

培地置換培養法による諸種 結核化学療法剤の静菌作用の検索

〔第2篇〕 Streptomycin, Dihydrostreptomycin, PAS,
INH 並びに TB1 の静菌作用に就いて

京都大学結核研究所化学療法部 (主任 教授 内藤益一)

神 田 瑞 雄

【内 容 抄 録】

第1編に於いて確立した培地置換培養法 (以下置換培養法) にて, Streptomycin (以下 SM), Dihydrostreptomycin (以下 DHSM), PAS, INH 及び TB1 の静菌作用を検索した。その結果 SM, DHSM, PAS 及び TB1 は培養中に殆んど力価を減弱しない比較的安定な薬剤である事がわかったが, INH は培養中に著しく不活性化されて静菌力が低下してゆく事がわかった。

又普通培養にて培養期間が長くなるにつれて, 薬剤の発育阻止限界が低下してゆく原因として, それが薬剤の崩壊によるものか, 或は又薬剤による generation time の延長によるものかを判別する上に, 置換培養法が役立つ事がわかった。

緒 言

著者は種々の抗結核剤の精確な試験管内静菌力を知り, これと臨床効果との関連をみ, 或は抗結核剤の作用機序等を知る目的で培地置換培養法 (以下置換培養法) を企て第1編¹⁾に於ける基本的実験に於いてその方法を確立した。

そこでこの方法を用いて現在抗結核剤として登場してきた種々の薬剤の静菌力の再検索を企てた次第である。

本編に於いては現在結核の治療に繁用されている Streptomycin (以下 SM), Dihydrostreptomycin (以下 DHSM), PAS, INH 並びに TB1 に就いての成績を報告する。

これ等5種の抗結核剤の人型結核菌 H37Rv 株に対する発育阻止最低濃度 (以下 MIC) に就いては多数の報告があり, 血清加合成培地で

は, SM 又は DHSM 0.5~1.6 γ /cc, PAS は 0.16~1.6 γ /cc, INH は 0.03~0.12 γ /cc, TB1 は 3.1~50 γ /cc といわれているが, 当教室河田²⁾の10%血清加 Kirchner 培地を用いた実験では, 培地 pH 6.4~6.6, 接種菌量培地 1 cc 当り 0.01 mg, 培養開始後4週間判定という条件で, 概ね DHSM は 1.25 γ /cc, PAS は 0.313 γ /cc, INH は 0.0625 γ /cc, TB1 は 25 γ /cc の価となつてゐる。所が Tween-albumin 培地を用いると何れの薬剤もその発育阻止力が増強されるが³⁻⁶⁾, 当教室津久間等の成績⁴⁾では特に TB1 は約30倍増強されその MIC は 0.78 γ /cc を示している。又卵培地では, SM や DHSM は加熱や卵蛋白の吸着により却つて力価が減少し⁷⁻¹³⁾, その発育阻止力は $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$ に減弱するといわれている^{4), 13)}。しかし PAS, INH はむしろ2~4倍発育阻止力が強くなり, TB1 は Dubos 培地と同様30倍前後増強される事^{3-4, 14)}が知られている。

この様に発育阻止力に対する増強因子や阻害因子の介入によつて MIC はかなり変動し, 何れの培地に於ける静菌力が生体内の静菌力に近い成績を示すかは困難な問題であるが, SM の例のように培地添加後の薬剤崩壊による力価の変動も無視出来ないものがある。

SM は加熱によつて不活性化されるといわれているが⁹⁻¹³⁾が常温では pH 3~7 の間で極めて安定であり¹⁵⁻¹⁶⁾, 又各種培地に加えられた SM はかなり長期間安定であるといわれている¹⁷⁾。又 DHSM は SM より更に安定で, 当教室の中村¹³⁾が行なつた卵培地中に含まれた SM 及び DHSM の力価に就いての研究成績でも, 保存

温度 25°C 以下では60日間, 37°C では15日間変化を認めていない。PAS も安定度が高く小川¹⁸⁾は 20~25°C で2ヶ月間不変と報告しているが, 中村¹³⁾の実験でも 5°C で30日間, 25°C で20日間, 37°C で15日間力価の低下を認めなかった。INH はアルカリ性では速かに分解し¹⁹⁻²⁰⁾, Dubos 培地中で 37°C 6週間で5%しか残らないという²¹⁾。中村¹³⁾の報告でも 5°C では60日間殆んど変化はないが, 25°C では20日間, 37°C では10日間で力価が半減する成績を得ている。TB1 は Kirchner 培地中で 37°C に保存すると約3週間で次第に力価が低下するといわれている¹⁷⁾。

