

耐性培地の保存温度ならびに保存期間が D 体 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

INFLUENCE OF PRESERVATION TEMPERATURE AND PERIOD OF
MEDIA USED FOR DRUG SENSITIVITY TEST ON MINIMAL
INHIBITORY CONCENTRATION OF D-ETHAMBUTOL TO
THE GROWTH OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Masatoshi TAMURA and Satoshi TAKANO

(Received for publication November 1, 1968)

The influence of preservation temperature and period of media used for drug sensitivity test on the minimal inhibitory concentration of D-Ethambutol to the growth of *Myco. tuberculosis* was investigated.

Media used were 1% Ogawa's egg slant and Kirchner's semi-liquid agar media with 10% albumin. pH of the former was adjusted to 6.8 by suitable combination of 4% H₂SO₄ and 10% Na₂CO₃, and pH of the basal media of the later was adjusted to 6.8. The concentration of D-Ethambutol added to the media was 0, 1, 2.5 and 10 mcg/ml. The media were dispensed into test tubes each 5 ml. Kirchner's semi-liquid agar media was used after being stored in an incubator at 37°C for 24 hours in order to confirm the sterility.

After preparation, the media were stored at 5°C, 20°C, 30°C and 37°C for 1, 2, 3, 4, 6 and 8 weeks before their use.

Strains used were H₃₇Rv and a strain isolated from sputa of a pulmonary tuberculosis patient previously untreated with antituberculous drugs. Strains were planted on 1% Ogawa's egg slant before each experiment, and always 3 weeks culture was used for the experiment. 10⁻⁸ mg of the strains were inoculated on each media stored at different temperature for 0 to 8 weeks.

The results obtained were summarized as follows :

1) On both media, the minimal inhibitory concentration of D-Ethambutol on the growth of *Myco. tuberculosis* became slightly higher in accordance with the increase of preservation temperature and the prolongation of the preservation period. This effect was more marked on Kirchner's semi-liquid agar media than on 1% Ogawa's egg slant.

2) If the 3 weeks culture was inoculated on the medium immediately after preparation, the minimal inhibitory concentration of D-Ethambutol to the growth of *Myco. tuberculosis* was 2.5 mcg/ml on 1% Ogawa's egg slant and 5 mcg/ml in Kirchner's semi-liquid agar media.

* From Niigata National Sanatorium, Akasakacho, Kashiwazaki City, Niigata Prefecture-945 Japan.

既報¹⁾の実験に続いて、現在我国において各種の抗結核剤の耐性検査に、最も広く用いられている1%小川培地（以下1%小川と略）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K半流動と略）を用いて、耐性培地調製後の保存温度ならびに保存期間が、D体 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実験を行なつたので、その成績を報告する。

実験の方法

I. 使用培地

実験は1%小川とK半流動を用いて行なつた。

1) 1%小川培地の調製法

出来上つた培地の凝固水のpHを6.8にするために、原液を4% H₂SO₄と10% Na₂CO₃を用いてpH 5.8に修正してから全卵（pH 6.4）を加えた。そして、更に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、加熱凝固滅菌して実験に用いた。

2) Kirchner 半流動培地

4% H₂SO₄と10% Na₂CO₃を用いて基汁のpHを6.8に修正滅菌後、Albumin（栄研）を10%の割合に加えた。Albuminを加えても培地のpHには変化はなかつた。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ずつ分注調製し、更に37°C 孵卵器内に24時間納めて、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2種類の耐性培地は、直ちに5°C 冷蔵庫と20°C, 30°C および37°C 孵卵器に分納して、1~8週間貯蔵して実験に用いた。

上述の各温度に1~8週間貯蔵した培地は、菌株接種に先だち1%小川は凝固水の、またK半流動は培地のpHを測定したが、それぞれ調製時におけると同様6.8であることを確認することができた。

II. 供試菌株

人型結核菌 H₃₇Rv および未治療肺結核患者の喀痰より分離した1株の2菌株を用いて実験を行なつた。

III. 菌株の接種法

供試菌株は実験培地に接種するに先だち、毎週新たに1%小川に植え継いで、実験培地に接種する際には、常に培養3週間のものを用いた。このようにして作った菌株は、比濁法によつて1mg/mlの均等化した菌液となし、更に10²培希釈し、その0.1ml、すなわち10⁻³mgを各培地に接種した。

