

Silicone-Coated Slide Culture Method における 接種菌量と諸種抗結核剤の結核菌発育阻止最低濃 度との関係について

京都大学結核研究所化学療法部（主任教授 内藤 益一）

大学院学生 久 世 文 幸

（本論文の要旨は昭和37年6月第25回日本結核病学会近畿地方会に於いて発表した。）

〔昭39. 1. 14受付〕

緒 言

一般に抗結核剤の制菌力をみる場合、液体培地では培地に発育した菌膜又は菌塊の総量により、固形培地では斜面に発育した集落の数により判定されている。制菌力は培地の種類¹⁾、培地内の血清濃度²⁾、培地の pH³⁾ 等種々の因子によって影響されるが、当研究室の河田⁴⁾は、10%血清加キルヒナー培地に於ける各種抗結核剤の結核菌発育阻止最低濃度（MIC）の接種菌量による変動について検討し、結論として一般的に、抗結核剤の MIC は液体培地を用いると、接種菌量の大なる程上昇する傾向にあり、中でも接種菌量による MIC の差の大なるものとして、PAS, TBI 及び PZA を指摘している。一方、固形培地を用いた場合の接種菌量による MIC の変動については、SM, PAS, 及び INH について吉原⁵⁾ が詳細に検討しているが、この成績を液体培地を用いた河田⁴⁾ の成績と比較すると、液体培地では、接種菌量が 0.001mg から 0.1mg へと増加するに対応して、MIC は夫々、SM では16倍に、PAS では64倍に、又、INH では2倍に上昇しているに対して、固形培地では、INH は同程度の上昇を示すが、SM では4倍に、PAS では8倍の上昇に止っている。

以上の様に、接種菌量による MIC の変動は固形培地よりも液体培地に著しく、このことは液体培地の一つの欠点ということが出来よう。

さて当研究室では、Silicone-Coated Slide

Culture Method (SSC)^{9,10,11)} を薬剤の制菌作用、菌の薬剤に対する感受性(耐性検査)の検査にしばしば用いているので、本法に於ける接種菌量と MIC の検討は实际的に極めて重要な課題である。又この問題は SSC が培地として10%血清加キルヒナー培地、即ち液体培地を用いながら、判定はスライド表面に発育した集落の数によって行われ、判定方法はむしろ固形培地と同じである点からも興味深いものと思われる。そこで、著者は SSC を用いて、MIC に及ぼす接種菌量の影響を検討してみた。即ち Silicone-Coated Slide (SS) 表面に接種する菌量を種々に変えて各種抗結核剤の MIC を求め、接種菌量による MIC の変動が常用の方法（液体培地に所定の菌液を滴下する方法）を用いた場合と如何に異なるかを比較検討した次第である。

実 験 材 料

1) 培 地

培地は、10%牛血清加キルヒナー培地を用い、pH に関しては無修正で使用した。なお無修正の上記10%牛血清加キルヒナー培地の pH は 6.4前後である。

2) 検 体

検討した抗結核剤は、DHSM, PAS, INH, TBI, PZA, VM, KM, CS, Sulfisoxazole (SI), Tetracycline (TC) 及び α -ethyl-thioisonicotinamide (1314TH) の計11種である。DHSM, VM 及び KM は 1g力価入り Vial を滅菌蒸留水で溶解、PAS, PZA 及び TC は粉末を秤量し 70% エチル・アルコールに溶解滅菌して使用した。TBI 及び 1314TH

は粉末を秤量、プロピレングリコールに溶解し加熱滅菌の後使用した。又 INH 及び SI はそれぞれ、2%, 10%のアンブル入溶液をそのまま蒸留水で希釈して使用した。

3) 菌株及び菌液

菌株は、当研究室保存の H₃₇Rv 感性株を用いた。SSC には石油ベンジン菌液⁶⁾を、一方対照として検討した常用法には、Tween-Albumin 培地培養菌液を用いた。

石油ベンジン菌液作成方法：上記菌株を1%小川培地に約3週間培養し、斜面上に発育した集落を白金耳にて釣取し、これを別に用意した約5ccの石油ベンジンを入れた滅菌試験管に移し、石油ベンジン表面に近い試験管壁で菌塊を白金耳で磨砕しつつ、徐々に石油ベンジン中に分散させた。かかる方法で 1.0mg/cc の石油ベンジン菌液を作成し、これを更に石油ベンジンで希釈し、1.0mg/cc, 0.1mg/cc, 0.01mg/cc 及び 0.001mg/cc の4種類の濃度の石油ベンジン菌液を作成してこれを実験に供した。

