

培地の pH が Ethambutol の結核菌最低発育 阻止濃度に及ぼす影響

田村 昌敏・高野 了

国立新潟療養所

受付 昭和 43 年 11 月 1 日

EFFECTS OF pH OF MEDIA ON THE MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION OF D-ETHAMBUTOL TO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Masatoshi TAMURA and Satoshi TAKANO

(Received for publication November 1, 1968)

The effect of pH of media on the minimal inhibitory concentration of D-ethambutol to *Mycobacterium tuberculosis* in vitro was investigated. Media used in this study were 1% Ogawa's egg slant and Kirchner's semi-liquid agar media with 10% albumin.

pH of the condense water of Ogawa's medium was adjusted to 6.0, 6.4, 6.8, 7.2 and 7.6 by adding suitable amount of 4% H_2SO_4 and 10% Na_2CO_3 to basal media of 1% Ogawa's egg slant. D-ethambutol was added to each of them at the concentration of 0, 1, 2.5, 5 and 10 mcg/ml. The solution was mixed sufficiently, and 5 ml of them were dispensed into test tubes.

pH of basal medium of Kirchner's semi-liquid agar media was adjusted to 6.0, 6.4, 6.8, 7.2 and 7.6 by adding suitable amount of 4% H_2SO_4 and 10% Na_2CO_3 . After cooling down, albumin was added at the concentration of 10%. D-ethambutol was added to each of them at the concentration of 0, 1, 2.5, 5 and 10 mcg/ml. They were mixed sufficiently, and 5 ml of them were dispensed into test tubes. Before their use, they were stored in an incubator at 37°C for 24 hours so as to confirm the sterility.

The following 7 strains were used in this study: H₃₇Rv, Aoyama-B, 3 strains isolated from previously untreated pulmonary tuberculosis patients and 2 strains isolated from patients who had been treated by anti-tuberculosis chemotherapeutics including D-ethambutol.

The results obtained were summarized as follows:

1) The bacteriostatic effect of D-ethambutol was stronger in alkaline than in acid on both the media.

2) Inter-individual variation of the minimal inhibitory concentration of D-ethambutol to susceptible strains of tubercle bacilli was the least in the media with pH 6.8 interpreted at 3 weeks after inoculation on both the media. The minimal inhibitory concentration of D-ethambutol under this condition was 2.5 mcg/ml on 1% Ogawa's slant and it was 5 mcg/ml in Kirchner's semi-liquid agar media.

* From National Niigata Sanatorium, Akasaka-cho, Kashiwazaki City, Niigata Prefecture: 945 Japan.

既報¹⁾の実験に引き続き耐性培地の pH が, Ethambutol (以下 EB 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 Kirchner 半流動培地 (以下それぞれ 1% 小川, K 半流動と略) を用いて実験を行ない, 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

I. 使用培地

1% 小川と K 半流動を用いて実験を行なった。

1) 1% 小川培地の調製法

予備実験によつて 1% 小川は, 原液を 4% H₂SO₄ と 10% Na₂CO₃ を用いて, pH がそれぞれ 3.8, 4.0, 5.8, 6.6, 7.2 になるように修正し, 全卵を加えて調製すると, 出来上つた培地の凝固水の pH は, それぞれ 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 となることが判明した。そこで培地の凝固水の pH が, それぞれ 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 になるように 4% H₂SO₄ と 10% Na₂CO₃ を用いて原液を修正し, これに D 体 EB の濃度がそれぞれ 0, 1, 2.5, 5, 10 mcg/ml になるように加えて十分混和した後, 中試験管に 5ml ずつ分注, 凝固滅菌して使用した。

2) Kirchner 半流動培地の調製法

4% H₂SO₄ と 10% Na₂CO₃ を用いて, 基汁の pH をそれぞれ 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 に修正し, 冷却をまつて Albumin (榮研) を 10% の割合に加えた。そし

てこれに D 体 EB の濃度が, それぞれ 0, 1, 2.5, 5, 10 mcg/ml になるように加えて十分混和した後, 中試験管に 5ml ずつ分注。37°C 孵卵器に 24 時間納めて雑菌混入のないことを確かめたものを実験に用いた。

II. 供試菌株, 菌株の接種ならびに判定

実験には H₃₇Rv, 青山-B, 未治療肺結核患者の咯痰より分離した 3 株および EB とその他の抗結核剤既治療肺結核患者の咯痰より分離した 2 株の 7 菌株を用いた。供試菌株は 1% 小川に植え継いで 3 週間培養した後, 比濁法によつて 1 mg/ml の菌液を作り 10⁻² 倍希釈して均等化し, その菌液の 0.1 ml, すなわち 10⁻³ mg ずつそれぞれの培地に接種。37°C 孵卵器に納めて 2 週より 6 週まで毎週観察し, 集落の発育状況ならびに程度を記載して成績を判定比較した。

