

## 結核耐性培地の力価検定法に関する検討 (第2報)

金 沢 裕・倉 又 利 夫

新潟鉄道病院内科・薬剤科

受付 昭和 45 年 9 月 9 日

STUDIES ON THE ASSAY METHOD OF MICROBIOLOGICALLY  
ACTIVE CONCENTRATIONS IN THE SENSITIVITY TEST  
MEDIA FOR ANTITUBERCULOUS AGENTS (IIInd Report)\*

Yutaka KANAZAWA and Toshio KURAMATA

(Received for publication September 9, 1970)

In the previous report, we described an agar plate diffusion method using rapidly growing *Mycobacteria* as test organisms, to evaluate microbiologically active concentrations in the sensitivity test media for antituberculous agents. The present study demonstrates an applicability of the method to recently introduced antituberculous agents such as rifampicin and prothionamide.

In the experiment, the lower limit of concentrations assayable for rifampicin by the method with *Mycob. parafortuitum* H-7 as test organism was 1  $\mu\text{g/ml}$  on Ogawa's 1% egg medium and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  on Kirchner's semisolid medium, whereas the same for prothionamide with *Mycob. fortuitum* 238 as test organism was 12.5  $\mu\text{g/ml}$  on Ogawa's medium and 2.5  $\mu\text{g/ml}$  on Kirchner's semisolid medium.

The two sensitivity test media were examined by this method for possible changes in the potency following heat coagulation and preservation. Heat coagulation (90°C for 60 minutes) caused only a slight loss of potency, while there was evidence of apparent diminution of active potency following preservation for two or three months even at 4°C. When the media were stored at room temperature and at 37°C, the tendency for loss of potency was more marked.

These findings indicate the importance of taking sufficient account in reading the results of the test with these media especially when they are used after prolonged preservation or when the results are read after long term incubation.

*Mycob. parafortuitum* H-7 and *Mycob. fortuitum* 238 (inoculum size : 0.1, 0.01 and 0.001 mg) were assayed for their drug sensitivity by the reference technique on a series of sensitivity test media containing various antituberculous agents stipulated by "The Official Guide for Examination of Tubercle Bacilli", by reading the bacterial growth at 24, 48 and 72 hours of incubation. The sensitivity was readable at 24 hours following initiation of incubation in the case of Kirchner's semisolid medium with 0.1 mg of the organisms, and at 48 hours of incubation in the case of Ogawa's medium with the same inoculum size.

The results thereby obtained were as follows (reference strain, antituberculous agent, minimum inhibitory concentration on Ogawa's medium (minimum inhibitory concentration on Kirchner's semisolid medium) : *Mycob. parafortuitum* H-7 ; isoniazid 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), streptomycin 20 (10), kanamycin 100 (10), cycloserin 10 (10), viomycin 12.5 (10), capreomycin

\* From the Department of Internal Medicine and Department of Pharmacy, Niigata Railway Hospital, 1-3-1, Yachiyo, Niigata City 950 Japan.

10 (5), ethambutol 1 (1) and Mycob. fortuitum 238 ; prothionamide 25 (10).

The results indicate that the potency of sensitivity test media can be checked to some extent within one or two days by determining sensitivity (minimum inhibitory concentrations) of these reference organisms inoculated on the test media under the same condition as described above and by assessing the difference from the afore-mentioned values.

結核耐性培地の力価測定法としては、その培地の使用目的から微生物学的方法が適当と考えられる。結核耐性培地の力価も Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), Viomycin (VM), Capreomycin (CPM), Cycloserin (CS) などは当然抗生物質製剤基準<sup>1)</sup>による bioassay で測定可能と考えられた。しかし実際は雑菌発育防止のために加えられている malachite-green, またはわれわれ<sup>2)</sup>の経験したことであるが、基礎培地としての Kirchner 培地、またはその成分の Albumin の一部の市販品に、同様な目的で加えられている Penicillin が B. subtilis PCI 219 または Staphylococcus aureus FDA 209 P 株などの検定菌に強い発育阻止作用を呈するので、製剤基準に掲載されている検定法は必ずしも適用されがたいことが判明した。一方われわれ<sup>3)-7)</sup>はさきに迅速発育型の雑菌性抗酸菌を検定菌とする薄層平板法で INH, Ethambutol (EB), Ethionamide などの抗結核剤の体液中濃度測定法について報告した。このさいの検定菌は当然 malachite-green, Penicillin に感受性が低いので malachite-green 加培地の力価測定に応用しうる可能性があり、本法を用いて PAS を除く INH<sup>2)3)</sup>, SM, KM, Ethionamide, Sulfa 剤, EB, CS, VM, CPM