Tween-Albumin 培地培養菌液作成方法：Tween-Albumin 培地に約10日間培養した培養菌液を滅菌蒸留水で希釈し、2.0mg/cc, 0.2mg/cc, 0.02mg/cc 及び 0.002mg/cc の都合4種類の菌液を作成し、これを実験に供した。

なお石油ベンジン菌液の濃度判定には衛生検査指針⁷⁾記載の結核菌液 1.0mg/cc に相当する BaSO₄ 溶液を用いて肉眼的に比濁判定し、Tween-Albumin 培地培養菌液作成の際には、培養10日間の培養菌液が約 4.0mg/cc の濃度になることを利用して上記の希釈を行なった。

実験方法

10%牛血清加キルヒナー培地を10管1系列のガラスキャップ付小試験管の第1管に 3.6cc, 第2管以下には 2.0cc ずつ注入し、第1管には所定の濃度の薬剤希釈液 0.4cc を混和、次いで型の如く倍数希釈を9管迄行ない、第10管を薬剤を含まぬ対照培地とした。第1管に含まれる薬剤の濃度は、SM, KM 及び 1314 TH は 10γ/cc, PAS は 5γ/cc, INH は 1γ/cc, VM, CS, TBI 及び TC は 100γ/cc, PZA 及び SI は 1000γ/cc である。なお各薬剤につき上記の倍数希釈系列を8系列ずつ作成し、4系列を SSC に、残りの4系列を常用法に供した。両法共、1種類の接種菌量につき1系列ずつ使用した訳である。

SSC では、前項に述べた4種類の濃度の石油ベンジン菌液をそのまま SS 浸漬用菌液として用いた。

即ち1種類の菌液濃度につき各薬剤共10枚ずつの SS を使用した。SS 浸漬時間はいずれも1~2秒で、浸漬後直ちに薬剤希釈系列に投入、37°C で培養し、培養開始後2週目と4週目に、SS 表面に発育した結核菌集落を肉眼的に観察し MIC を求めた。

対照として検討した常用法では、前項に述べた4種類の濃度の菌液を滴下用の菌液として使用し、これを 1.0cc 約20滴になる駒込ピペットにて1試験管当たり1滴、即ち菌量にして約0.1mg, 0.01mg, 0.001mg 及び 0.0001mg になる如くに接種した。なお判定は SSC と同じく培養後2週目と4週目に培地内の結核菌発育状態を肉眼的に観察し MIC を求めた。

実験成績並びに考按

SSC と常用法とによる接種菌量別 MIC は表1から表6迄に示した。又図1から図11迄の図には、各薬剤ごとに、両培養法に於ける接種菌量の多寡による MIC の変動を比較し易い様に図示してある。但し SSC と常用法と

表1 SSC による接種菌量別 MIC (その1)

薬 剤	SS 浸 漬 用 石油ベンジン 菌 液 濃 度	MIC (γ/cc)	
		2 週	4 週
DHSM	1.0mg/cc	0.625	1.25
	0.1mg/cc	0.625	1.25
	0.01mg/cc	0.625	1.25
	0.001mg/cc	0.625	1.25
PAS	1.0mg/cc	0.156	0.625
	0.1mg/cc	0.039	0.625
	0.01mg/cc	0.019	0.313
	0.001mg/cc	0.019	0.313
INH	1.0mg/cc	0.0625	0.5
	0.1mg/cc	0.0625	0.0625
	0.01mg/cc	0.0625	0.0625
	0.001mg/cc	0.0625	0.0625
TBI	1.0mg/cc	<0.39	0.78
	0.1mg/cc	<0.39	0.78
	0.01mg/cc	<0.39	0.78
	0.001mg/cc	<0.39	0.78

表2 SSC による接種菌量別 MIC (その2)

