

原 著

TUM-N 未使用結核患者から分離した結核菌の
TUM-N に対する感受性について
—TUM-N の耐性検査濃度設定のために—

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎龍郎)

受付 昭和 48 年 5 月 17 日

ON THE SENSITIVITY TO TUM-N OF TUBERCLE BACILLI
ISOLATED FROM TUBERCULOUS PATIENTS WHO
HAD NEVER EMPLOYED TUM-N*

—For Determination of the Critical Concentration of TUM-N Resistance—

Mareichi TOYOHARA

(Received for publication May 17, 1973)

Since the significant antituberculous activity of TUM-N was reported, the systematic clinical study has been continued.

It is expected that TUM-N will be evaluated as an effective drug officially in the near future based on the results of clinical studies, and it becomes necessary to determine the critical concentration of resistance to TUM-N.

The drug concentrations used in the sensitivity tests should be decided at first before studying the critical concentration of resistance. It is convenient to use Ogawa's egg media for resistance test in a clinical laboratory, in this case, however, the decrease of potency of TUM-N should be considered. From this point the decrease of potency of TUM-N in Ogawa's media was examined by the vertical diffusion method, and the sensitivity to TUM-N of the isolated strains from the tuberculous patients were examined. These patients have not employed TUM-N before, and those strains were sensitive to SM, INH and PAS.

1. Decrease of potency of TUM-N in Ogawa's media.

Both 1% Ogawa's media and Kirchner's agar media with 10% horse-serum containing two-fold diluted concentrations in seven series of TUM-N from 1,000mcg/ml to 15.6mcg/ml were prepared.

Each medium was homogenized with the same volume of water in Waring blender. Each homogenate was centrifuged for thirty minutes with 3,000rpm to get supernatant containing each concentration of TUM-N. So the concentrations of supernatant obtained are in series from 500mcg/ml to 7.8mcg/ml. Diluted solutions in series from 500mcg/ml to 7.8mcg/ml by the distilled water were also prepared as the

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

control.

The inhibitory length of growth of tubercle bacilli by such supernatant was measured by the vertical diffusion method using Kirchner's serum-agar media.

The result is shown in Fig. A linear relation was seen between concentration of three kinds of solutions and the inhibitory length on the semilogarithmic scale. A regression line of inhibitory length to concentration of TUM-N is presented in the Figure.

As seen in the Figure, potency of TUM-N in the extract of Ogawa's media was decreased remarkably as compared with that of serum-agar media.

The corresponding concentrations in the same inhibitory length between Kirchner's agar media with 10% horse serum and 1% Ogawa's media are as follows.

Serum-agar media (mcg/ml)	3.2	5	8	10	20	50	70
Ogawa's media (mcg/ml)	25	50	75	90	160	370	500

Potency of TUM-N in Ogawa's media is decreased to about one tenth in the low concentration and to about one seventh in the high concentration compared with that in serum-agar media. From this result four concentrations, namely 10mcg/ml, 25mcg/ml, 50mcg/ml and 100mcg/ml were chosen for the resistance test with 1% Ogawa's media.

2. Sensitivity to TUM-N of the isolated strains from the tuberculous patients.

Twenty-eight sensitive strains to SM, INH and PAS isolated from sputa of the tuberculous patients who have never used TUM-N and VM were employed to know the degree of sensitivity to TUM-N in 1% Ogawa's media.

Sensitivity to VM of such strains was also examined as the control.

The results are shown in Tables 1 and 2. Tables 1 and 2 indicate the results at three and six weeks' observation. As shown in the tables, growth on media containing 10mcg/ml of TUM-N was almost same with that on the control media. Twenty-two among twenty-eight strains did not grow on media containing 25mcg/ml at the third week, but all strains excluding only one grew at the sixth week, though the growth was much less than that on the control media. No strain grew on Ogawa's media containing 50mcg/ml and 100mcg/ml at the third week. At the sixth week sixteen strains (57%) showed small colonies on 50mcg/ml, and four strains showed one or two colonies even on 100mcg/ml.

3. Summary

Decrease of potency of TUM-N in Ogawa's media and sensitivity to TUM-N of twenty-eight strains of tubercle bacilli isolated from sputa of the patients who have never used TUM-N were studied to decide the suitable concentrations for resistance test to TUM-N.