などの抗結核剤耐性培地の力価を2日程度の期間で定量的に測定しうることを、さらに本法を用いてこれら培地の保存条件による安定性の差を検討報告した。

今回はさらに新しく出現した抗結核剤である Rifampicin (RFP), Prothionamide 耐性培地力価測定として本法が応用しうるかについて検討し、さらにこれら培地の保存による力価の変動を測定した。また薬剤高感受性の迅速発育型抗酸菌を標示菌とする抗結核剤耐性培地の力価の簡単なチェック法についても検討を加えたので報告する。

Table 1. Sensitivity Test Media Used

| Antituberculous agent | Basal medium                                   | Concentration added $\mu\text{g/ml}$ |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| Rifampicin            | Ogawa's 1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ egg medium | 20, 10, 5, 2, 1, 0.5                 |
| Prothionamide         | "  | 50, 25, 12.5                         |
| Rifampicin            | Kirchner's semisolid medium                    | 20, 10, 5, 2, 1, 0.5                 |
| Prothionamide         | "  | 20, 10, 5, 2.5                       |

Table 2. Assay Method for Microbiologically Active Potency in Solid Egg Sensitivity Test Medium

| Test sample : Egg medium to be tested<br>(e.g. 7.0 ml)                                    | Standard sample : Egg medium without antituberculous agent<br>(e.g. 7.0 ml) |
|---|---|
| ↓   | ↓   |
| Break up and homogenize   |   |
| ↓   | ↓   |
| Add newly prepared solution of drug to make to contain standard concentrations            |   |
| Add 1/2 volume (e.g. 3.5 ml) of pH 7.0 phosphate buffer and mix.                          |   |
| ↓   | ↓   |
| Keep for approximately 24 hours at room temperature and shake to mix at times.            |   |
| ↓   | ↓   |
| Centrifuge at 3,000 r.p.m. for 10 minutes, then pipette up the supernatant as sample.     |   |
| ↓   |   |
| Assay microbiologically active drug concentration by the thin agar cylinder-plate method. |   |

**I. Rifampicin, Prothionamide 培地の力価測定について**

**1. 実験材料**

耐性培地: Table 1 に示すような薬剤濃度添加の1%小川培地および Kirchner 半流動寒天培地(結核菌検査指針<sup>9)</sup>による)を被検体とした。

検定菌: われわれの土壌から分離した INH, EB 高感受性の迅速発育型抗酸菌<sup>9)</sup> *M. parafortuitum* H-7 株を RFP に対し, 同様に迅速発育型抗酸菌<sup>9)</sup> *M. fortuitum* 238 株を Prothionamide 測定にそれぞれ用いた。

検定用培地: Trypto soya 寒天培地(日水)を RFP に, 感性ディスク用培地(Mueller-Hinton 変法(日水))を Prothionamide に用い, いずれも malachite-green を 0.0005% に添加使用した。

**2. 実験方法**

検定菌液調製: Tween 80 0.05% 加普通ブイヨンに1白金耳接種, 24時間培養菌液を検定菌接種菌液とした。

検定平板調製: 1) *M. parafortuitum* H-7 株のさいは, 溶解 50°C 程度に保つた培地に接種菌液を 0.5% に加えて混和し, 底の平らな規格型シャーレ(内径 90×90 mm 程度)に 5 ml ずつ均等に分注し, 水平において固めた。

2) *M. fortuitum* 238 株は, 規格型シャーレにあらかじめ 5 ml ずつ分注した平板培地上に接種菌液を 10 倍に希釈してその 1 滴 (0.03 ml 程度)を滴下し, 20 コ程度の小ガラス玉(直径 3~5 mm)をゆり動かして表面接種した。

被検サンプルの調製: 1) 1% 小川培地についてはさきにわれわれ<sup>9)</sup>が行なつたと同様な抽出法 (Table 2)を行ない, 標準および被検サンプルを調製した。