薬 剤	SS 浸 漬 用 石油ベンジン 菌 液 濃 度	MIC (γ/cc)	
		2 週	4 週
PZA	1.0mg/cc	62.5	62.5
	0.1mg/cc	31.3	31.3
	0.01mg/cc	31.3	31.3
	0.001mg/cc	31.3	31.3
VM	1.0mg/cc	1.56	3.13
	0.1mg/cc	1.56	1.56
	0.01mg/cc	1.56	1.56
	0.001mg/cc	1.56	1.56
KM	1.0mg/cc	1.25	1.25
	0.1mg/cc	1.25	1.25
	0.01mg/cc	1.25	1.25
	0.001mg/cc	0.625	1.25
CS	1.0mg/cc	6.25	12.5
	0.1mg/cc	3.13	6.25
	0.01mg/cc	3.13	6.25
	0.001mg/cc	3.13	6.25

表3 SSC による接種菌量別 MIC (その3)

薬 剤	SS 浸 漬 用 石油ベンジン 菌 液 濃 度	MIC (γ/cc)	
		2 週	4 週
SI	1.0mg/cc	31.3	31.3
	0.1mg/cc	31.3	31.3
	0.01mg/cc	15.6	31.3
	0.001mg/cc	15.6	31.3
TC	1.0mg/cc	0.78	12.5
	0.1mg/cc	0.78	12.5
	0.01mg/cc	0.78	12.5
	0.001mg/cc	0.39	6.25
1314TH	1.0mg/cc	0.625	1.25
	0.1mg/cc	0.625	0.625
	0.01mg/cc	0.313	0.625
	0.001mg/cc	0.313	0.625

表4 常用法による接種菌量別 MIC (その1)

薬 剤	培地2CC当り 接 種 菌 量	MIC (γ/cc)	
		2 週	4 週
DHSM	0.1mg	10	10
	0.01mg	2.5	2.5
	0.001mg	1.25	2.5
	0.0001mg	0.625	1.25
PAS	0.1mg	1.25	1.25
	0.01mg	0.313	0.625
	0.001mg	0.156	0.313
	0.0001mg	0.078	0.156
INH	0.1mg	0.0625	0.5
	0.01mg	0.0625	0.25
	0.001mg	0.0313	0.0313
	0.0001mg	0.0313	0.0313
TBI	0.1mg	25	25
	0.01mg	25	25
	0.001mg	12.5	25
	0.0001mg	6.25	12.5

を接種菌量について正確に同じ条件にして比較することは、もともと無理なことである。何故なら本実験に於て SSC 用に使用した石油ベンジン菌液では、作成の都度菌液中に含まれる生菌数はかなり変動し、予定した生菌数を正確に接種することは困難である。したがって常用法と SSC との接種生菌数を等しくすることが甚だ困難である。又たとえ両法の接種生菌数を等しくし得ても、常用法では培地内、とくに試験管底に発育した菌の量により、SSC では SS 上に肉眼的にみとめられる迄に増大した集落の数により判定するのであり、実験条件がかなり異っている。唯我々の成績⁶⁾では SS 表面への附着菌単位数は、浸漬用菌液濃度に凡そ比例して増加するので、接種菌量による MIC の変動は SS 浸漬用菌液の濃度を変えれば観察することが出来る。そこで常用法では培地 2cc 当りの接種菌量を 0.1mg, 0.01mg, 0.001mg 及び 0.0001mg に、SSC では SS 浸漬に用いた石

表5 常用法による接種菌量別 MIC (その2)

薬 剤	培地2CC当り 接 種 菌 量	MIC (γ/cc)	
		2 週	4 週
PZA	0.1mg	500	500
	0.01mg	250	500
	0.001mg	250	250
	0.0001mg	125	125
Vll	0.1mg	25	25
	0.01mg	6.25	12.5
	0.001mg	3.13	6.25
	0.0001mg	3.13	3.13
KM	0.1mg	2.5	5.0
	0.01mg	2.5	2.5
	0.001mg	1.25	1.25
	0.0001mg	0.625	0.625
CS	0.1mg	6.25	12.5
	0.01mg	6.25	6.25
	0.001mg	6.25	6.25
	0.0001mg	3.13	6.25

表6 常用法による接種菌量別MIC (その3)