以上のように文献的には培地中の薬剤の変化は INH が最も強く, SM, DHSM, PAS, TB1 は著明ではないようである。しかしこのような諸成績は一定条件のもとに保存した薬剤の活性を化学的若しくは生物学的に定量したものであるが, 化学的定量では生物学的活性と必ずしも一致しない場合があり, 又結核菌を対象とした生物学的定量法では判定の為の結核菌の培養に長期間を要するので正確を欠く憾みがある。この為結核菌以外に感受性のない薬剤の生物学的方式による力価の定量は従来極めて困難とされていた。

そこで著者はこれ等の薬剤を置換培養法で静菌力をしらべる事を試みた次第である。

実験材料及び実験方法

1. 培地

10%牛血清加 Kirchner 培地 (pH 6.4~6.6)

2. 菌液

栄研 Dubos 培地に7~10日間培養した人型結核菌 H37Rv 株を津久間等²²⁾等の栄研 Dubos 培地に於ける培養日数, 生菌単位, Spectrocolorimeter の透過率の基準表に基づいて生理的食塩水で希釈し, 0.1 mg/cc の菌液として用いた。

2. 被検液の調製

SM 及び DHSM は指示書に従つて滅菌蒸留水で 100 γ /cc に希釈, PAS-Na, INH, TB1 は化学天秤にて秤量し, PAS-Na, INH は 70%

Ethanol で溶解後, PAS-Na は 100 γ /cc, INH は 10 γ /cc 迄滅菌蒸留水で希釈した。TB1 は Propylenglycol で10倍即ち 1 mg/cc に溶解希釈後 100°C 30分間 Koch 氏釜で滅菌した。

4. 実験方法

第1編¹⁾に於けると同様に, 内径約4分の硝子キャップ付小試験管10本を並列し, 培地を第1管に 3.6 cc, 第2管以下に 2 cc 宛を注加し, 第1管に被検薬液 0.4 cc を加えて10倍に希釈しよく混和してから, その 2 cc を第2管へ移し以下同様にして第9管迄順次通減倍数希釈した。第10管は薬液を含まぬ対照培地とした。このような希釈列を各薬剤に就いて2系列つくり, 1列は置換培養法を, 他の1列は置換を行わない普通培養の対照列とした。

一方先述2の菌液に滅菌したシリコン被覆スライド (以下 SS) を3~5分間浸漬して菌を吸着させ, これを前記の希釈2系列に1枚宛投入培養を開始し, 置換列は3~4日毎に新らしく作成した同様の薬剤希釈列の該当管へ SS を置換し, 対照列は置換せずにそのまま培養をつづけ, 培養開始1, 2, 4週間後に判定した。

5. 判定基準

第1編¹⁾と同様。

実験成績

第1編¹⁾の成績と同様 SSC 法による肉眼的判定成績は鏡検成績とよく一致した。そこで実験成績は肉眼的判定成績のみを表示した。又各薬剤共3~4回繰返し実験を行ない, 実験1は各週毎の判定成績を, その他は4週間培養後の判定成績のみを記載した。

1. SM (表1)

表中実験1の成績の如く, 普通培養法及び置換培養法共に培養1週間後の成績より培養4週間後の成績の方が1管低く出ており, しかも普通培養法と置換培養法との差は第1週の成績も第4週の成績も同じであつた。実験2及び3は4週間培養の成績で, 置換による差を認めなかった。

2. DHSM (表2)

SM と全く同様の傾向がみられ, 4回繰返し

表 1 S M

実験番号	培 養 法	培養期間(週)	培地中の SM 濃度 (γ/cc)										MIC (γ/cc)
			10.0	5.0	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	対照	
1	普通培養法	1	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	0.625
		2	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	+++	0.625
		4	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	+++	1.25
	置換培養法	1	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	0.313
		2	—	—	—	—	—	+	+	++	++	+++	0.625
		4	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	+++	0.625
2	普通培養法	4	—	—	—	—	—	—	++	++	++	+++	0.313
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	++	++	++	+++	0.313
3	普通培養法	4	—	—	—	—	—	++	++	++	++	+++	0.625
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	0.625