2) Kirchner 半流動寒天培地のさいは, 特別の操作を加えず被検ならびに標準(新たに作製した)培地をそのまま測定サンプルとした。

検定操作: 平板上にカップを立て, 被検ならびに標準サンプルを充たし, 次いで平板を孵卵器に入れ, 37°C に 48 時間程度培養した。

力価測定法: 出現した阻止円直径

を垂直 2 方向より計測し, その平均値を求め, 半対数方眼紙上に, 薬剤濃度を対数日盛で, 阻止円直径を整数目盛でとり, 標準曲線を書いてのち, 被検体の阻止円直径に相当する薬剤濃度を求めて被検濃度とした。

**3. 実験成績**

培地添加薬剤濃度と阻止円の関係: 上述の方法により培地添加標準濃度と阻止円の関係を求めると, いずれの薬剤も Fig. 1 のように両者の間には, ほぼ直線に近い関係の成立することが判明した。またそのさいの測定可能下限濃度は RFP 1% 小川では 1, Kirchner 半流動では 0.1 µg/ml, Prothionamide は 1% 小川では 12.5, Kirchner 半流動では 2.5 µg/ml であつた。したがつて従来のカップ法で代表されている平板拡散法と同様な方式で, 被検培地中の活性力価の測定が可能と考えられ

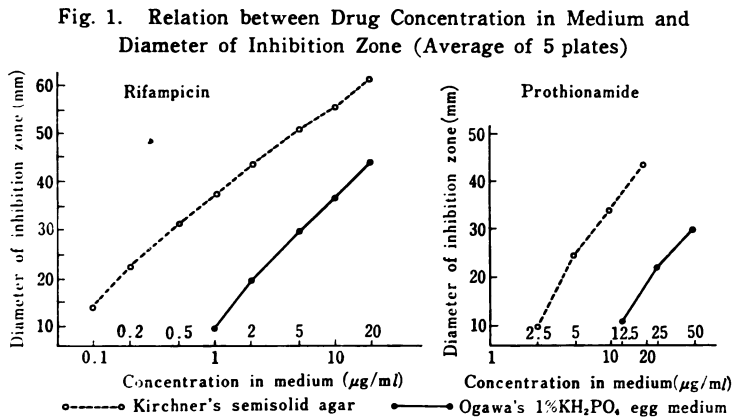


Fig. 2. Stability of Microbiologically Active Potency in Sensitivity Test Medium during Storage

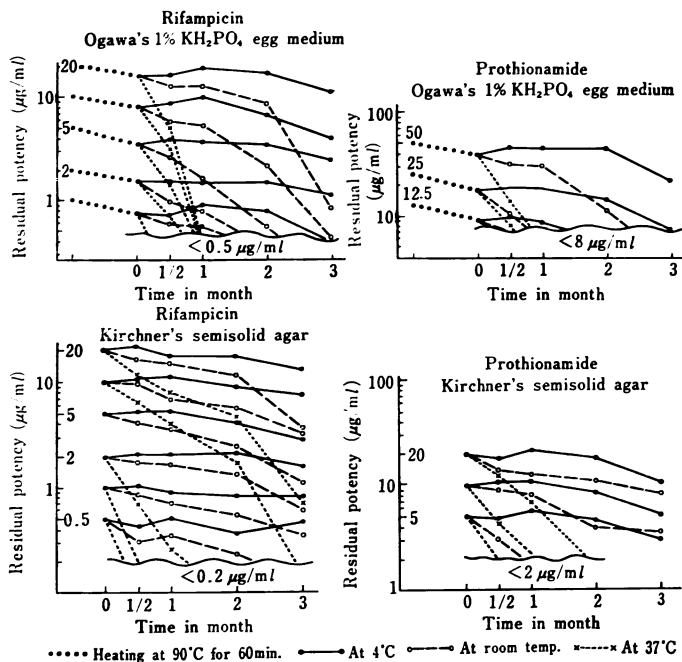


Table 3. Sensitivity of Reference Strains to Various Anti-tuberculous Agents  
Ogawa's 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> egg medium