なお菌株の接種は、それぞれの温度に0~8週間保存した培地の各1系列について、培地調製直後から8週間

後まで毎週行なつた。

N. 判定

培地に菌株接種後は、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

I. 1%小川培地

1) 調製直後の培地

表1に示すごとく、調製直後の1%小川におけるD体EBのMICは、2供試菌株が3週間培養においても4週間培養においても2.5 mcg/mlであつた。

2) 保存培地

耐性培地調製後、各温度に1~8週間保存した後に、菌株を接種した1%小川におけるD体EB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：保存期間1~8週の培地における2供試菌株のMICは、3, 4週間培養とも調製直後の培地と同様2.5 mcg/mlであつた。

(b) 20°Cに保存した場合：この保存温度においても保存期間1~8週の培地における2供試菌株のMICは、3, 4週間培養とも2.5 mcg/mlであつて、調製直後の培地と同様であつた。

(c) 30°Cに保存した場合：この温度に1~4週間保存した培地における2供試菌株のMICは、3, 4週間培養では2.5 mcg/mlであつて、調製直後の培地におけると同様であつた。しかし6~8週間保存した培地における3週間培養ではH₃₇Rvは2.5 mcg/ml、分離株は5 mcg/ml。4週間培養では両菌株とも5 mcg/mlであつた。

(d) 37°Cに保存した場合：この温度に保存した培地におけるMICは、H₃₇Rvでは1~2週間まで、また分離株では1~4週間保存までは3, 4週間培養で2.5 mcg/mlであつて、調製直後の培地におけると同じであつた。しかしH₃₇Rvは3週間保存培地における3週間培養では2.5 mcg/ml、4週間培養では5 mcg/ml。4~

Table 1. Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to Mycobacterium Tuberculosis with 1% Ogawa's Egg Media Used Immediately after Preparation

| Strain | Observation time (Weeks) | mcg/ml | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------|-----|-----|---|----|
| | | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 |
| H ₃₇ Rv | III | +++ | 150 | — | — | — |
| | IV | +++ | + | — | — | — |
| Yamamoto* | III | ++ | 40 | — | — | — |
| | IV | ++ | 60 | — | — | — |

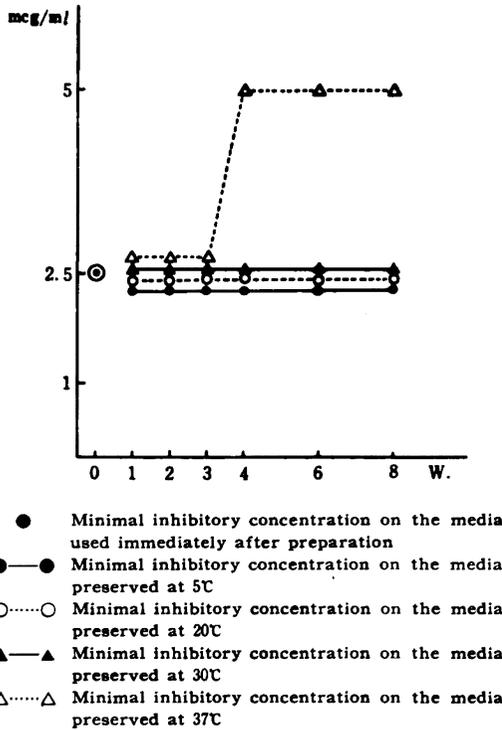
* A strain isolated from the sputum of a pulmonary tuberculosis patient previously untreated with antituberculous drug.