実験の成績

I. 1% 小川培地の pH と EB の結核菌最低発育阻止濃度

表 1 および図 1 に示すごとく, 5 感受性株の 3 週間培養における EB の MIC は, pH 6.0~6.4 では 1 株が 2.5 mcg/ml, 4 株が 5 mcg/ml。pH 6.8 では 5 株とも 2.5 mcg/ml。pH 7.2 では 1 株が 1 mcg/ml, 4 株が 2.5 mcg/ml。pH 7.6 では対照培地に集落の発育を認めることができなかつた。4 週間培養における EB の MIC は, pH 6.0 では 2 株が 5 mcg/ml, 3 株が 10 mcg/ml。pH

Table 1. Influence of pH of 1% Ogawa's Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Observation time (Weeks)	pH of condense water																								
		6.0					6.4					6.8					7.2					7.6				
		mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml				
	0	1	2.5	5	10	0	1	2.5	5	10	0	1	2.5	5	10	0	1	2.5	5	10	0	1	2.5	5	10	
H ₃₇ Rv	III	###	###	++	--	--	###	###	40	--	--	###	++	--	--	--	###	++	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	###	###	##	--	--	###	###	++	--	--	###	##	--	--	--	###	##	--	--	--	--	--	--	--	--
Aoyama-B	III	###	##	##	--	--	###	###	##	--	--	###	##	--	--	--	##	20	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	###	###	###	60	--	###	###	###	1	--	###	###	70	--	--	###	##	--	--	--	--	--	--	--	--
Fueki*	III	++	160	--	--	--	++	180	--	--	--	##	90	--	--	--	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	##	##	++	--	--	##	##	++	--	--	##	++	--	--	--	##	++	--	--	--	--	--	--	--	--
Tamaki*	III	###	##	90	--	--	###	##	70	--	--	###	##	--	--	--	##	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	###	###	##	10	--	###	###	##	--	--	###	###	--	--	--	###	##	--	--	--	--	--	--	--	--
Naito*	III	###	##	40	--	--	###	##	++	--	--	###	++	--	--	--	##	3	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	###	###	##	17	--	###	###	##	14	--	###	##	--	--	--	###	++	--	--	--	--	--	--	--	--
Tanabe**	III	80	--	--	--	--	90	--	--	--	--	110	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	++	++	60	--	--	++	++	60	--	--	++	90	--	--	--	80	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Homma**	III	++	++	180	--	--	###	###	##	++	--	##	##	##	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	IV	###	###	###	###	##	###	###	###	##	##	###	###	##	++	--	##	++	++	80	--	--	--	--	--	--

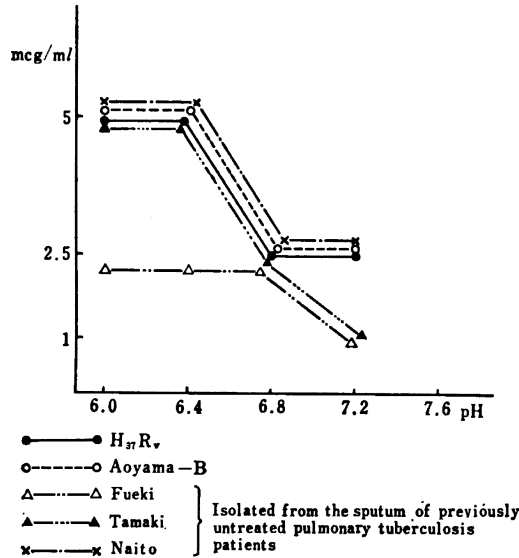
* Strains isolated from the sputum of previously untreated pulmonary tuberculosis patients.

** Strains isolated from the sputum of pulmonary tuberculosis patients who had been treated with ethambutol and other antituberculous drugs.

