

原 著

*Mycobacterium avium* Complex に対する抗結核剤の殺菌作用

束 村 道 雄

藤田学園保健衛生大学医学部微生物学教室

国立療養所中部病院抗酸菌研究施設

受付 平成元年5月11日

BACTERICIDAL ACTIVITY OF ANTITUBERCULOSIS DRUGS AGAINST  
*MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

Michio TSUKAMURA \*

(Received for publication May 11, 1989)

The bactericidal activity of antituberculosis drugs against two strains of *M. avium* complex 13008 (serotype 20) and 13016 (serotype 4), was observed using modified Dubos liquid medium (1.3 g of Dubos Broth Base (Difco) in 180 ml of distilled water plus 20 ml of bovine serum). The strains were most susceptible to antituberculosis drugs among *M. avium* complex strains (Table). The test strains were cultivated in Ogawa egg medium at 37°C for 10 days, and growing colonies were homogenized by shaking with glass beads for 10 minutes and suspended in the modified Dubos liquid medium to a concentration of 2 mg wet weight per ml. The media containing drug and containing no drug were incubated at 37°C for 24 hours under shaking (8 cm-moving range and 56 strokes per minute). After incubation, the medium was diluted by a 0.1% Tween 80 aqueous solution to 10<sup>-7</sup>, and each 0.02 ml-sample of 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-7</sup> suspensions was inoculated onto Ogawa egg medium. The Ogawa egg medium slants were incubated at 37°C for 28 days, and the number of colonies was counted. The bactericidal activity was determined as a ratio of the number of colony-forming units in 10 ml-aliquot of drug-containing Dubos liquid medium against the number of colony-forming units in the control Dubos liquid medium.

The results are shown in Figures 1 and 2. Under the condition tested, rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide and cycloserine did not exhibit any bactericidal activity, and only streptomycin and enviomycin exhibited bactericidal activity. It was remarkable that, although the susceptibility of these two strains to rifampicin was similar to that of *M. tuberculosis* to rifampicin, rifampicin did not exhibit bactericidal activity on these *M. avium* complex strains. Under the same condition, most antituberculosis drugs, rifampicin, isoniazid, streptomycin and enviomycin exhibited bactericidal activity on *M. tuberculosis* (Tsukamura, M., Mizuno, S., Toyama, H., and Ichiyama, S. : *In vitro* bactericidal activity of antituberculosis agents on *Mycobacterium tuberculosis*. Kekkaku 62 : 295-298, 1987). Absence of bactericidal activity of rifampicin and isoniazid against *M. avium* complex seems to explain the fact that infection caused by *M. avium* complex is difficult to cure and often shows relapse.

---

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

**Key words :** *Mycobacterium avium* complex, Antituberculosis drugs, Bactericidal activity

**キーワード :** *Mycobacterium avium* complex, 抗結核剤, 殺菌作用

緒 言

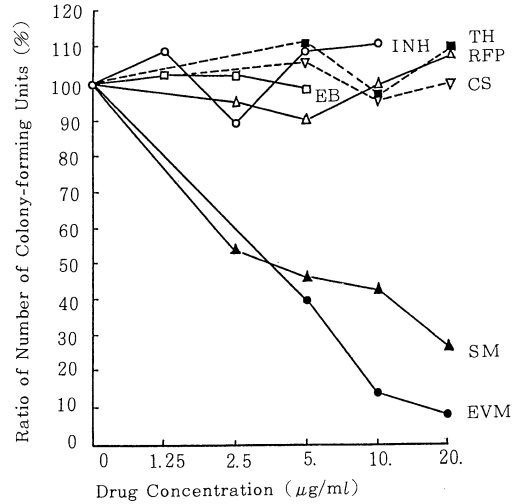
*Mycobacterium avium* complex に対する発育阻止作用については、数多くの報告があるが、その殺菌作用については、ほとんど報告がない。われわれは、今回、*M. avium* complex に対する抗結核剤の殺菌作用について実験したので報告する。

研究方法

菌株としては、前の研究で<sup>1)</sup>、抗結核剤に対して比較的感受性の高い2株を使用した。すなわち、*Mycobacterium avium* complex 13008 株(血清型 20)と 13016 株(血清型 4)である。いずれも、抗結核剤未使用の患者喀痰から分離され、-20°C で保存された。

感受性検査

菌株を小川培地(1%小川培地)に37°C 10日間培養して集落をとり、ガラス玉コルペンで10分間均一化して、0.1% Tween 80 水溶液に浮遊させて、10 mg (湿菌量)/ml の菌液を作った。これを10倍希釈して行き、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> および 10<sup>-7</sup> の希釈液を接種源とした。接種には、渦巻白金耳を用い、各菌液から、1白金耳(0.02 ml) ずつを小川培地斜面に接種した。接種した試験管には、底に3 mm の切れ目の入ったゴム栓をかぶせ、37°C 28日間培養した後、対照培地(薬剤なし)



**Fig. 1.** Bactericidal activity of antituberculosis drugs on *Myobacterium avium* complex strain 13008 in Dubos liquid medium after exposure at 37°C for 24 hours. RFP, rifampicin (△-△); TH, Ethionamide (■-■); EB, Ethambutol (□-□); INH, Isoniazid (○-○); CS, Cycloserine (▽-▽); SM, Streptomycin (▲-▲); EVM, Enviomycin (●-●). The number of colony-forming units contained in a 0.02 ml-sample of the control medium after incubation for 24 hours was (92.0 ± 1.4) × 10<sup>5</sup>.

