

原 著

各種の因子が Rifampicin 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
田 村 敏 行・高 野 了

国立新潟療養所

受付 昭和 48 年 7 月 6 日

FACTORS INFLUENCING THE MINIMAL INHIBITORY
CONCENTRATION OF RIFAMPICIN FOR
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Masatoshi TAMURA, Akira YAMAZAKI, Toshiyuki TAMURA
and Satoshi TAKANO

(Received for publication July 6, 1973)

Factors influencing the minimal inhibitory concentration (M.I.C.) of rifampicin for *Myc. tuberculosis* were examined.

Used strains were H37Rv and a strain isolated from the sputa of a previously untreated pulmonary tuberculous patient. 1% Ogawa's egg media and Kirchner's semi-liquid agar media with 10% albumin were used.

Following results were obtained.

- 1) Influence of pH; on alkaline side, the M.I.C. was low with 1% Ogawa's egg media and high with Kirchner's semi-liquid agar media.
- 2) On both media, the more the dose of inoculated bacilli, the higher the M.I.C.
- 3) The longer the inoculation period, the higher the M.I.C., on both media.
- 4) When the media are preserved in high temperature, the M.I.C. of rifampicin became higher in early stage. The longer the preservation period, the higher the M.I.C. And the influence of the preservation temperature was more remarkable in 1% Ogawa's egg media than in Kirchner's semi-liquid agar media.

既報の実験¹⁾によって、培地の pH 6.8, 接種菌量 10^{-3} mg における未治療結核菌株に対する Rifampicin (以下 RFP と略) の結核菌最低発育阻止濃度 (以下 MIC と略) は、1% 小川培地 4 週培養では 10 mcg/ml, 10% Albumin 加 Kirchner 半流動培地では 0.25~0.5 mcg/ml であることが認められた。しかし、各種の抗結核剤の MIC は、種々な因子によって影響を受ける²⁾³⁾が、各

因子による影響の度合は、それぞれの抗結核剤により異なることは、広く知られているところである。著者らは 1% 小川培地と Kirchner 半流動培地を用いて、培地の pH, 接種菌量, 培養期間ならびに培地調製後の保存期間および保存温度の諸因子が、RFP の結核菌に対する MIC に及ぼす影響に関する実験を行い、いささか知見を得たのでその成績を報告する。

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

実験 I. 培地の pH と RFP の MIC

1. 実験方法

1) 使用培地

実験には 1% 小川培地と 10% の割合に Albumin (栄研) を加えた Kirchner 半流動培地 (以下それぞれ 1% 小川, K 半流動と略) を用いた。

2) 培地の調製法

(a) RFP の原液の調製法

Methanol (関東化学, 特級品) 10 ml に RFP 100 mg を溶解して, RFP の原液を作った。

(b) 1% 小川培地

出来上った培地の凝固水の pH が, それぞれ 6.0, 6.4, 6.8, 7.2 および 7.6 になるように H₂SO₄ と Na₂CO₃ を用いて培地の原液を修正した。次いで RFP の原液を滅菌蒸留水を加えて希釈し, 培地内の RFP の濃度がそれぞれ 0, 2.5, 5, 10 および 20 mcg/ml 含まれるように添加してよく混和した後, 中試験管に 5 ml ずつ分注して調製した。

(c) Kirchner 半流動培地

この培地は H₂SO₄ と Na₂CO₃ を用いて基汁の pH をそれぞれ 6.0, 6.4, 6.8, 7.2 および 7.6 に修正滅菌後, Albumin を 10% の割合に加えた。次いで RFP の原液に滅菌蒸留水を加えて希釈し, 培地内の RFP の濃度がそれぞれ 0, 0.1, 0.25, 0.5 および 1 mcg/ml 含まれるように添加してよく混和した後, 中試験管に 5 ml ずつ分注調製し, 37°C 孵卵器内に 1 昼夜収めて, 雑菌混入のないことを確認したうえで, 実験に使用した。