6.4では3株が5mcg/ml, 2株が10mcg/ml. pH 6.8では4株が2.5mcg/ml, 1株が5mcg/ml. pH 7.2では5株とも2.5mcg/ml. pH 7.6ではこの週においても対照培地には, 集落の発育を全く認めなかつた。

EB 既治療の2分離株の3週間培養におけるMICは, pH 6.0では1株が1mcg/ml, 1株が5mcg/ml. pH

Fig. 1. Minimal Inhibitory Concentration of D-ethambutol on 1% Ogawa's Egg Slant to Susceptible Myc. Tuberculosis Interpreted at 3 Weeks After Inoculation



6.4~6.8では1株が1mcg/ml, 1株が10mcg/ml. pH 7.2~7.6では2株とも集落の発育は認めなかつた。4週間培養におけるMICは, pH 6.0~6.4では1株が5mcg/mlで, 1株は10mcg/mlでも集落の発育を阻止できなかつた。pH 6.8では1株が2.5mcg/ml, 1株が10mcg/ml. pH 7.2では1株が1mcg/ml, 1株が10mcg/ml. pH 7.6では2株とも集落の発育は, 認められなかつた。

II. Kirchner 半流動培地の pH と EB の結核菌最低発育阻止濃度

表2および図2に示すごとく, 5感受性株の3週間培養におけるEBのMICは, pH 6.0では1株が2.5mcg/ml, 1株が5mcg/ml, 3株が10mcg/ml. pH 6.4では3株が5mcg/ml, 2株が10mcg/ml. pH 6.8では5株とも5mcg/ml. pH 7.2では2株が2.5mcg/ml, 3株が5mcg/ml. pH 7.6では2株が1mcg/ml, 2株が2.5mcg/ml, 1株が5mcg/mlであつた。4週間培養におけるMICは, pH 6.0では1株が5mcg/ml, 4株が10mcg/ml. pH 6.4では3株が5mcg/ml, 2株が10mcg/ml. pH 6.8では4株が5mcg/ml, 1株が10mcg/ml. pH 7.2では2株が2.5mcg/ml, 3株が5mcg/ml. pH 7.6では1株が2.5mcg/ml, 4株が5mcg/mlであつた。

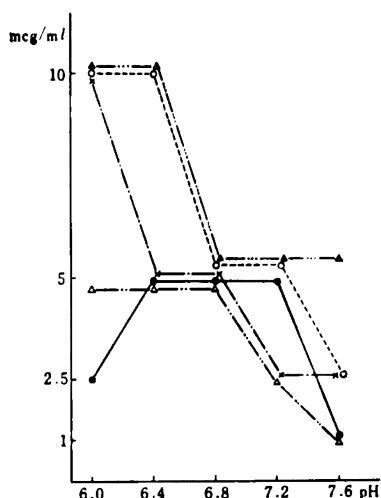
EB 既治療の2分離株の3週間培養におけるMICは, pH 6.0では1株が10mcg/ml, 1株は10mcg/mlでも集落の発育を認めた。pH 6.4では1株が5mcg/ml,

Table 2. Influence of pH of Kirchner's Semi-liquid Agar Media on the Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Observation time (Weeks)	pH of basal medium																								
		6.0					6.4					6.8					7.2					7.6				
		mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml					mcg/ml				
H ₃₇ Rv	III	+++	++	-	-	-	+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-	++	++	+	-	-	20	-	-	-	-
	IV	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-	++	++	+	-	-
Aoyama-B	III	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++	-	-	++	+	-	-	-
	IV	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++	-	-
Fueki*	III	++	++	+	-	-	+++	+++	++	-	-	++	++	20	-	-	++	30	-	-	-	15	-	-	-	-
	IV	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	-	-	-	++	40	-	-	-
Tamaki*	III	+++	+++	+++	++	-	+++	++	++	+	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	7	-	-	++	++	+	-	-
	IV	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-
Naito*	III	+++	+++	+++	25	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+	-	-	+++	+++	-	-	-	++	+	-	-	-
	IV	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	++	++	15	-	-
Tanabe**	III	+++	+++	+++	25	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+	-	-	+++	+++	-	-	-	++	+	-	-	-
	IV	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	++	++	15	-	-
Honma**	III	++	++	++	++	+	++	++	++	++	20	++	++	++	+	-	++	++	++	+	-	40	30	40	-	-
	IV	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	-	++	++	++	+	20

Note: The same to note in Table 1.

Fig. 2. Minimal Inhibitory Concentration of D-ethambutol in Kirchner's Semi-liquid Agar Media to Susceptible Myc. Tuberculosis Interpreted at 3 Weeks After Inoculation



Note: The same to note in Fig. 1.