薬 剤	培地2CC当り 接 種 菌 量	MIC (γ/cc)	
		2 週	4 週
SI	0.1mg	250	250
	0.01mg	62.5	62.5
	0.001mg	31.3	31.3
	0.0001mg	15.6	31.3
TC	0.1mg	3.13	25
	0.01mg	3.13	12.5
	0.001mg	1.56	6.25
	0.0001mg	0.78	6.25
1314TH	0.1mg	0.625	2.5
	0.01mg	0.313	0.625
	0.001mg	0.313	0.313
	0.0001mg	0.313	0.313

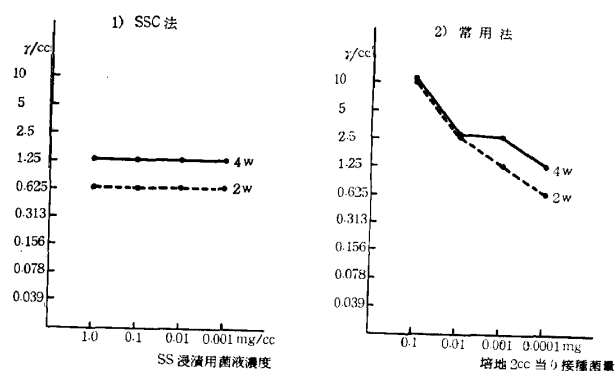


図1 DHSM

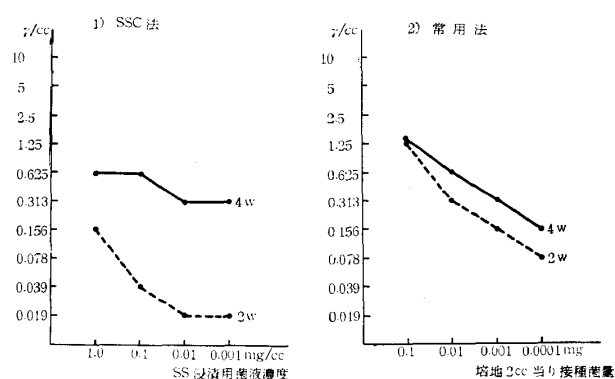


図2 PAS

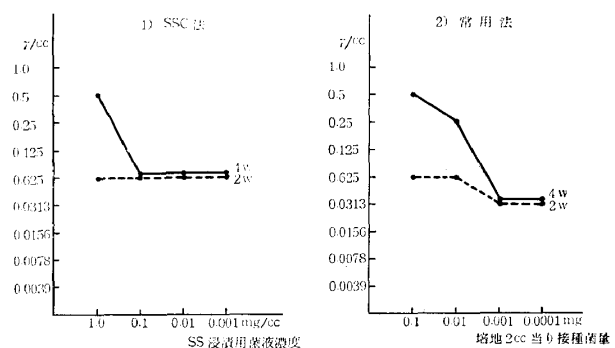


図3 INH

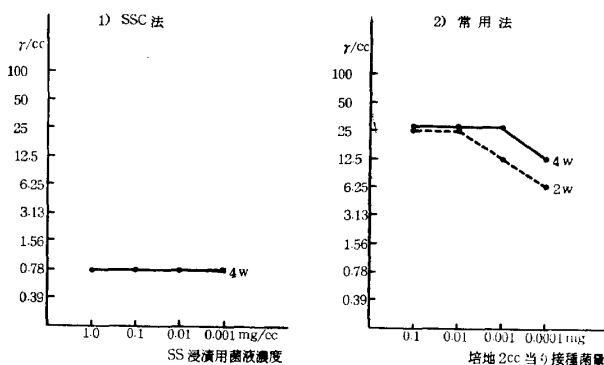


図4 TBI

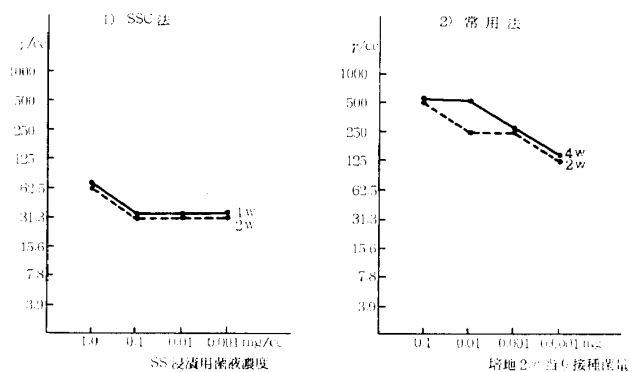


図5 PZA

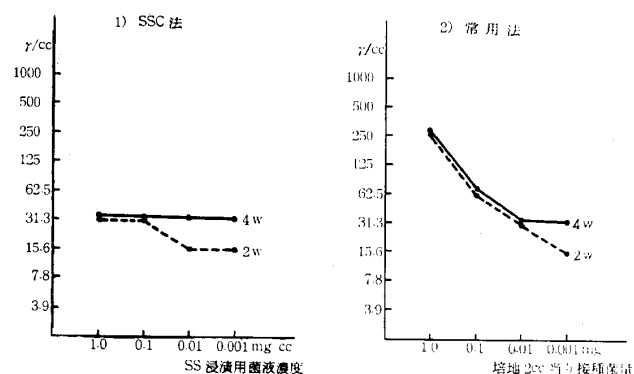


図9 SI

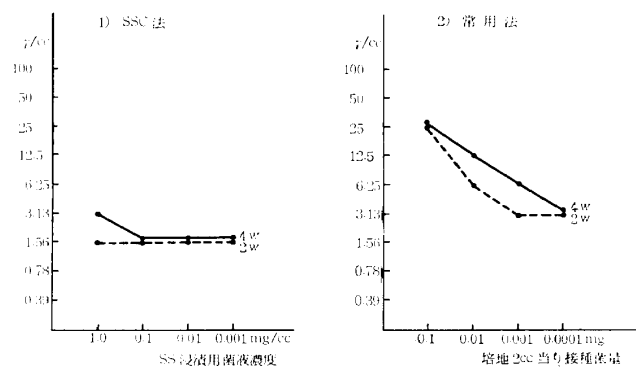


図6 VM

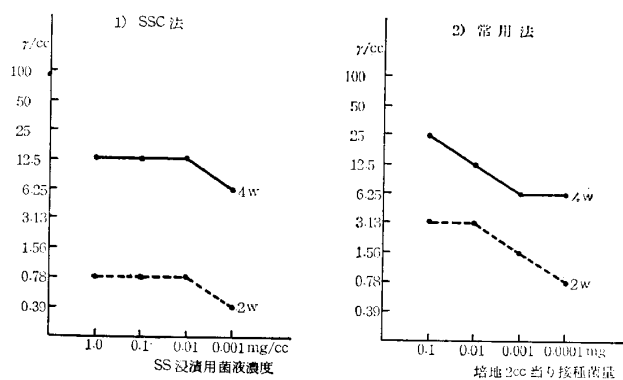


図10 TC

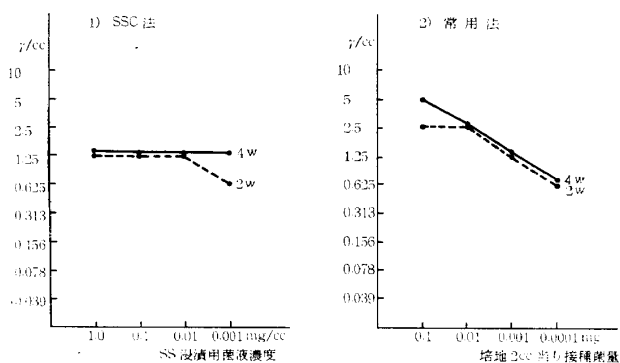


図7 KM

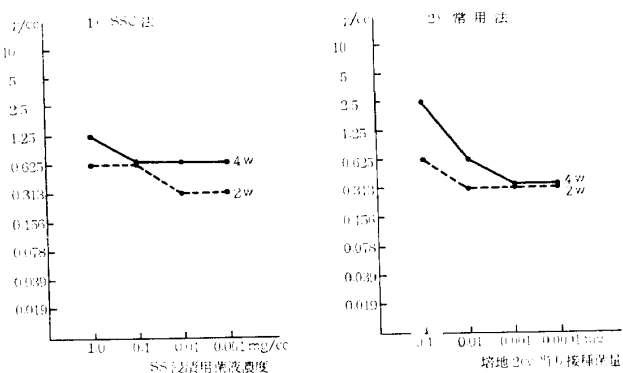


図11 13I4TH

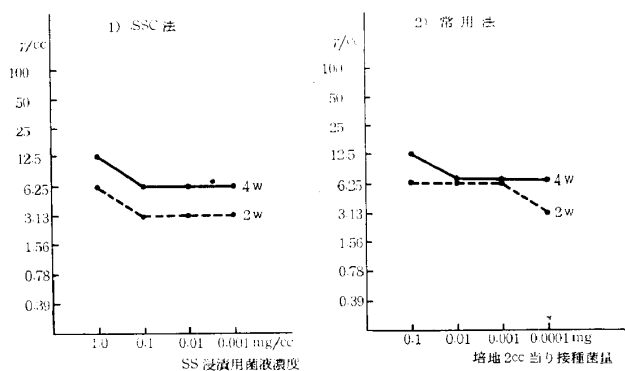