3) 供試菌株

実験には H₃₇Rv 株と未治療肺結核患者の喀痰より分離した 1 株, 計 2 菌株を用いた。

4) 接種菌量

実験には 1% 小川に継代して 3 週間培養した供試菌株を, 比濁法によって 10⁻³ mg ずつ各培地に接種した。

5) 判定

培地に菌株接種後, 37°C 孵卵器に収め, 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。

2. 実験成績

Table 1. Influence of pH of 1% Ogawa's Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for Myc. tuberculosis (Inoculum size : 10⁻³ mg/slant)

Strain	Culture week	pH of condense water					Viable** units					
		6.0		6.4		6.8		7.2		7.6		
		mcg/ml	0 2.5 5 10 20	mcg/ml	0 2.5 5 10 20	mcg/ml	0 2.5 5 10 20	mcg/ml	0 2.5 5 10 20	mcg/ml	0 2.5 5 10 20	None
H ₃₇ Rv	III	##	17 - - -	##	24 - - -	##	20 - - -	##	- - - - -	- - - - -	- - - - -	94
	IV	###	64 4 - -	###	72 - - -	###	73 1 - -	##	- - - - -	- - - - -	- - - - -	103
Kawakami*	III	###	76 - - -	##	34 - - -	##	64 - - -	##	- - - - -	- - - - -	- - - - -	109
	IV	###	150 15 - -	##	37 - - -	###	140 3 - -	##	9 - - - -	- - - - -	- - - - -	122

* Indirect resistance tests for antituberculous drugs with a strain isolated from pulmonary tuberculous patient previously untreated with antituberculous drugs. (Kirchner's Semi-solid Agar Media, 3 weeks culture)

Drug	mcg/ml		Drug	mcg/ml		Drug	mcg/ml	
SM	1	##	C S	20	-	CPM	5	-
	10	-		30	-		10	-
	100	-		50	-		100	-
INH	0.05	-	T H	10	-	VM	10	-
	0.1	-		20	-		100	-
	1	-		30	-	None	Control	##
	5	-	20	##				
PAS	1	-	S F	50	-			
	10	-		100	-			
KM	1	-		E B	1	##		
	10	-	2.5		##			
	100	-	5		-			
			10	-				

** 1% Ogawa's egg media, Inoculum size : 10⁻⁵ mg.

1) 1% 小川培地

表1に示すごとく、3週判定におけるMICは、pH6.0~6.8では2菌株が5mcg/ml。pH7.2では2菌株が2.5mcg/ml。4週判定におけるpH6.0では2菌株が10mcg/ml、pH6.4では2菌株が5mcg/ml、pH6.8では2菌株が10mcg/ml、pH7.2では1株が2.5mcg/ml、1株が5mcg/mlであった。しかし、pH7.6では2菌株とも集落の発育を認めることはできなかった。

2) Kirchner 半流動培地

表2に示すごとく、この培地の3週判定におけるMICは、pH6.0では2菌株が0.25mcg/ml、pH6.4では1株が0.25mcg/ml、1株が0.1mcg/ml、pH6.8では2菌株が0.25mcg/ml、pH7.2・7.6では2菌株とも1mcg/mlであった。

実験 II. 接種菌量と RFP の MIC

1. 実験方法

1) 使用培地

実験Iと同じ。

2) 培地の調製法

実験Iと同様な方法によって、1% 小川は出来上った培地の凝固水のpHを、またK半流動は基汁のpHをそれぞれ6.8に修正して使用した。RFPの添加濃度は、実験Iと同じ。

3) 供試菌株

実験Iと同じ。

4) 接種菌量

1% 小川に継代して3週間培養した菌株を、比濁法によってそれぞれの培地に 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} および 10^{-4} mgずつ接種した。