| Agent                       |                    | INH                  |   |   | SM |     | KM  |      | CPM |    |     | VM   |     | CS |    |    | EB |     |   |    | Control          | Prothionamide |    |    | Control |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|---|---|----|-----|-----|------|-----|----|-----|------|-----|----|----|----|----|-----|---|----|------------------|---------------|----|----|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration added (μg/ml) |                    | 0.1                  | 1 | 5 | 20 | 200 | 100 | 1000 | 10  | 25 | 100 | 12.5 | 125 | 10 | 20 | 40 | 1  | 2.5 | 5 | 10 |                  | 12.5          | 25 | 50 |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Reference strain            |                    | M. parafortuitum H-7 |   |   |    |     |     |      |     |    |     |      |     |    |    |    |    |     |   |    | M. fortuitum 238 |               |    |    |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Incubation time (hr)        | Inoculum size (mg) |                      |   |   |    |     |     |      |     |    |     |      |     |    |    |    |    |     |   |    |                  |               |    |    |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 24                          | 0.1                | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |
|                             | 0.01               | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |
|                             | 0.001              | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |
| 48                          | 0.1                | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + |   |   |   |
|                             | 0.01               | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |   |   |
|                             | 0.001              | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| 72                          | 0.1                | +                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | +  | -   | - | +  | -                | -             | -  | -  | -       | - | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | + |   |   |   |
|                             | 0.01               | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
|                             | 0.001              | -                    | - | - | -  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Kirchner's semisolid agar

| Agent                       |                    | INH                  |   |   | SM |     | KM |     | CPM |    |    | VM |     | CS |    |    | EB |     |   |    | Control          | Prothionamide |    |    | Control |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|---|---|----|-----|----|-----|-----|----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|---|----|------------------|---------------|----|----|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration added (μg/ml) |                    | 0.1                  | 1 | 5 | 10 | 100 | 10 | 100 | 5   | 10 | 50 | 10 | 100 | 10 | 20 | 40 | 1  | 2.5 | 5 | 10 |                  | 5             | 10 | 20 |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Reference strain            |                    | M. parafortuitum H-7 |   |   |    |     |    |     |     |    |    |    |     |    |    |    |    |     |   |    | M. fortuitum 238 |               |    |    |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Incubation time (hr)        | Inoculum size (mg) |                      |   |   |    |     |    |     |     |    |    |    |     |    |    |    |    |     |   |    |                  |               |    |    |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 24                          | 0.1                | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + |   |   |   |   |   |
|                             | 0.01               | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |   |   |   |
|                             | 0.001              | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |
| 48                          | 0.1                | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + |   |   |
|                             | 0.01               | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |   |   |   |
|                             | 0.001              | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |
| 72                          | 0.1                | +                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | +  | -   | - | +  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + |
|                             | 0.01               | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |   |
|                             | 0.001              | -                    | - | - | -  | -   | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -  | -   | - | -  | -                | -             | -  | -  | -       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

た。

保存培地の力価の変動：ついで実際に RFP, Prothionamide 含有 1% 小川培地および Kirchner 半流動寒天培地の生物学的活性力価の変動を、37°C 孵卵器内、室温、冷所 4°C 放置のおのおのについて上述の方法で測定した。Fig. 2 に示すように 1% 小川培地加熱凝固による力価低下は 2つの薬剤とも、必ずしも著しくなかつたが、保存による力価変動は一般に 37°C > 室温 > 4°C の順に、また高濃度培地より低濃度培地の順に、また Kirchner 半流動培地より 1% 小川培地のほうに、それぞれ力価低下の著しい傾向がみられた。すなわち冷室保存でも RFP の小川培地、Kirchner 半流動培地はともに 3 カ月目に、Prothionamide の小川培地、Kirchner 半流動培地はともに 3 カ月目にそれぞれ力価の減

少がみられた。室温保存では RFP の小川培地、Kirchner 半流動培地は 2 カ月目に、Prothionamide の小川培地、Kirchner 半流動培地は 1 カ月目に、それぞれ力価の減少がみられた。また 37°C では両薬剤、両培地ともいずれも 1/2 カ月目にすでに力価の低下傾向のあることが明らかにされた。