図8 CS

油ベンジン菌液の濃度を 1.0mg/cc, 0.1mg/cc, 0.01mg/cc 及び 0.001mg/cc にかえて接種菌量の MIC に与える影響をみた訳である。従って、両法に使用した菌液の濃度は正確に対応するものではなく、我々が実際に諸実験に用いる接種菌量で、両法に於ける接種菌量の多寡による MIC の変動を対比観察するために取り上げ

たものであることをお断りしたい。

以下、各薬剤ごとに成績を述べるが、成績を評価する際次の諸点を主として考慮した。即ち、

1) SSC と常用法との間に概観的にみて特に MIC の差の大きい薬剤があるかどうか？なおこの評価には、本実験に於ける中等量接種菌量 (SSC では 0.1mg/cc 又は 0.01mg/cc の浸漬用菌液を用いた時、又常用法では接種菌量 0.01mg 又は 0.001mg のもの) で 4 週判定に於ける両方法の MIC を比較した。

2) 接種菌量の多寡による MIC の変動は両方法のうちいずれが大きいのか？

3) 2 週判定と 4 週判定との間の MIC の差異はいずれの方法に著るしいか？の 3 点である。

SM: 中等量の菌接種では、MIC は SSC と常用法との間で著明な差はないが、接種菌量による MIC の変動は、常用法に於てはるかに顕著である。培養日数による差は両法共僅少である。

PAS: 中等量の菌接種では両方法に於て MIC の差はないが、SM と同様、接種菌量による MIC の変動は常用法に於てはるかに大きい。又培養日数による MIC の変動は、常用法に於ても認められるが、SSC に著明である。