(1) Potency of TUM-N is decreased from about one tenth to one seventh in Ogawa's media compared with that in Kirchner's agar media with 10% serum.

(2) When the resistance tests to TUM-N are carried out by the absolute concentration method using Ogawa's media, three concentrations, that is, 25mcg, 50mcg and 100mcg per ml are recommended. And it is thought that the resistance may be decided by growth on Ogawa's media containing 100mcg/ml.

1. 緒 言

TUM-N のすぐれた抗結核性が発表されて以来¹⁾⁻³⁾, 系統的臨床研究が現在続けられている⁴⁾⁵⁾。その中間成績からみると TUM-N は新抗結核薬として正式に評価される日も遠くはないようである。そのような場合、直ちに問題になるのは耐性基準である。今まで capreomycin (CPM) 等の例にみられたように、臨床使用が正式にされるようになって耐性基準がきめられなかつたため、臨床家は CPM 使用に困惑を感ずることがあつた。このようなことがないように TUM-N の耐性基準は早くきめられるべきであろう。耐性基準をきめるためには耐性検査のための濃度をまず設定しなければならない。臨床検査室で耐性検査を行うには小川培地を使うのが便利であるが、この場合、薬剤の力価低下の問題を考慮に入れる必要がある。TUM-N の結核菌に対する M. I. C. は液体培地あるいは血清加寒天培地では、ほぼ 2.5~5 mcg/ml とされているが¹⁾, 小川培地でどの程度に力価が低下するかをまずしらべ、その結果にもとづいて小川培地内に含有させる TUM-N 濃度をきめた。ついで TUM-N 未使用で SM, INH, PAS に感性の患者分離株をあつめ、その TUM-N に対する感受性を 1% 小川培地を用いてしらべた。

2. 小川培地における TUM-N の力価低下

1. 方法

小川式首まがり試験管に 6 ml の Kirchner 血清加寒天培地を加え平板にかためる。

この培地上に 0.5 mg/ml の H₃₇Rv 0.2 ml を接種し十分、均等に培地上にひろげる。

3日後に下記の所定濃度に TUM-N を含有させた 1% 小川培地または Kirchner 血清加寒天培地 (いずれも 5 ml) を葉じてブレンダー中にとり等量の蒸留水を

加えホモゲナイズしホモジェネイトを 3,000 rpm 30 分遠沈し上清 1 ml を上記の菌を接種した直立拡散用 Kirchner 血清加寒天培地の底面に加え直立させて 37°C で培養する。

14 日後に阻止帯をはかる。

培地中の濃度は下記の通りである。

mcg/ml : 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6

この濃度はそれぞれ 25 倍量の TUM-N 濃度液を調製し、この 0.2 ml を小川または Kirchner 寒天培地 5 ml に加え凝固することによつて得た。

ホモジェネイトする階段で等量の水を加えるので直立拡散培地に加える上清の濃度は 1 ml 中 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 mcg となる。さらにコントロールとして蒸留水で 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 mcg/ml の TUM-N 溶液をつくり、菌を接種した直立拡散培地に加え同様に阻止帯長をはかつた。

2. 成績

図に示す。

3種類の溶液濃度と阻止帯長は片対数グラフで直線関係になつた。濃度 (mcg/ml) を X とし阻止帯長 (mm) を Y としたときの関係式を図中に示す。水と Kirchner 血清加寒天培地抽出液の TUM-N 力価はほぼ等しいが小川培地抽出液の TUM-N 力価はかなり低下していた。

同一阻止帯長における Kirchner 血清加寒天培地と小川培地の対応濃度は下のごとくである。

Kirchner 血清加寒天培地 (mcg/ml) :

2.5, 5, 8, 10, 20, 50, 70

小川培地 (mcg/ml) :

25, 50, 75, 90, 160, 370, 500

小川培地では TUM-N の力価は Kirchner 血清加寒天培地に比べ低濃度では 1/10, 高濃度では 1/7 程度になる。

以上の知見から次項にのべる患者分離株の小川培地を用いての耐性検査には Kirchner 血清加寒天培地を用いたときの M. I. C. の約 10 倍 25~50 mcg/ml を中心とし、その前後の濃度をえらんだ。