表 2 D H S M

実験番号	培 養 法	培養期間(週)	培地中の DHSM 濃度 (γ/cc)										MIC (γ/cc)
			10.0	5.0	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	対照	
1	普通培養法	1	—	—	—	—	—	++	++	++	++	+++	0.625
		2	—	—	—	—	+	++	++	++	++	+++	1.25
		4	—	—	—	—	++	++	++	++	++	+++	1.25
	置換培養法	1	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	0.313
		2	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	0.625
		4	—	—	—	—	—	++	++	++	++	+++	0.625
2	普通培養法	4	—	—	—	—	—	—	++	++	++	+++	0.313
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	++	++	++	+++	0.313
3	普通培養法	4	—	—	—	—	—	++	++	++	++	+++	0.625
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	++	++	++	++	+++	0.625
4	普通培養法	4	—	—	—	—	+	++	++	++	++	+++	1.25
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	0.625

表 3 P A S - N a

実験番号	培 養 法	培養期間(週)	培地中の PAS-Na 濃度 (γ/cc)										MIC (γ/cc)
			10.0	5.0	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	対照	
1	普通培養法	1	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++	0.156
		2	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	0.313
		4	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	0.313
	置換培養法	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	0.039>
		2	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	0.078
		4	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	0.156
2	普通培養法	4	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++	0.313
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	+	+	++	+++	0.313

3	普通培養法	4	—	—	—	—	—	—	+	+	卅	卅	0.313
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	0.156
4	普通培養法	4	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	0.313
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	0.313

第 4 TB 1

実験番号	培養法	培養期間(週)	培地中の TB1 濃度 (γ/cc)										MIC (γ/cc)
			100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	対照	
1	普通培養法	1	—	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	1.56
		2	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	6.25
		4	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	50
	置換培養法	1	—	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	0.78
		2	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	3.13
		4	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	25
2	普通培養法	4	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	6.25
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	3.13
3	普通培養法	4	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	12.5
	置換培養法	4	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	12.5
4	普通培養法	4	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	25
	置換培養法	4	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	12.5

表 5 I N H

実験番号	培養法	培養期間(週)	培地中の INH 濃度 (γ/cc)										MIC (γ/cc)
			1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039	対照	
1	普通培養法	1	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	0.0625
		2	—	—	—	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	0.25
		4	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	0.25
	置換培養法	1	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	0.0313
		2	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	0.0625
		4	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	0.0625
2	普通培養法	4	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	0.0625
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	0.0156
3	普通培養法	4	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	0.0625
	置換培養法	4	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	0.0313

した実験の内 2 回は置換培養法に於ける方が静菌力が強くあらわれ、2 回は不変であつた。

3. PAS-Na (表 3)

表中実験 1 の成績の如く、PAS-Na は第 1 週の判定では極めて低濃度迄発育が阻止され、その後培養期間が長くなるにつれて次第に増殖を認めるようになる。最終判定の成績では結局置

換培養法に於ける方が 1 管強く出た。しかし実験 2 及び 4 では両者に MIC の差が認められず実験 3 では 1 管の差を認めた。

4. TB1 (表 4)

表 4 の如く本剤は第 1 週の判定成績と第 4 週の判定成績との間に極めて大きい差がみられた。即ち試験管にして 5 管 (32 倍) である。し

かもこの傾向は普通培養法、置換培養法共に全く同様にあらわれた。置換培養法と普通培養法とに於ける静菌力を比べると置換培養法の方が強くあらわれたのは、実験1, 2及び4の3回で、実験3は相違を認めなかつた。

5. INH (表5)

表5の如く普通培養法の場合はTB1と同様に培養期間が長くなるに従つてMICが高くなる傾向がみられるが、置換培養法の場合は第1週の判定成績と殆んど変りはなく、結局最終判定(培養4週間後)では、置換培養法に於ける静菌力が普通培養法に於けるより4倍強く出たのが2回、2倍強く出たのが1回で、差を認めざる実験はなかつた。