5) 判定

実験Iと同じ。

2. 実験成績

1) 1% 小川培地

表3に示すごとく、4週判定におけるMICは、接種菌量が 10^{-1} mgでは1株が10mcg/ml、1株が20mcg/ml。 10^{-2} mg・ 10^{-3} mgでは2菌株が10mcg/ml。 10^{-4} mgでは1株が5mcg/ml、1株が10mcg/mlであった。

2) Kirchner 半流動培地

表4に示すごとく、この培地における3週判定のMICは、接種菌量 10^{-1} mgでは1株が0.5mcg/ml、1株が1mcg/ml。 10^{-2} mgでは2菌株が0.5mcg/ml。 10^{-3} mgでは2菌株が0.25mcg/ml。 10^{-4} mgでは1株が0.1mcg/ml、1株が0.25mcg/mlであった。

実験 III. 培養期間と RFP の MIC

1. 実験方法

Table 2. Influence of pH of Kirchner's Semi-solid Agar Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for Mycobacterium tuberculosis (Inoculum size : 10^{-3} mg/slant)

Strain	Culture week	pH of basal medium										Viable ** units
		6.0		6.4		6.8		7.2		7.6		
		mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		None
H ₃₇ Rv	III	## 20	---	## 46	---	### #	---	## 38 41 40	---	## 40 38 43	---	94
	IV	## #	---	### #	---	### # 37	---	### # # # 26	---	### # # # +	---	103
Kawakami *	III	## +	---	##	---	### #	---	## # # # +	---	## # # + 3	---	109
	IV	## #	---	## #	---	### # 48	---	### # # # 6	---	## # # # +	---	122

Note. The same to Table 1.

Table 3. Influence of Quantity of Inoculated Bacilli on 1% Ogawa's Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for Myc. tuberculosis (pH of media : 6.8)

Strain	Culture 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				
H ₃₇ Rv	III	### #	13	---	## #	2	---	## 92	---	## 8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	IV	### # #	---	---	### #	45	---	## #	25	---	## 41	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Kawakami *	III	### #	14	---	## #	---	---	## 110	---	## 15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	IV	### # #	6	---	### #	72	---	## #	12	---	## 92	2	---	---	---	---	---	---	---	---	

Note. The same to Table 1

Table 4. Influence of Quantity of Inoculated Bacilli in Kirchner's Semi-solid Agar Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for *Mycobacterium tuberculosis* (pH of media : 6.8)

Strain	Culture 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	0.1	0.25	0.5	1	0	0.1	0.25	0.5	1	0	0.1	0.25	0.5	1	0	0.1	0.25	0.5	1	
H ₃₇ Rv	III	+++	##	+	-	-	+++	##	+	-	-	+++	+	-	-	-	##	-	-	-	-
	IV	+++	+++	##	+	-	+++	+++	##	-	-	+++	##	+	-	-	+++	+	16	-	-
Kawakami*	III	+++	+++	##	+	-	+++	##	+	-	-	+++	+	-	-	-	##	+	-	-	-
	IV	+++	+++	##	+	-	+++	+++	##	-	-	+++	##	+	-	-	+++	##	+	-	-

Note. The same to Table 1.

+

Table 5. Influence of Culture Period of Inoculated Bacilli on 1% Ogawa's Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for *Mycobacterium tuberculosis* (pH of media : 6.8, inoculum size : 10⁻⁸ mg/slant)

Strain	Culture week	mcg/ml				
		0	2.5	5	10	20
H ₃₇ Rv	II	+	-	-	-	-
	III	##	92	-	-	-
	IV	##	+	25	-	-
	V	##	+	72	-	-
	VI	+++	##	+	-	-
Kawakami*	II	+	-	-	-	-
	III	##	110	-	-	-
	IV	##	+	12	-	-
	V	##	+	38	-	-
	VI	+++	##	46	-	-

Note. The same to Table 1.