#### 4. 考 案

結核耐性培地の定量的力価測定法としては、その使用目的である抗菌力測定にその意味で微生物学的方法が取り上げられるべきと考えられる。われわれ<sup>9)~11)</sup>がさきに報告した迅速発育型の抗酸菌 *M. parafortuitum* H-7 または *M. fortuitum* 238 株などを用いる抗結核剤の体液中濃度測定法が、PAS を除く各種の抗結核剤耐性培地の力価の定量測定法<sup>2)3)</sup>に用いられることを知り、各耐

性培地の保存による力価の変動についてさきに報告した。今回は新抗結核剤としての RFP, Prothionamide についても本法が用いられることを知った。実際に本法によりこれら薬剤耐性培地の保存による力価の変動を検した。その結果 RFP, Prothionamide の両者とも 1% 小川培地, Kirchner 半流動培地のいずれの組合せでも安定性が比較的 low, 冷所 4°C 保存でも 2 カ月までが使用可能限度と考えられた。室温保存ではさらに力価が低下するので, 市販培地として利用される場合には, 輸送などにさいしこの点の注意がとくに必要であろう。さらに 37°C では, 力価の低下が半月以内にみられるので長期培養による判定に当たっては, 正しい結果の得がたいおそれがあることを念頭におく必要があると考えられた。

## II. 迅速発育型抗酸菌を用いる耐性培地力価のスクリーニングについて

前述の方法によれば耐性培地中活性力価の定量的測定が 2 日程度の期間内に可能である。しかし操作が複雑で一般検査室の仕事として行ないがたい。そこで迅速発育型の抗酸菌を用い培地力価のスクリーニング法について実験を行なった。

### 1. 実験材料

被検培地: 結核菌検査指針<sup>9)</sup>による Table 3 に示すような耐性培地を用いた。

標準菌株: 迅速発育型抗酸菌株として前実験で使用した *M. parafortuitum* H-7 株を, Ethionamide, PAS を除く各種抗結核剤に対し, *M. fortuitum* 238 株を Prothionamide に用いた。

### 2. 実験方法

接種菌液の調製: 48 時間培養 1% 小川培地上の菌苔から手振り法により菌液を作製し, その濃度を比濁法により 1 mg/ml に調製した。

菌接種: 原菌液および 10 倍, 100 倍希釈液を 0.1 ml ずつ (すなわち 0.1 mg, 0.01 mg, 0.001 mg ずつ) 接種した。

培養: 37°C に 24, 48, 72 時間培養して, 薬剤非添加の培地と比較して菌発育を肉眼的に観察した。

### 3. 実験成績

各培地の菌発育の程度を  $\rightarrow$   $\equiv$  の 4 段階に判定した。Kirchner 半流動培地では菌コロニーは不完全耐性に相当する試験管では薬剤非添加対照に比し粒状コロニー形成の傾向がほぼ各薬剤共通にみられた。その成績を総括して培地別に示すと Table 3 のようであった。0.1 mg 接種での薬剤非含有培地における菌発育は, Kirchner 半流動培地では 24 時間, 小川培地では 48 時間にそれぞれ認められた。そのさいの菌の薬剤感受性 (最小発育阻止濃度) を使用標準菌株, 薬剤, 1% 小川培地添加濃度, Kirchner 半流動培地添加濃度 (カッコ内),

の順に示すと次のようであった。*M. parafortuitum* H-7 株では INH 0.1 (0.1), SM 20 (10), KM 100 (10), CS 10 (10), VM 12.5 (10), CPM 10 (5), EB 1 (1)  $\mu\text{g/ml}$ , *M. fortuitum* 238 株では Prothionamide 25 (10)  $\mu\text{g/ml}$  であった。

また 72 時間の培養期間中に, 耐性の上昇のみられたものは, 主に不完全耐性を示した *M. parafortuitum* H-7, INH 0.1 (小川, Kirchner) 72 時間, CS 10 (小川, Kirchner) 72 時間, EB 1 (小川, Kirchner) 72 時間, *M. fortuitum* 238 10  $\mu\text{g/ml}$  (小川, Kirchner) 72 時間などであった。