**Table** Minimal Inhibitory Concentrations of Antituberculosis Drugs against *Mycobacterium avium* Complex Strains

Antituberculosis drug	Minimal inhibitory concentration (µg/ml)	
	Strain 13008	Strain 13016
Rifampicin	1.25	0.63
Ethionamide	5.	5.
Ethambutol	0.63	1.25
Isoniazid	1.25	2.5
Cycloserine	5.	5.
Streptomycin	2.5	2.5
Enviomycin	5.	10.

The susceptibility was tested by the "actual count" method (Tsukamura, M.: "Actual count" method of the resistance test of tubercle bacilli, Japanese Journal of Tuberculosis 12; 46-54, 1964). The minimal inhibitory concentration was determined as the lowest concentration, in which the inoculation of 20 to 100 colony-forming units was completely inhibited after incubation at 37°C for 28 days.

に20~100集落を示した接種系列で、発育完全阻止の起こった最小濃度をもって最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration=MIC) とした。この方法は、著者が以前に発表した“actual count”法<sup>2)3)</sup>である。換言すれば、colony-forming unitsの95%を阻止する濃度にほぼ匹敵する。

小川培地は、165×16.5mmの試験管に7mlずつ分注し、90°C 60分滅菌して斜面とした。抗結核剤は、滅菌前に培地に添加した。次の抗結核剤を使用した。Rifampicin (RFP), ethionamide (TH), streptomycin sulfate (SM), enviomycin sulfate (EVM), isoniazid (INH), ethambutol (EB), D-cycloserine (CS)。RFPとTHはpropylene glycolに溶解し、他は蒸留水に溶解し、その1容を小川培地100容に加えて所要濃度を得た。感受性試験に使用した濃度は次のごとくである。40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16および0 $\mu\text{g/ml}$ 。

#### 殺菌作用検査

菌株は小川培地に培養し(37°C 10日間)、集落をガラス玉コルペンで10分間振盪して均一化し、変法Dubos液体培地に2mg(湿重量)/mlに浮遊させた。この「変法Dubos液体培地」は次の組成である。1.3gの

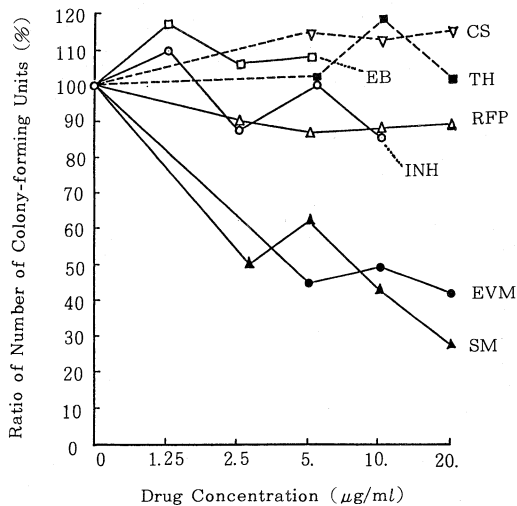


Fig. 2. Bactericidal activity of antituberculosis drugs on *Mycobacterium avium* complex strain 13016 in Dubos liquid medium after exposure at 37°C for 24 hours.

RFP, Rifampicin ( $\triangle-\triangle$ ); TH, Ethionamide ( $\blacksquare-\blacksquare$ ); EB, Ethambutol ( $\square-\square$ ); INH, Isoniazid ( $\circ-\circ$ ); CS, Cycloserine ( $\nabla-\nabla$ ); SM, Streptomycin ( $\blacktriangle-\blacktriangle$ ); EVM, Enviomycin ( $\bullet-\bullet$ ). After incubation for 24 hours, the number of colony-forming units contained in a 0.02ml-sample of the control medium was  $(53, 5 \pm 2.1) \times 10^5$ .