実験 II と同じ。

2. 実験成績

培養期間が RFP の MIC に及ぼす影響は、各接種菌量においてほぼ同様な傾向を示すので、ここでは標準的な 10⁻⁸ mg 接種した場合の成績について述べることにする。

1) 1% 小川培地

表 5 に示すごとく、この培地における 2 供試菌株の MIC は全く同じで、2 週間培養では 2.5 mcg/ml、3 週間培養では 5 mcg/ml、4~6 週間培養では 10 mcg/ml であった。

2) Kirchner 半流動培地

表 6 に示すごとく、この培地における MIC も 2 供試菌株が全く同じで、2 週培養では 0.1 mcg/ml、3 週培養では 0.25 mcg/ml、4 週・5 週培養では 0.5 mcg/ml、6 週培養では 1 mcg/ml であった。

Table 6. Influence of Culture Period of Inoculated Bacilli in Kirchner's Semi-solid Agar Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for *Mycobacterium tuberculosis* (pH of media : 6.8, inoculum size : 10⁻⁸ mg/slant)

Strain	Culture week	mcg/ml				
		0	0.1	0.25	0.5	1
H ₃₇ Rv	II	+	-	-	-	-
	III	+++	+	-	-	-
	IV	+++	##	+	-	-
	V	+++	##	+	-	-
	VI	+++	##	+	6	-
Kawakami*	II	##	-	-	-	-
	III	+++	+	-	-	-
	IV	+++	##	+	-	-
	V	+++	##	+	-	-
	VI	+++	+++	##	17	-

Note. The same to Table 1.

Table 7. Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for *Myc. tuberculosis* on 1% Ogawa's Egg Media Used Directly after Adjustment

Strain	Culture week	mcg/ml						
		0	2.5	5	10	20	40	80
H ₃₇ Rv	II	##	-	-	-	-	-	-
	III	##	25	-	-	-	-	-
	IV	+++	+	13	-	-	-	-
Kawakami*	II	##	-	-	-	-	-	-
	III	##	10	-	-	-	-	-
	IV	+++	+	7	-	-	-	-

Note. The same to Table 1.

実験 IV. 耐性培地の保存温度ならびに保存期間と RFP の MIC

1. 実験方法

Table 8. Influence of the Temperature and Period of Preservation of 1% Ogawa's Egg Media on the Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for Mycobacterium tuberculosis (Inoculum size: 10^{-8} mg/slant, pH of media :6.8)

Preservation temperature of the media	Strain	Culture week	Preservation period of the media																													
			1 week			2 week			3 week			4 week			6 week			8 week														
			mcg/ml			mcg/ml			mcg/ml			mcg/ml			mcg/ml			mcg/ml														
5 ° C	H ₃₇ Rv	II	0	2.5	5	10	20	40	80	0	2.5	5	10	20	40	80	0	2.5	5	10	20	40	80	0	2.5	5	10	20	40	80		
		III	##	+	—	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	
		IV	##	+	3	—	—	—	—	—	##	+	8	—	—	—	—	##	+	5	—	—	—	—	##	+	27	—	—	—	—	
		II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
	Kawakami*	III	##	+	—	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	
		IV	##	+	7	—	—	—	—	—	##	+	17	—	—	—	—	##	+	3	—	—	—	—	##	+	13	—	—	—	—	
		II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
		III	##	+	—	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	
	20 ° C	H ₃₇ Rv	IV	##	+	65	—	—	—	—	—	##	+	82	—	—	—	—	##	+	70	—	—	—	—	##	+	2	—	—	—	—
			II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—
			III	##	+	—	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	17	—	—	—	—
			IV	##	+	27	—	—	—	—	—	##	+	117	—	—	—	—	##	+	75	—	—	—	—	##	+	122	—	—	—	—
Kawakami*		II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
		III	##	+	25	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	
		IV	##	+	120	—	—	—	—	—	##	+	52	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	##	+	—	—	—	—	—	
		II	##	2	—	—	—	—	—	—	##	50	—	—	—	—	—	##	72	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
30 ° C		H ₃₇ Rv	III	##	+	5	—	—	—	—	—	##	62	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
			IV	##	+	75	—	—	—	—	—	##	35	—	—	—	—	##	47	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
			II	##	50	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	##	12	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
			III	##	+	60	—	—	—	—	—	##	32	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
	Kawakami*	IV	##	+	135	1	—	—	—	—	##	155	—	—	—	—	##	50	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
		II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	75	—	—	—	—	##	5	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
		III	##	+	7	—	—	—	—	—	##	172	55	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
		IV	##	+	152	—	—	—	—	—	##	52	—	—	—	—	##	155	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
	37 ° C	H ₃₇ Rv	II	##	50	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
			III	##	+	60	—	—	—	—	##	32	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
			IV	##	+	135	1	—	—	—	—	##	155	—	—	—	—	##	50	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
			II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	75	—	—	—	—	##	5	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	
Kawakami*		III	##	+	7	—	—	—	—	—	##	172	55	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
		IV	##	+	152	—	—	—	—	—	##	52	—	—	—	—	##	155	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
		II	##	—	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		
		III	##	+	7	—	—	—	—	—	##	172	55	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—	##	—	—	—	—	—	—		