1株は10 mcg/mlでも集落の発育を認めた。pH 6.8では1株が5 mcg/ml, 1株が10 mcg/ml。pH 7.2では1株が2.5 mcg/ml, 1株が10 mcg/ml。pH 7.6では1株が2.5 mcg/ml, 1株が5 mcg/mlであった。4週間培養におけるMICは、pH 6.0と6.4では2株とも3週間培養と同じであった。pH 6.8では1株が5 mcg/ml, 1株は10 mcg/mlでも集落の発育を認めた。pH 7.2では2株とも3週間培養と同じで1株は1 mcg/ml, 1株は10 mcg/ml。pH 7.6では1株が5 mcg/ml, 1株は10 mcg/mlでも集落の発育を認めた。

すなわちEBのMICは1%小川においてもK半流動においても、pHが酸性側に傾くと高く、アルカリ性側に傾くと低く表現されてくる。

また5感受性株に対するEBのMICは、両培地ともpHが6.8, 3週間培養において安定した成績を示し、1%小川では2.5 mcg/ml, K半流動では5 mcg/mlであった。

考 案

培地のpHとEBのMICに関する文献は、比較的少ないようであるが、抗結核剤のMICが培地のpHによつて影響を受けやすいことは、周知の事実である²¹⁾。それ故にEBについても耐性検査における培地の至適pHを知っておくことは、意味のないことではないと考えられる。既報の実験に続いて本問題に関し、1%小川とK半流動を用いて実験を行ない、上述のごとき成績を得た。

感受性株に対する1%小川, 3週間培養におけるEB

のMICは、pH 6.0~6.4では2.5~5 mcg/ml, pH 6.8では実験に用いた感受性株の全部が2.5 mcg/ml, pH 7.2では1~2.5 mcg/ml, pH 7.6では対照培地にも集落の発育を認めなかつた。また4週間培養におけるMICは、pH 6.0~6.4では5~10 mcg/ml, pH 6.8では2.5~5 mcg/ml, pH 7.2では感受性株の全部が2.5 mcg/ml, pH 7.6ではこの週でも対照培地に集落の発育を認めなかつた。すなわち1%小川においてはpH 6.8, 3週間培養とpH 7.2, 4週間培養の際に、実験に用いた感受性株の全部のMICは同じで2.5 mcg/mlであつて、最も安定した成績を示している。しかし、結核菌の発育はpH 6.8において最も良好である²⁾。したがつてEBの耐性検査も培地のpH 6.8で実験すべきことは、ここに改めて論ずるまでもないと思う。

感受性株に対するKirchner半流動, 3週間培養におけるEBのMICは、pH 6.0では2.5~10 mcg/ml, pH 6.4では5~10 mcg/ml, pH 6.8では実験に用いた感受性株の全部が5 mcg/ml, pH 7.2では2.5~5 mcg/ml, pH 7.6では1~5 mcg/mlであつた。また4週間培養におけるMICは、pH 6.0~6.8では5~10 mcg/ml, pH 7.2~7.6では2.5~5 mcg/mlであつた。すなわち、この培地においてもpH 6.8, 3週間培養におけるMICが、最も安定した成績を示した。

上述のごとくEBのMICは、両培地ともpHが酸性側において高く、アルカリ性側において低く表現されてくる。この点に関しては岩井²⁾が10%牛血清加Kirchner液体培地を用いて行なつた実験と同じであつた。すなわち氏の成績によれば、EBのMICは接種菌量0.01 mg, 4週間培養の場合、培地のpH 5.5では6.25 mcg/ml, pH 6.5では3.13 mcg/ml, pH 7.5では1.56 mcg/mlであつた。

一般に抗結核剤のMICは、1%小川とK半流動とは等しいか、そうでない場合には後者において低く表現されてくるのが普通である。しかしEBでは逆であつて、前者の方が後者におけるよりも1濃度ではあるが、低く表現されてくるのが特徴的である。

結 論

培地のpHがD体Ethambutolの結核菌最低発育阻止濃度に及ぼす影響について、1%小川培地とAlbumin(栄研)を10%の割合に加えたKirchner半流動培地を用いて実験を行なつた。実験にはH₃₇Rv, 青山-B, 未治療肺結核患者の喀痰より分離した3株およびEBとその他の抗結核剤既治療肺結核患者の喀痰より分離した2株の7菌株を用いた。実験の結果、次の成績を得た。

1) Ethambutolの結核菌最低発育阻止濃度は、両培地ともpHが酸性側において高く、アルカリ性側において低く表現されてくる。

2) 感受性結核菌に対するD体 Ethambutol の最低発育阻止濃度は、両培地とも pH 6.8, 3週間培養において最も安定した成績を示し、1% 小川培地においては 2.5 mcg/ml, Kirchner 半流動培地においては 5 mcg/ml であった。

本論文の要旨は、昭和42年4月5日第42回日本結核病学会において報告した。

撰筆に当たりご校閲を賜わった所長江川三二博士に感謝します。なお本研究は厚生省一般研究費と科研化学株

式会社よりD体 Ethambutol 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) 田村昌敏・高野了：日本胸部臨床に投稿中。
- 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) 田村昌敏・高野了：結核, 41:517, 昭 41.
- 5) 岩井嘉一：京都大学結核研究所紀要, 14:99, 昭 41.