培養期間による影響は大きかった。

考 案

耐性検査の成績に影響を及ぼす因子²⁾³⁾のうち、培地調製後の保存温度ならびに保存期間が 1314 TH の結核菌に対する MIC に及ぼす影響については、すでに報告¹⁾した。今回は接種菌量と培養期間が、1314 TH の結核菌に対する MIC に及ぼす影響について、1% 小川とK半流動を用いて実験を行なった。

賀来⁴⁾は集落計数可能な培地における抗結核剤の抗菌力表現の差異に関する研究において、生菌数の減少は濃度の増加に伴い急激であるが、ある濃度からは減少が緩やかになる。したがって接種菌量としては、これらの低感性菌の影響がなくなるように希釈したものをを用いる必要があると述べている。しかし結核菌検査指針⁵⁾に従って、対照培地の集落数が卅~卍になるような菌量、10⁻¹~10⁻⁴ mg を接種して実験を行なった。

一般に抗結核剤の MIC は、接種菌量が多ければ高く表現される^{6)~8)}といわれている。上述のごとく、本実験における 1314 TH の結核菌に対する MIC も、他の抗結核剤におけるごとく、接種菌量が多ければ高く、少なければ低く表現されてくる傾向が認められたが、その影響はわずかであった。それゆえ川合⁹⁾が 10% 牛血清加 Kirchner 培地における 1314 TH の結核菌に対する MIC は、接種菌量の差による影響はほとんどないと述べてい

るとく、日常の耐性検査においては 10^{-3} mg 前後の菌量を接種すれば、接種菌量の差による影響は、あまり考慮する必要はないように思われる。

これに反して、培養期間による影響ははなはだ大きかった。すなわち感受性株に対する 1314 TH の結核菌に対する MIC は、1% 小川においては接種菌量が 10^{-2} ~ 10^{-3} mg の場合、2週間培養では 5 mcg/ml, 3週間培養では 20 mcg/ml, 4~5 週間培養では 50 mcg/ml であり、K 半流動においては接種菌量が 10^{-3} mg の場合、2週間培養では 5 mcg/ml, 3週間培養では 10 mcg/ml, 4週間培養では 10~20 mcg/ml, 5~6 週間培養では 20 mcg/ml であつて、培養期間の延長とともに 1% 小川においては急激に、また K 半流動においては 1 濃度ずつ上昇する。しかし、それぞれの週においては安定した成績を示し、4~5 週以降は両培地ともだいたい横這い状態を示してくることが認められた。したがつて 1314 TH の日常の耐性検査にあつては、菌株を接種して何週後に判定するかによつて成績が著しく影響される点に、とくに留意する必要があると思う。

このように培養期間の延長によつて 1314 TH の結核菌に対する MIC が、急激に上昇するのは、既報の実験成績より勘案して、孵卵器内の温度の影響による力価の低下に基づくものと考えられる。

結 論

H₃₇Rv, 青山-B および未治療の肺結核患者の喀痰より分離した 1 株、計 3 菌株を用いて、接種菌量と培養期間が、1314 TH の結核菌最低発育阻止濃度に及ぼす影響について実験を行なつた。実験には 1% 小川培地と Albumin を 10% の割合に加えた Kirchner 半流動培地を用いた。実験の成績は次のごとくであつた。

1) 1314 TH の結核菌最低発育阻止濃度は、1% 小川培地においても Kirchner 半流動培地においても、接種菌量が多ければ高く、少なければ低く表現されてくる傾向がうかがわれた。

2) 1314 TH の結核菌最低発育阻止濃度は、培養期間による影響ははなはだ大きく、両培地ともその期間が延長すると急激に高く表現されてくるが、その影響は 1% 小川培地のほうがより著しかった。

3) 感受性株に対する 1314 TH の最低発育阻止濃度は、接種菌量 10^{-3} mg の場合、1% 小川培地においては 2週間培養で 5 mcg/ml, 3週間培養で 20 mcg/ml, 4~5 週間培養で 50 mcg/ml であり、Kirchner 半流動培地においては 2週間培養で 5 mcg/ml, 3週間培養で 10 mcg/ml, 4週間培養で 10~20 mcg/ml, 5~6 週間培養で 20 mcg/ml であつて、各週それぞれ安定した成績を示した。

4) 培養期間の延長によつて 1314 TH の結核菌に対する最低発育阻止濃度が、急激に上昇するのは、孵卵器内の温度の影響による力価の低下に基づくものと考えられる。

本論文の要旨は、昭和 42 年 10 月 15 日第 22 回国立病院療養所総合医学会において報告した。

撰筆にあたりご指導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つたことを記して謝意を表明する。

文 献

- 1) 田村昌敏・山崎彰：結核，42：165，昭 42.
- 2) 小川辰次：結核研究の進歩，30：4，昭 36.
- 3) 室橋豊穂(司会)：結核，38：372，昭 38.
- 4) 賀来隆二：結核，38：517，昭 38.
- 5) 厚生省監修：結核菌検査指針，1964.
- 6) 内藤益一他：胸部疾患，2：232，昭 33.
- 7) 河田利延：京都大学結核研究所紀要，7：13，昭 34.
- 8) 吉原宣方：京都大学結核研究所紀要，12：52，昭 38.
- 9) 川合満：京都大学結核研究所紀要，13：184，昭 40.