Note. The same to Table 1.

1) 使用培地

実験Iと同じ。

2) 培地の調製法

両培地とも実験IIと同様にしてpHを6.8に修正後、1%小川にはRFPをそれぞれ0, 2.5, 5, 10, 20, 40および80 mcg/ml ずつ添加して調製。またK半流動にはRFPをそれぞれ0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2および4 mcg/ml ずつ添加して調製した後、37°C 孵卵器に1昼夜収めて雑菌混入のないことを確かめた。かくして調製した培地は、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週間~8週間貯蔵し、実験に用いた。

3) 供試菌株

実験Iと同じ。

4) 菌株の接種法

供試菌株は毎週新たに1%小川に植え継ぎ、実験培地には常に3週間培養したものを、比濁法によって 10^{-3} mg ずつそれぞれ調製直後の培地と5°C, 20°C, 30°C および37°C の各温度に1~8週間保存した培地の1系列に、8週間後まで毎週接種した。

5) 判定

実験Iと同じ。

2. 実験成績

1) 1%小川培地

(a) 調製直後の培地

耐性培地調製後、直ちに菌株を接種した場合におけるRFPのMICは、表7に示すごとく、4週間培養では2供試菌株とも10 mcg/mlであった。

耐性培地調製後それぞれの温度に1~8週間保存し、菌株を接種した場合のRFPのMICは、表8に示すごとくであって、4週間培養における成績は、次のごとくである。すなわち、

(b) 5°C 保存培地

この培地を5°Cに保存して菌株を接種した場合のMICは、2菌株が1週間から8週間保存まで4週判定で10 mcg/mlであった。

(c) 20°C 保存培地

この培地を20°Cに保存した場合のMICは、2菌株が1~4週間まで10 mcg/ml, 6週間では20 mcg/ml, 8週間では40 mcg/mlであった。

(d) 30°C 保存培地

この培地を30°Cに保存した場合のMICは、2菌株が1週間では10 mcg/ml, 2~3週間では20 mcg/ml, 4週間では40 mcg/mlであった。しかし6~8週間保存した場合は80 mcg/mlでも菌株の発育を認めた。

(e) 37°C 保存培地

この培地を37°Cに保存した場合のMICは、1週間では1株が20 mcg/ml, 1株は40 mcg/ml, 2週間では2

Table 9. Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for Myc. tuberculosis in Kirchner's Semi-solid Agar Media Used Immediately after Preparation

Strain	Culture week	mcg/ml						
		0	0.1	0.25	0.5	1	2	4
H ₃₇ Rv	II	##	-	-	-	-	-	-
	III	###	##	-	-	-	-	-
	IV	###	##	##	-	-	-	-
Kawakawi *	II	##	-	-	-	-	-	-
	III	###	##	-	-	-	-	-
	IV	###	##	##	-	-	-	-

Note. The same to Table 1.