3. 患者分離菌の TUM-N に対する感受性

1. 対象ならびに方法

1) 対象

TUM-N および VM 未使用患者の喀痰から分離され、SM, INH, PAS に感性の菌株 28 株と対照として H₃₇Rv を用いた。

2) 使用培地と濃度

前項 2 で得られた結果にもとづき 1% 小川培地に添加濃度 10, 25, 50, 100 mcg/ml になるよう耐性培地をつくる。

対照として同濃度の VM を含有する VM 耐性培地も

Fig. Relation between Concentration of TUM-N in Each Media and Inhibitory Length

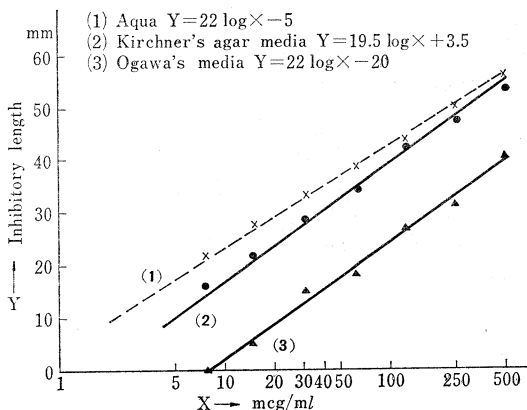


Table 1. Sensitivity to TUM-N of the Isolated Strains (Result at the third week)

Conc. mcg/ml	TUM-N					V M												
	0	10	25	50	100	10	25	50	100									
No. 1	+++	+++	##	##	+	+	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 2	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 3	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 4	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 5	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 6	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 7	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 8	+++	+++	##	##	+	+	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 9	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 10	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
No. 11	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 12	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 13	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 14	+++	+++	##	##	+	+	-	-	-	-	##	##	+	+	+	+	-	-
No. 15	+++	+++	##	##	+	+	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 16	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 17	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 18	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 19	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 20	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 21	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 22	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
No. 23	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 24	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 25	##	##	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
No. 26	+++	+++	##	##	+	+	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 27	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	+	+	-	-	-	-
No. 28	+++	+++	##	##	-	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	-	-
H37 Rv	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

作製し、TUM-N と同時に VM の感受性をしらべた。

3) 接種濃度

分離被検菌株を Dubos 液体培地に 2 回継代し 0.01 mg 相当量を TUM-N および VM 含有培地に接種する。

4) 観察

菌接種後 3 および 6 週とした。

2. 成績

表 1, 2 に示す。

表 1, 2 にみるように TUM-N 10 mcg/ml にはほとんどの菌株が対照ほどではないにしてもよく発育する。25 mcg/ml では、3 週では 28 株中 22 株が発育をみな

Table 2. Sensitivity to TUM-N of the Isolated Strains (Result at the sixth week)

Conc. mcg/ml	TUM-N					VM			
	0	10	25	50	100	10	25	50	100
No. 1	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ +	- -	+++ +++	++ ++	+ +	+ +
No. 2	+++ +++	++ ++	++ ++	+ +	+ ₁ -	+++ +++	++ ++	++ ++	+ +
No. 3	+++ +++	++ ++	- +	- -	- -	++ ++	+ +	+ ₁ -	- + ₁
No. 4	+++ +++	+++ +++	+ +	+ ₁ -	- -	+++ +++	++ ++	+ + ₂	- + ₁
No. 5	+++ +++	++ ++	+ +	+ ₁ -	- -	+++ +++	++ ++	- -	- -
No. 6	+++ +++	+++ +++	+ +	- -	- -	+++ +++	++ ++	- -	- -
No. 7	+++ +++	+++ +++	+ +	- -	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 8	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ ₉ + ₅	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 9	+++ +++	+++ +++	+ +	+ ₁ + ₂	- -	+++ +++	++ ++	- +	- -
No. 10	+++ +++	++ ++	- -	- -	- -	+++ +++	+ +	- -	- -
No. 11	+++ +++	++ ++	+ +	- -	+ ₂ -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 12	+++ +++	+++ +++	++ ++	- -	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 13	+++ +++	+++ +++	++ ++	- + ₁	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 14	+++ +++	++ ++	++ ++	+ +	- -	++ ++	++ ++	+ +	+ ₁₅ + ₃₀
No. 15	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ -	- + ₁	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 16	+++ +++	+++ +++	++ ++	- -	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 17	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ +	- -	++ ++	++ ++	+ +	- -
No. 18	+++ +++	+++ +++	++ ++	- -	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 19	+++ +++	+++ +++	- + ₁	- -	- -	+++ +++	+ +	- -	- -
No. 20	+++ +++	++ ++	+ + ₉	- -	- -	++ ++	++ ++	+ ₂₀ -	+ ₁ + ₁
No. 21	+++ +++	++ ++	+ +	+ -	+ ₁ -	+++ +++	++ ++	+ ₂₀ + ₃	- -
No. 22	+++ +++	++ ++	+ ₁ + ₁	- + ₁	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 23	+++ +++	+++ +++	+ +	- -	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 24	+++ +++	+++ +++	+ +	+ ₃ + ₃	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 25	+++ +++	+++ +++	+ +	+ ₁ + ₁	- -	+++ +++	++ ++	- -	- -
No. 26	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ +	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 27	+++ +++	++ ++	+ +	- + ₁	- -	+++ +++	++ ++	+ +	- -
No. 28	+++ +++	+++ +++	+ +	+ ₁ -	- -	+++ +++	++ ++	+ ₂ + ₂₀	- -
H ₃₇ Rv	+++ +++	++ ++	+ -	- -	- -	++ ++	+ +	- -	- -