総 括 及 び 考 按

現在結核化学療法剤として臨床的に繁用されている5種の抗結核剤の試験管内静菌作用を著者の考案した置換培養法で検索した。

培養開始後4週間の判定成績ではSMは3回の実験の内1回のみ置換培養法に於ける静菌力がより強く出たが他の2回は変らなかつた。DHSMは4回の実験の内2回は置換培養法に於ける方が2倍強く、他の2回は同じであつた。従つてSM及びDHSMは何れも培養中に殆んど力価を減弱しないものと思われる。PAS-Na及びTB1は4回の実験の内2回は置換した方が2倍強く他の2回は変らなかつた。従つてこれ等もまた比較的安定な薬剤と考えられる。しかるにINHは置換した方が3回の実験の内2回が4倍、1回が2倍強く出た。この事はINHが菌の増殖の有無にかかわらず培養期間中に次第に不活性化される事を物語るものである。

以上の成績は緒言で述べた各薬剤の安定性に関する諸文献の成績と極めてよく一致している。

よつて置換培養法は抗結核剤のより正しい試験管内静菌力の研究方法として、又薬剤の安定性を知る手段として充分利用し得る方法と思われる。

次に置換培養法に於けるMICは一応10%血

清加Kirchner培地に於ける各薬剤のより正しい静菌力を示すものと考えられるが、繰返し行なつた数回の実験成績では、SM 0.625 γ /cc, DHSM も同じく 0.625 γ /cc, PAS-Na 0.156 γ /cc, TB1 25 γ /cc, INH 0.0313 γ /cc であつた。このMICと緒言で述べた普通培養法による標準のMICと比べると何れも殆んど変りなく、特にTB1の静菌作用はたとい置換培養法を行なつてもTween-albumin培地や卵培地に於けるが如き強い静菌作用を示さなかつた。従つてTB1の静菌作用が血清加合成培地で著しく弱いのは薬剤の崩壊と全く別箇のものと考えられるのである。

又普通培養法に於いて培養日数によつてMICが著しく変化するものと、そうでないものと2つの傾向がみられるが、この内比較的变化の強いINH及びTB1の成績を分析すると、TB1は置換培養法によつても同様に培養日数によるMICの変化が強く、INHは置換培養法を行なうと逆に殆んど変化しない事がわかつたので、後者INHの場合は薬剤の不活性化によるものであり、前者TB1の場合は然らずして恐らくはgeneration time(以下GT)の延長によるものであらうと推察される。即ち培養の長期化による静菌力の低下には、薬剤の崩壊と薬剤によるGTの延長との2つの因子があり、その何れに属するかをきめる方法としても置換培養法は有力な方法という事が出来よう。又この為には置換培養法は少く共2週間以上行ない、出来得るなら最終判定は4週間培養後に行なう可きと考える。

結 論

著者の考案した培地置換培養法によつて現在臨床的に繁用されているStreptomycin, Dihydrostreptomycin, PAS, INH並びにTB1の静菌作用を検索した所、INHは培養中に著しく不活性化され静菌力が減弱してゆく事がわかつた。又培養期間が長くなると発育阻止限界が低下する原因として、それが薬剤の崩壊によるものか、或は又薬剤によるgeneration timeの延長によるものかを判別する上に培地置換培養

法が役立つ事が明らかとなつた。

(摺筆に当り、終始御指導及び御援助を賜わつた当教室助手津久間俊次博士と実験に終始御協力を戴いた当教室東向一郎学兄とに深甚の謝意を表します。)

文 献

- 1) 神田：本論文第1編
- 2) 河田：京結紀要掲載予定
- 3) 津久間：京結紀要，4：165，1956.
- 4) 津久間：胸疾，2：522，1958.
- 5) Fisher：Am. Rev. Tuberc.，57：58，1948.
- 6) Kanai：Jap. Jour. Med. Sci. & Biol.，5：513，1953.
- 7) 水之江：北里実験医学，26：115，1953.
- 8) 伊藤泰：東京医誌，71：74，1954.

- 9) 小川政：日結，11：563，1952.
- 10) Wacksman et al.：Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic，19：537，1944.
- 11) 小酒井：医療，4：337，1945.
- 12) 中村善：日結，9：604，1950.
- 13) 中村彰：京結紀要，5：146，1957.
- 14) Domagk：Am. Rev. Tuberc.，61：8，1950.
- 15) Oswald：Science，105：184，1947.
- 16) Regna：J. Biol. Chem.，165：631，1946.
- 17) 上野：日本薬剤師協会雑誌，6：6，1954.
- 18) 小川：結核，25：490，1950.
- 19) 勝沼六：結進，1：51，1953.
- 20) Winder：Am. Rev. Tuberc.，73：779，1956.
- 21) Mitchison：Lancet，263：858，1952.
- 22) 津久間：未発表