菌株が80 mcg/mlであった。しかし3~8週間保存した場合には80 mcg/mlでは2菌株の発育を認めた。

2) Kirchner 半流動培地

(a) 調製直後の培地

K半流動耐性培地を調製して、直ちに菌株を接種した場合におけるRFPのMICは、表9に示すごとく、3週間培養では2供試菌株が0.25 mcg/mlであった。

耐性培地調製後それぞれの実験温度に1~8週間保存し、菌株を接種した場合のRFPのMICは、表10に示すごとくであって、3週間培養におけるMICは、次のごとくである。すなわち、

(b) 5°C 保存培地

この培地を5°Cに保存して菌株を接種した場合のMICは、2供試菌株が1~8週間保存まで0.25 mcg/mlであった。

(c) 20°C 保存培地

この培地を20°Cに保存した場合のMICは、2菌株とも1~6週間までは0.25 mcg/ml, 8週間では0.5 mcg/mlであった。

(d) 30°C 保存培地

この培地を30°Cに保存した場合のMICは、1週間では2菌株が0.25 mcg/ml, 2週間では1株が0.25 mcg/ml, 1株が0.5 mcg/ml, 3~4週間では2菌株が0.5 mcg/ml, 6週間では2菌株が2 mcg/mlであった。しかし8週間保存した場合には2菌株とも4 mcg/mlで発育を認めた。

(e) 37°C 保存培地

この培地を37°Cに保存した場合のMICは、2供試菌株が1週間の保存では0.5 mcg/ml, 2週間では1 mcg/ml, 3週間では2 mcg/mlであった。しかし4~8週間保存した場合には4 mcg/mlで2菌株の発育を認めた。

考 案

使用する培地の種類によってRFPのMICが異なるという報告^{4)~26)}は枚挙にいとまない。既報の実験¹⁾に

よって、未治療肺結核患者の喀痰より分離した菌株に対する RFP の MIC は、培地の pH 6.8, 接種菌量 10^{-3} mg の場合には、1% 小川 4 週培養では 10 mcg/ml であり、また K 半流動 3 週培養では 0.1~0.25 mcg/ml であることが認められた。

抗結核剤の MIC は、種々な因子によって影響を受けるが²⁾³⁾、各因子による影響の度合は、それぞれの抗結核剤により異なることは広く知られているところである。そこで、わが国で広く用いられている 1% 小川と、各種の抗結核剤で最も安定した成績の得られる K 半流動²⁷⁾を用いて、各種の因子が RFP の MIC に及ぼす影響について試験管内実験を行った。

上述のごとく RFP の MIC は、培地の pH がアルカリ側において、1% 小川では低く、K 半流動では高く表現されてくることが認められた。

RFP の水溶液中における安定性に関しては、中性付近では分解速度は遅いが、酸性側では主として Rifamycin AF が分解生成され、弱アルカリ側では主として Rifampicin quinone が分解生成される。しかし強アルカリ側では主に Desacetyl rifampicin が分解生成され²⁸⁾²⁹⁾、このものの抗菌力は RFP のそれより劣る³⁰⁾と報告されている。また既報の実験³¹⁾³²⁾によって 1% 小川においては、pH 7.0 よりアルカリ側では結核菌の発育は漸次悪くなることが認められた。したがって 1% 小川におけるアルカリ側で MIC が低く表現されるのは、本実験の範囲内における弱アルカリでは、RFP の抗菌力はさしたる影響を受けないが、結核菌の発育のほうが悪くなることによるものと推測される。一方、K 半流動においてアルカリ側で、RFP の MIC が高く表現されてくるのは、この培地においては弱アルカリとなっても結核菌の発育はほとんど影響を受けない³¹⁾³²⁾。したがって、RFP の分解による抗菌力の低下によるものと考えられる。しかしこの培地では固形培地と異なり、拡散現象の関与もまた、その一因として無視できないように思われる。