かつたが6週では全く発育しなかつたのは1株 (No. 10) のみであつた。しかし発育をみた菌株も対象に比べるとはるかに菌数は少なかつた。

50 mcg/ml, 100 mcg/ml には, 3週では発育した株はなかつたが6週では 50 mcg/ml に微小のコロニーを認めたものが16株 (57%), 100 mcg/ml にも小コロニー

を1~2コ認めたものが4株あつた。

VM感受性は TUM-N感受性とほぼ同じ傾向を示したが, TUM-N 50 または 100 mcg/ml に発育しない株の中に VMの同濃度に僅少の発育をみるものもあつた。

4. 考 察

以上の所見からみると 3 週観察では対照に 4+ に菌の発育がみられる場合でも 25 mcg/ml の濃度で TUM-N に対する耐性の有無を知ることができると思われるが、6 週観察となると 50 mcg/ml または 100 mcg/ml をもつて耐性検査濃度とするのがよいと思われる。

KM, VM, CPM 等他の二次抗生物質の耐性検査と同様に小川培地による 2 濃度⁶⁾をとるとすれば血清加寒天培地の M. I. C. に相当する 25 mcg/ml は 3 週観察における参考資料として一応とつてよいであろう。TUM-N 未使用株の 50 mcg/ml と 100 mcg/ml 上の菌発育状況の差は少なく、また小川培地 100 mcg/ml は実験 2 より血清加寒天培地の約 12 mcg/ml にあたり、TUM-N の M. I. C. から考えてもこの濃度は耐性検査上必要と思われる。

25 mcg/ml には 6 週には未使用株でも相当数の菌が発育するので、耐性の有無は 100 mcg/ml をもつて判定するのがよいであろう。

5. む す び

TUM-N の耐性検査濃度をきめる一助とするために TUM-N の小川培地における力価の低下と TUM-N 未使用患者分離菌 28 株の小川培地上における感受性を検

討し次の結果を得た。

(1) TUM-N は小川培地では血清加寒天培地に比べ 1/10~1/7 程度に力価が低下する。

(2) 小川培地を用い絶対濃度法で TUM-N の耐性検査を行うときの添加濃度としては培地 1 ml あたり 25 mcg, 50 mcg, 100 mcg が好ましいが 2 段階濃度をとるときは 25 mcg, 100 mcg とし耐性の有無は 100 mcg/ml における発育をもつて判定するのがよいと考える。

謝 辞

本実験遂行にあたり望月テル技師の労に負うところが多かつた。記して謝意を表する。また岩崎龍郎所長のご教示とご鞭撻に感謝する。

本論文の要旨は 47 年 6 月日本結核化学療法研究会において発表した。

文 献

- 1) 豊原希一：結核, 47: 181, 1972.
- 2) 大里敏雄・豊原希一：結核, 47: 177, 1972.
- 3) 山本和男・相沢春海・藤田一誠・直江弘昭・津田定成：結核, 48: 23, 1973.
- 4) 高榮：結核, 48: 38, 1973 (第 48 回結核病学会総会発表).
- 5) 日本結核化学療法研究会：結核, 48: 38, 1973 (第 48 回結核病学会総会発表).
- 6) 結核菌検査指針：日本公衆衛生協会, 1972.