Table 2. Influence of Preservation Temperature and Period of 1% Ógawa's Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to Mycobacterium Tuberculosis

| Preservation temperature of the media | Strain | Observation time (Weeks) | Preservation period of the media | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|---|-----|---------|----|----|---------|---|-----|---------|----|----|---------|---|-----|---------|----|---|---|-----|---|----|---|
| | | | 1 week | | | 2 weeks | | | 3 weeks | | | 4 weeks | | | 6 weeks | | | 8 weeks | | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 10 | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 10 | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | |
| 5°C | H ₉₇ Rv | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Yamamoto* | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 20°C | H ₉₇ Rv | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Yamamoto* | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 30°C | H ₉₇ Rv | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Yamamoto* | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 37°C | H ₉₇ Rv | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Yamamoto* | III | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | IV | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Note: The same as in Table 1.

Fig. 1. Relation between Preservation Period of Media and Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to *H₃₇Rv* (3 weeks' culture was inoculated on 1% Ogawa's egg media preserved at various temperature and period after preparation)



6週間保存培地における3, 4週間培養では5 mcg/ml。8週間保存培地における3週間培養では5 mcg/ml, 4週間培養では10 mcg/ml。分離株は6~8週間保存培地における3, 4週間培養では5 mcg/mlであった。

上述した1%小川調製後の各保存温度における保存期間が、D体EBのMICに及ぼす影響を相関曲線で示せば図1のごとくである(2供試菌株がほぼ等しい傾向の曲線を描く点と、既報の実験成績に鑑み、ここには3週間培養における $H_{37}Rv$ の曲線のみを掲げる)。すなわち保存温度が5°C, 20°Cおよび30°Cの場合は、1~8週間保存まで2.5 mcg/mlであつて、調製直後の培地におけるMICと変化なかつた。しかし37°Cの場合には保存期間1~3週までは、調製直後の培地におけるMICと等しかつたが、4~8週間保存すると、1濃度高く表現されてくる。

換言すれば、1%小川におけるD体EBの結核菌に対する抗菌力は、耐性培地調製後の保存温度が高くなり、かつ保存期間が長くなった場合には、極めてわずかではあるが低下する傾向が窺われた。

II. Kirchner 半流動培地

1) 調製直後の培地

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to *Mycobacterium Tuberculosis* with Kirchner's Semi-liquid Agar Media Used Immediately after Preparation

| Strain | Observation time (Weeks) | mcg/ml | | | | |
|------------|--------------------------|--------|-----|-----|---|----|
| | | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 |
| $H_{37}Rv$ | III | ### | ## | ++ | - | - |
| | IV | ### | ### | ## | - | - |
| Yamamoto* | III | ## | ## | ++ | - | - |
| | IV | ## | ## | ## | - | - |

Note: The same as in Table 1.

表3に示すごとく、調製直後のK半流動におけるD体EBのMICは、2供試菌株が3週間培養においても4週間培養においても5 mcg/mlであつた。

2) 保存培地

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

(a) 5°Cに保存した場合: 保存期間1~3週の培地における2供試菌株のMICは、3, 4週間培養とも調製直後の培地におけると同様5 mcg/mlであつた。しかし $H_{37}Rv$ は4~8週間保存した培地における3週間培養では5 mcg/ml, 4週間培養では10 mcg/ml。分離株は4週間保存した培地における3週間培養では5 mcg/ml, 4週間培養では10 mcg/ml, 6~8週間保存培地では3, 4週間培養とも10 mcg/mlであつた。

(b) 20°Cに保存した場合: この温度の各保存期間における2供試菌株のMICは、それぞれ5°C保存培地の場合と全く同様であつた。

(c) 30°Cに保存した場合: この温度におけるMICは、 $H_{37}Rv$ は1週間保存培地では3, 4週間培養とも調製直後の培地におけると同様5 mcg/ml。2~3週間保存培地では3週間培養で5 mcg/ml, 4週間培養で10 mcg/ml。4~8週間保存培地では3, 4週間培養ともに10 mcg/ml。分離株は1~2週間保存培地では3週間培養で5 mcg/ml, 4週間培養で10 mcg/ml。3~8週間保存培地では3, 4週間培養ともに10 mcg/mlであつた。