両培地における RFP の MIC は、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ことが認められた。

また培養期間が長くなるほど両培地における RFP の MIC は、高く表現されてくることが認められた。

両培地における RFP の MIC は、保存温度が高いほどきわめて早期に高く、また高い温度に長く保存するほど著しく高く表現されてくることが認められた。しかし、この因子による影響は 1% 小川のほうが、K 半流動よりも著しかった。なお、この保存温度の上昇によって RFP の力価が低下してゆく速度は、Arrhenius の方程式³³⁾に近似しているように思われる。(図 1, 図 2 参照)

上述の成績から RFP の耐性検査の成績に影響を及ぼ

Fig. 1. Relation between Preservation Period of Media and Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for $H_{37}Rv$ (4 weeks' cultivation at each preservation temperature with 1% Ogawa's egg media after preparation, inoculum size: 10^{-3} mg/slant, pH of media: 6.8)

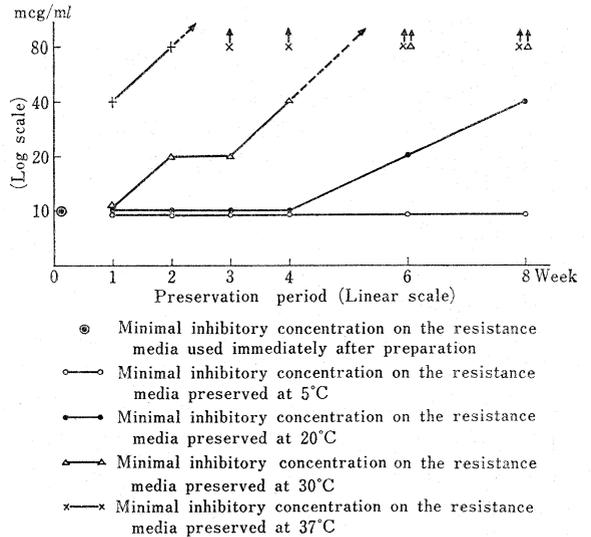
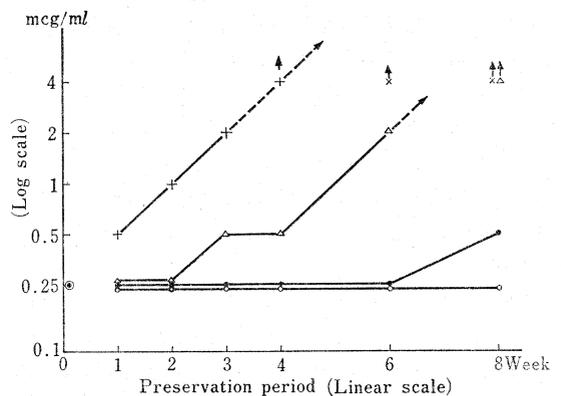


Fig. 2. Relation between Preservation Period of Media and Minimal Inhibitory Concentration of Rifampicin for $H_{37}Rv$ (3 weeks' cultivation at each preservative temperature with Kirchner's semi-solid agar media after preparation, inoculum size: 10^{-3} mg/slant, pH of media: 6.8)



Note. The same to Fig. 1

す諸因子のうち、使用培地の pH, 接種菌量, 培養期間などについては、結核菌検査指針³⁴⁾に準拠して行えば、安定した検査成績が得られるものと思われる。しかしわが国の夏季のごとく、30°C を越す高温多湿の国土においては、耐性培地調製後の保存法とその取扱い方に、特段の注意を払う必要のあることを示唆しているものと考えられる。

結 論

1% 小川培地と 10% Albumin 加 Kirchner 半流動培地を用いて、抗結核剤の MIC に影響を及ぼす各種因子について、Rifampicin の MIC に及ぼす影響に関する実験を行った。実験には H₃₇Rv と未治療肺結核患者の喀痰から分離した 1 株の 2 菌株を用いた。実験の成績は次のごとくであった。