INH: SM 及び PAS と同様、中等量の菌接種では両方法に於ける MIC の差は僅少であるが、接種菌量による MIC の変動は、培養 2 週間では殆どないが、培養 4 週間では両方法共かなり大きく、大量菌接種の場合の阻止力判定に際しては注意すべき点であろう。これは、神田の培地置換培養法⁹⁾の実験成績の示す様に、恐らく、培地内の薬剤不活性化と関係あるものと考えられる。

TBI: 既述の諸薬剤と異り、中等量の菌接種でも両方法の MIC の間に極めて大きな差があることが注目される。接種菌量による差は常用法では僅かながら認められたが、SSC では認められなかった。培養日数による MIC の変動は常用法では僅かであった。SSC では 2 週判定では 0.39 γ /cc 以下、4 週判定では 0.78 γ /cc

で、培養日数による差は不明であった。

PZA: TBI と同じく中等量の菌接種で、両方法での MIC にかなりの差が認められた。又接種菌量による差は常用法に於てかなり認められたが、SSC では僅少である。培養日数による MIC の差は SSC に於ては認められず、常用法に於てもごく僅かであった。

VM: 中等量の菌接種に於て、両方法の間に MIC の差がかなり認められた。接種菌量による MIC の差は常用法では大きい、SSC ではごく僅かである。培養日数による MIC の変動は両方法共僅少である。

KM: 中等量の菌接種に於ては、両方法の間に MIC の差は殆ど認められない。接種菌量による MIC の差は、常用法に於てはかなり認められたが、SSC では殆ど認められず、培養日数による MIC の変動も両方法共ごく僅かであった。

CS: SSC 法と常用法との間に、種々な点で殆ど差違を認めなかった。

SI: 中等量の菌接種に於て、両方法に於ける MIC の差はごく僅かであるが、接種菌量による MIC の変動は、SSC に於ては僅かなのに反して、常用法では著明であった。培養日数による MIC の変動は、両方法共僅かである。