(d) 37°Cに保存した場合: この温度におけるMICは、1週間保存培地では2供試菌株が3週間培養で5 mcg/ml, 4週間培養で10 mcg/mlであつた。しかし $H_{37}Rv$ は2~6週間保存培地では3, 4週間培養とも10 mcg/ml。8週間保存培地では3, 4週間培養とも10 mcg/mlで集落の発育を認めた。また分離株は2~4週間保存培地では3, 4週間培養とも10 mcg/ml。6週間保存培地では3週間培養で10 mcg/ml, 4週間培養では10 mcg/mlで集落の発育を認め、8週間保存培地では3, 4週間培養とも10 mcg/mlで集落の発育を認めた。

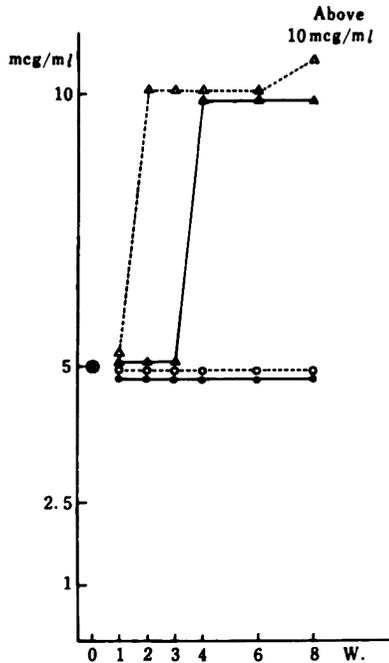
上述のK半流動調製後の各保存温度における保存期間

Table 4. Influence of Preservation Temperature and Period of Kirchner's Semi-liquid Agar Media on the Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to Mycobacterium Tuberculosis

| Preservation temperature of the media | Strain | Observation time (Weeks) | Preservation period of the media | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|----|-----|---------|----|----|---------|----|-----|---------|----|----|---------|----|-----|---------|----|----|----|-----|----|----|----|
| | | | 1 week | | | 2 weeks | | | 3 weeks | | | 4 weeks | | | 6 weeks | | | 8 weeks | | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 10 | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 10 | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 0 | 1 | 2.5 | 5 | 10 | |
| 5°C | H ₉₇ Rv | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 30 | - | - | ## | ## | ## | 20 | - | - | ## | ## | ## | 5 | - |
| | Yamamoto* | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 50 | - | - | ## | ## | ## | 10 | - |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | + | - | - | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## |
| 20°C | H ₉₇ Rv | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 10 | - | - | ## | ## | ## | 8 | - |
| | Yamamoto* | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 20 | - |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 50 | - | - | ## | ## | ## | ## | ## |
| 30°C | H ₉₇ Rv | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 20 | - | - | ## | ## | ## | ## | ## |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 15 | - | - | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## |
| | Yamamoto* | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | ## | ## |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | 8 | - | - | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## |
| 37°C | H ₉₇ Rv | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | + | - | - | ## | ## | ## | 12 | - | - | ## | ## | ## | ## | ## |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## |
| | Yamamoto* | III | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## |
| | | IV | ## | ## | ## | - | - | - | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## | ## |

Note : The same as in Table 1.

Fig. 2. Relation between Preservation Period of Media and Minimal Inhibitory Concentration of D-Ethambutol to $H_{97}R_v$ (3 weeks' culture was inoculated on Kirchner's semi-liquid media stored at various temperature and period after preparation)



Note: The same to as in Fig. 1.

が、D体 EB の MIC に及ぼす影響を相関曲線で示せば、図2のごとくである（この培地においても2供試菌株がほぼ等しい傾向の曲線を描くので、3週間培養における $H_{97}R_v$ の曲線のみを掲げる）。すなわち保存温度が5°Cと20°Cの場合には1~8週間保存してもMICは5 mcg/mlであつて、調製直後の培地におけると変化なかつた。30°Cの場合には保存期間が1~3週間までのMICは、調製直後の培地におけると変化なかつたが、4~8週間保存すると10 mcg/mlとなり1濃度高く表現されてくる。37°Cの場合には、1週間保存では調製直後の培地におけるMICと変りないが、2~6週間保存すると10 mcg/mlとなり、8週間保存すると10 mcg/mlでも集落の発育を阻止することはできなかつた。