Rifampicin の結核菌最低発育阻止濃度は、

1) 培地の pH がアルカリ側においては、小川培地では低く、Kirchner 半流動培地では高く表現されてくる。

2) 両培地と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。

3) 両培地とも培養期間が長くなるほど高く表現されてくる。

4) 両培地とも調製後の保存温度が高いほどきわめて早期に、また保存期間が長くなるほど著しく高く表現されてくる。しかし、保存温度による響影は、Kirchner 半流動培地よりも小川培地のほうが一層顕著であった。

本論文の要旨は、昭和 48 年 4 月 2 日第 48 回日本結核病学会総会において報告した。

擧筆にあたりご指導、ご校閲を賜った所長江川三二博士に感謝する。なお、本研究は厚生省一般研究費と第一製薬株式会社より Rifampicin の純末の供与を受けて行ったことを記して謝意を表明する。

文 献

- 1) 田村昌敏 他：日本胸部臨床, 30 : 931, 1971.
- 2) 小川辰次：結核研究の進歩, 30 : 4, 1961.
- 3) 室橋豊穂 (司会)：結核, 38 : 372, 1963.
- 4) Pallanza, P. et al : *Arzneim-Forsch. (Drug. Res.)*, 17 : 523, 1967.
- 5) Zubiani, M. et al : *Rev. Tuberc.*, 16 : 225, 1968.
- 6) Vener, F. D. et al : *Arch. Tisiol.*, 23 : 387, 1968.
- 7) Verbist, L. et al : *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 98 : 923, 1963.
- 8) Nitti, V. et al : *Arch. Tisiol.*, 23 : 979, 1968.
- 9) Hussls, H. et al : *Beitr. Klin. Tbk.*, 140 : 1, 1969.
- 10) Verbist, L.: *Transaction of the 27th VA-Armed Forces, Pulm. Dis. Res. Conference*, 1969.
- 11) 堂野前維摩郷 他：日本胸部臨床, 28 : 140, 1969.
- 12) Hobby, G. L. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131 : 323, 1969.
- 13) 岡捨己 他：*Chemotherapy*, 17 : 474, 1969.
- 14) 立花暉夫 他：*Chemotherapy*, 17 : 473, 1969.
- 15) 河盛勇造 他：*Chemotherapy*, 17 : 475, 1969.
- 16) Mc Clatchy, J. K. et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 100 : 234, 1969.
- 17) 副島林造 他：結核, 45 : 50, 1970.
- 18) 丸谷竜司 他：結核, 45, 79, 1970.
- 19) 岡捨己 他：日本胸部臨床, 30 : 79, 1971.
- 20) 河盛勇造 他：結核, 45 : 40, 1970.
- 21) 山本和男 他：診療, 23 : 1292, 1970.
- 22) 遠藤浩一 他：診療, 23 : 1300, 1970.
- 23) 結核療法研究協議会：結核, 45 : 317, 1970.
- 24) Thibault, Ph.: *Prsse Méd.*, 78 : 501, 1970.
- 25) 五味二郎 他：日本胸部臨床, 30 : 90, 1971.
- 26) 高橋欽一 他：日本胸部臨床, 30 : 98, 1971.
- 27) 賀来隆二：結核, 38 : 517, 1963.
- 28) Maggi, N.: *Chemotherapia*, 11 : 285, 1966.
- 29) 佐野光司 他：診療, 23 : 928, 1970.
- 30) 清水喜八郎 他：診療, 23 : 969, 1970.
- 31) 田村昌敏 他：結核, 40 : 213, 1965.
- 32) 田村昌敏 他：結核, 41 : 517, 1966.
- 33) 玉虫文一 他 編集：岩波理化学辞典, 第 3 版, 岩波書店, 1971.
- 34) 厚生省監修：結核菌検査指針, 日本公衆衛生協会, 1972.