## 4. 考案

結核の市販培地が広く用いられている今日, 使用にさいしてその活性力価が保たれているかということは使用者にとつては最大の関心事であろう。既報<sup>9)</sup> または前項の方法で 2 日程度の期間内で定量的にその力価を算出することはできるが, 一般検査室としては操作が複雑にすぎるところで迅速発育型抗酸菌を標準株として耐性培地力価の著しい低下の有無をチェックする方法を検討した。すなわち薬剤非添加培地に菌発育の認められる 24~48 時間に菌接種被検耐性培地中の菌発育を観察して上述の成績と著しく異なつた値, すなわち小川培地では INH 1, SM 20, KM 100, CPM 10, VM 10, CS 20, EB 2.5, Prothionamide 50  $\mu\text{g/ml}$  以上に, Kirchner 半流動培地では INH 1, SM 10, KM 10, CPM 5, VM 10, CS 10, EB 2.5, Prothionamide 20  $\mu\text{g/ml}$  以上に菌発育のみられた場合は力価の低下の疑いがあり, 検討を要すると考えられる。

*M. parafortuitum* H-7 株は 10 年, *M. fortuitum* 238 株は 9 年程度, われわれが土壌から分離して以来, われわれの保存している株に関しては感受性の変動はほとんどみられないが, 薬剤感受性という生物学的反応は種々条件により影響される可能性があるため, 上述の目的に用いるにはその薬剤感受性をときどきチェックする必要があることはいうまでもない。

## 結 語

1) 結核耐性培地の生物学的活性濃度測定法としてわれわれがさきに報告した迅速発育型の抗酸菌を用いる寒天平板拡散法が RFP, Prothionamide にも適用しうることを知った。

本測定法における成績を薬剤, 検定菌, 測定可能下限 (使用耐性培地) の順で示すと次のようであった。RFP: *M. parafortuitum* H-7, 1 (小川), 0.1 (Kirchner 半流動), Prothionamide: *M. fortuitum* 238, 12.5 (小川), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  (Kirchner 半流動)。

2) 本法を用いて両薬剤耐性培地の加熱凝固, 保存による力価の変動を検した。いずれも加熱凝固による力価

の低下は軽度であつたが、冷所 4°C 保存でも 2~3 カ月で保存による力価の減弱が認められた。室温、37°C ではその傾向は一そう顯著であつた。したがつてこの両者の耐性培地の保存使用、ならびに長期培養による耐性値の判定には十分な配慮が必要と考えられた。

3) 結核菌検査指針により規定された各種抗結核剤耐性培地に *M. parafortuitum* H-7 株または、*M. fortuitum* 238 株を 0.1 mg, 0.01 mg, 0.001 mg に接種した場合の 24, 48, 72 時間における菌発育の状態を観察し、各薬剤に対する感受性を求めた。0.1 mg 接種では Kirchner 半流動培地上では 24 時間、小川培地上では 48 時間で成績の判定が可能であつた。そのさいの成績を菌株、薬剤、小川培地上での最小発育阻止濃度 (Kirchner 半流動培地上での最小発育阻止濃度) の順で示すと次のようであつた。*M. parafortuitum* H-7 : INH 0.1 (0.1), SM 20 (10), KM 100 (10), CS 10 (10), VM 12.5 (10), CPM 10 (5), EB 1 (1)  $\mu\text{g/ml}$ , *M. fortuitum* 238 : Prothionamide 25 (10)  $\mu\text{g/ml}$  であつた。したがつ

て被検培地にこれらの標準菌株を前述と同様条件で接種して感性値 (発育阻止濃度または耐性値) を求め前述の値との差を検討し、1~2 日の短時日で耐性培地力価の低下の有無をある程度チェックすることができると考えられた。

#### 文 献

- 1) 厚生省：抗菌性物質製剤基準，昭 42.
- 2) 金沢裕・倉又利夫：結核，40：108，昭 40.
- 3) Kanazawa, Y. and Kuramata, T.: *Chemotherapy*, 11：176, 1963.
- 4) Kanazawa, Y. and Kuramata, T.: *Ibid*, 12：177, 1964.
- 5) 金沢裕：結核，38：216，昭 38.
- 6) Kanazawa, Y. and Kuramata, T.: *Vth Internationaler Kongress Für Chemotherapie. (Suppl.)*：449, 1967 Wien Österreich.
- 7) 金沢裕・倉又利夫：結核，42：517，昭 42.
- 8) 金沢裕・倉又利夫：結核，39：177，昭 39.
- 9) 日本公衆衛生協会：結核菌検査指針，昭 39.