換言すれば、K半流動におけるD体 EB の結核菌に対する抗菌力は、耐性培地調製後の保存温度が高くなり、かつ保存期間が長くなると明らかに低下してくることが認められる。

考 案

既報の実験^{1,2)}によつてD体 EB の結核菌に対するMICは、接種菌量が増した場合と培養の期間が延長した場合には、高く表現されてくる傾向が認められるこ

と、また他の抗結核剤^{3,4)}とやや趣を異にし、培地の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とを知つた。

前報に続いて、各種抗結核剤の耐性検査に現在我国において最も広く用いられている1%小川と、いずれの抗結核剤にも安定した抗菌力を示す⁵⁾といわれているK半流動を用いて、耐性培地調製後の保存温度ならびに保存期間が、D体 EB の結核菌に対するMICに及ぼす影響について実験を行なつて、上述のごとき成績を得た。

すなわち1%小川では保存温度が5°C、20°C、30°Cにおいては保存期間1~8週まで、37°Cにおいては1~3週まで2.5 mcg/mlであつて、調製直後の培地におけるMICと変わらなかつた。しかし37°Cで4週間以上保存した培地におけるMICは5 mcg/mlとなり、1濃度高く表現されてくる。

K半流動では保存温度が5°C、20°Cにおいては保存期間1~8週まで、30°Cにおいては1~3週まで、37°Cにおいては1週まで5 mcg/mlであつて、調製直後の培地におけるMICと変わらなかつた。しかし30°Cにおいては3~8週で、37°Cにおいては2~6週保存で10 mcg/ml。37°C 8週保存では10 mcg/mlで集落の発育を認めた。

換言すれば、実験に使用した2種類の培地におけるD体 EB の抗菌力は、調製後の保存温度が高いほど、そして保存期間が延長されるほど1314 THのように顕著ではない⁶⁾が、わずかに低下することが認められた。しかし、これらの2因子による影響は、他の抗結核剤におけるとは異なり、K半流動の方が1%小川におけるよりもやや大きかつた。

上述の成績は、岩井⁷⁾がEBはKM、1314 TH等の主要二次抗結核剤に比較して培地によるMICの差が極めて小さいこと、更に培地内で安定した力価を保つことを培地置換培養法による検討で明らかにし、これらの事はEBに対する耐性検査を使用培地の成分および耐性培地の保存による力価の低下を顧慮せずに行ないうること示唆していると述べているごとく、日常の耐性検査においては、1%小川は調製後1ヵ月以内に使用するならば、冬夏を問わず保存温度による力価の低下を考慮に入れても差支えないことを示し、K半流動は我国の夏季には調製後可及的早く使用しないと力価が低下することを示唆しているものと考えられる。

結 論

耐性培地調製後の保存温度と保存期間とが、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10%の割合にAlbuminを加えたKirchner半流動培地を用いて実験を行なつた。実験には人型結核菌 $H_{97}R_v$ と未治療の肺結核患者の喀痰

より分離した結核菌1株の2菌株を用いた。実験の結果次の成績を得た。

1) 両培地とも保存温度が高くなり、かつ保存期間が延長されるとD体 Ethambutol の結核菌最低発育阻止濃度は、わずかではあるが高く表現されてくる。これらの両因子による影響は、Kirchner 半流動培地の方がやや大きかった。

2) 調製直後の培地における3週間培養のD体 Ethambutol の結核菌最低発育阻止濃度は、1% 小川培地においては 2.5 mcg/ml であつて、Kirchner 半流動培地においては 5 mcg/ml であつた。

稿を終わるに当りご指導ご校閲を賜つた所長江川三

二博士に深謝します。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 Ethambutol 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・高野了：日本胸部臨床，27：289，昭43.
- 2) 田村昌敏・高野了：結核，44：19，昭44.
- 3) 田村昌敏・高野了：結核，40：213，昭40.
- 4) 田村昌敏・高野了：結核，41：517，昭41.
- 5) 賀来隆二：結核，38：517，昭38.
- 6) 田村昌敏・山崎彰：結核，42：165，昭42.
- 7) 岩井嘉一：京都大学結核研究所紀要，14：99，昭41.