Dubos Broth Base (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)を180mlの蒸留水に溶解し、120°C 15分滅菌した後、これに、20mlの牛血清(榮研、東京)を無菌的に加えた。培地は、10mlずつ、165×16.5mmの試験管に分注した。この培地には、抗結核剤なしの対照と、Fig.1および2に示した濃度の抗結核剤を含有するものを調製した。抗結核剤は、溶液を100°C 5分滅菌した後、培地の1/100量加えて所要濃度とした。対照および薬剤含有培地は、37°C 24時間振盪培養した(振幅8cm, 毎分56 strokes)。

培養後、菌液を駒込ピペットで3分間pumpingし、 $10^{-7}$ まで10倍希釈した(希釈液、0.1% Tween 80水溶液)。 $10^{-3}$ ないし $10^{-7}$ 希釈液の各々から、渦巻白金耳で0.02mlを、薬剤を含め小川培地2本ずつに接種し、37°C 28日間培養した後、集落数を数えた。殺菌力は、次の比で表した。{(薬剤含有変法Dubos液体培地のcolony-forming units)/(対照の変法Dubos液体培地のcolony-forming units)} $\times 100\%$ 。生菌単位(colony-forming units)の測定には、 $10^{-5}$ または $10^{-6}$ 希釈を要したので、培地に含有された抗結核剤は十分希釈され、発育に無影響と考えられた。

#### 研究結果

結果は、Table, Fig.1およびFig.2に示した。この2株の抗結核剤感受性は、比較的高かったが、SMとEVMを例外として、MICよりはるかに高い濃度でも、抗結核剤の殺菌作用は認められなかった。

#### 考察

被検株2株は、前にわれわれが検査した*M. avium* complex 64株の中でも、抗結核剤に対して最も感受性が高い株である(未発表)。RFPのMICは、0.63-1.25 $\mu\text{g/ml}$ 、EBのMICは0.63-1.25 $\mu\text{g/ml}$ であるから、ほとんど*Mycobacterium tuberculosis*のMICに匹敵する。それにもかかわらず、RFP 20 $\mu\text{g/ml}$ 、EB 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも、被検条件下では殺菌作用を認めることができなかった。この2株のINHに対する感受性は、*M. tuberculosis*よりもだいぶ低くて、MICは1.25-2.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、INH 10 $\mu\text{g/ml}$ でも殺菌作用はみられなかった。似たような条件で観察した抗結核剤の*M. tuberculosis*に対する殺菌作用は、RFP 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上、INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以上で著明に認められたので<sup>4)</sup>、*M. avium* complexの場合とは明らかに異なっている。本報で行った実験では、RFP、INH、EB、TH、CSの殺菌作用は認められなかったが、SMおよびEVMの殺菌作用は明らかに認めることができた。

他の著者の成績では、Heifets et al.<sup>5)</sup>は、7H9 broth

を使用し、培養3日後にRFPまたはEBを添加し、2～3日後に生菌単位 (colony-forming units) の減少を認めている。使用濃度はRFP  $4 \mu\text{g/ml}$ 、EB  $30 \mu\text{g/ml}$  である。ただし、EBによる生菌単位の減少は僅少で、それも6日後に起こっている。彼らの実験では、RFP、EBの添加は、培養3日後に行われているので、この時期は、おそらく対数期の初期に相当し、菌が薬剤に対して、より高い感受性を示す時期であったかもしれない。

いずれにしても、前に行った *M. tuberculosis* の場合は、同じ24時間後に、INH、RFP、SM、KM、EVMの殺菌作用がはっきり現れたのであるから、*M. avium* complex の場合とは明らかに異なっている。

*M. avium* complex に対して、RFP、INHなどの殺菌作用が、少なくとも *M. tuberculosis* の場合のようにみられなかったことは、*M. avium* complex 感染症に対する抗結核剤化学療法の効果が今一つ判然としないうことと関係があるかもしれない。そして、*M. avium* complex 感染症の化学療法にSMまたはEVMの使用があるていど意義をもつことが示唆される。

#### 結 論

抗結核剤に対して比較的高い感受性を示す *M. avium* complex 2株に、MIC値をかなり上まわる濃度の抗結

核剤を添付して、その殺菌作用の有無を観察したが、RFP、INH、EB、TH、CSには殺菌作用を認めることができなかった。しかし、SMとEVMには、かなりの殺菌作用があることが分かった。

#### 文 献

- 1) 東村道雄：*Mycobacterium avium* complex の抗結核剤に対する耐性形式，結核，62：445～458，1987.
- 2) 東村道雄：Kanamycinの耐性検査，医学と生物学，49：87～90，1958.
- 3) Tsukamura, M. : "Actual count" method for the resistance test of tubercle bacilli, Jpn J Tuberc, 12 : 46-54, 1964.
- 4) 東村道雄，水野松司，外山春雄他：抗結核剤の結核菌に対する殺菌作用（試験管内実験），結核，62：295～298，1987.
- 5) Heifets, L. B., Iseman, M. D. and Lindholm-Levy, P. J. : Combinations of rifampicin or rifabutin plus ethambutol against *Mycobacterium avium* complex. Bactericidal synergistic, and bacteriostatic additive or synergistic effects. Am Rev Respir Dis, 137 : 711-715, 1988.