TC: 中等量の菌接種では、両方法に於ける MIC の差は殆どなく、接種菌量による MIC の変動は常用法に於てかなり認められるが、SSC に於ては僅かである。但し PAS, INH と同様、培養日数による MIC の変動は両方法共著明である。この現象も、神田の成績⁹⁾の示す通り、恐らく TC の培地内不活性化が一因と思われる。

1314TH: 中等量の菌接種では、両方法に於ける MIC の差は殆どない。接種菌量による変動は、SSC ではごく僅かであるが、常用法ではかなり著明に認められた。培養日数による変動は、SSC では僅かであるが、常用法では少しく認められた。

以上の諸成績を要約すると、中等量の菌接種に於て、SSC と常用法との間に MIC のかなり著明な差を示す薬剤としては、TBI 及び PZA

があり、VM が次にあげられる。いずれも SSC に於て MIC が低い。DHSM, KM 及び SI に於てもこの傾向は僅かにみられる様である。又接種菌量の多寡による MIC の変動に関しては、常用法に於て、MIC の変動がかなり著明であるにかかわらず、SSC に於てはその変動が予想外に少い薬剤がかなりあるのが注目される。即ち、DHSM, PAS, TBI, VM, KM, SI 及び 1314TH である。

培養日数による MIC の差に関しては、PAS, INH 及び TC に於て、培養日数 2 週間の MIC と培養日数 4 週間の MIC の間にかなり差があり、いずれも 2 週判定では、MIC は著明に低くなっている。この傾向は両方法に於て等しく認められた。

以上の成績は、SSC に於ては、液体培地を使用しているにもかかわらず、液体培地を用いる常用法に比して、抗結核剤の制菌作用が強く表われ、かつ接種菌量の多寡による MIC の変動は小さいという、寧ろ固形培地のそれに似た態度を示している。このことは、抗結核剤の制菌作用を判定したり、与えられた菌の耐性を調べたりする上に極めて有利な点であろう。

結 論

以上、DHSM, PAS, INH, TBI, PZA, VM, KM, CS, SI, TC 及び 1314TH の計11種の抗結核剤について SSC 及び常用法の両方法を用い、接種菌量別の MIC を検討した所、次の結果を得た。

1) 中等量の菌接種を行った場合、両方法に於ける MIC を比較検討してみると、TBI, PZA

及び VM の SSC を用いた時の MIC は、常用法を用いた時に比べてかなり低かった。又 DHSM, KM 及び SI にもごく僅かではあるがこの傾向がみられる様である。

2) 接種菌量が増すに従って、MIC が上昇する傾向は、SSC, 常用法共に認められたが、常用法に於て接種菌量による MIC の変動がかなり著明であるにもかかわらず、SSC に於ては、その変動が予想外に少い薬剤がかなりあった。即ち、DHSM, PAS, TBI, VM, KM, SI 及び 1314TH である。

3) 常用法で、培養日数 2 週間と 4 週間とで MIC の著明な差がみられる PAS, INH 及び TC は、SSC に於ても同様の傾向がみられ、これら薬剤では 2 週判定の MIC に比べ 4 週判定の MIC はかなり大きく上昇している。

(欄筆にあたり終始御指導を賜った当研究室津久間博士に深甚の謝意を表します。)

文 献

- 1) 津久間他：胸部疾患，2：522, 1958
- 2) 山下：京大結研紀要，8(1)：5, 昭34
- 3) 伊藤：京大結研紀要，7(1)：143, 昭33
- 4) 河田：京大結研紀要，7(3)増刊第Ⅲ号：13, 昭34
- 5) 吉原：京大結研紀要，12(1)：52, 昭38
- 6) 内藤他：京大結研紀要，12(2)：112, 昭39
- 7) 衛生検査指針：I, 22, 厚生省編纂，1958
- 8) 神田：京大結研紀要，7(3)増刊第Ⅰ号：328, 昭34
- 9) 東：京大結研紀要，7(3)増刊第Ⅰ号：461, 昭34
- 10) 東：京大結研紀要，7(3)増刊第Ⅰ号：468, 昭34
- 11) 東：京大結研紀要，7(3)増刊第Ⅱ号：22, 昭34