

結核菌の発育に不適当な条件と化学療法

第1篇 結核菌発育阻止効果について

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第一

裏 辻 康 秀

(昭和51年3月1日受付)

緒 言

結核化学療法の最終的な目標は、生体内の結核菌を絶滅することにあるといえようが、長期間にわたって化学療法を行なっても生体内の結核菌を完全に死滅させてしまうことが困難であることは周知の事実である。肺結核症の進展の主要な因子である気道性伝播を防ぐためにできるだけ早期に排菌陰性化をもたらすことは必要であり、これは特に強力な化学療法術式によってかなり高率に期待しうることは多くの臨床成績によって示されている。治療開始時の病巣の性状によって治療型式はある程度制限されるが、一般療法に加えてさらに個体 (Host) の抵抗力を増強させるような方法が化学療法の限界を打ち破る一つの手段となることは当然考えられる。

他方、結核菌自体についてみると、結核菌はその増殖状態においてこそ結核化学療法剤による影響を強く受けるけれども、増殖静止状態に近づけば近づくほどその作用を受けにくくなる。生体内では、病巣の性状如何によって、如何に長期間化学療法を施行しても、生き残っていてしかも耐性菌になっていない結核菌 (persister) が存在する。

このような結核化学療法の困難性に関連して最近注目されている現象が microbial persistence¹⁾ 即ち、結核菌が薬剤に感受性でありながら、長期にわたる化学療法にもかかわらず、生

体内で生き残るという現象である。この現象に関連して、McDermott¹⁾, McCune²⁾ ら及び金井³⁾ から興味ある動物実験の成績が報告されている。つまり、生体内で生きてはいるが、殆んど増殖を休止している結核菌に対しては、化学療法剤が作用し難いということである。はたしていかに化学療法の術式を強化しても増殖休止状態にある結核菌に対しては全く意味がないのであろうか。この点を明らかにするために、既に教室の太田^{4,5)} は国立予防衛生研究所より分与された streptomycin 依存性人型結核菌 18b 株を用いて増殖休止状態にある結核菌をつくり試験管内実験および動物実験を行なったが、また別の角度から、教室では結核菌の発育に不適当と思われる種々の環境を作りこれらをモデルとして実験を行なってきた⁶⁻⁹⁾。他方、金井^{10,11)} によれば、streptomycin 飢餓の streptomycin 要求株を分裂休止菌として使用し、これによって感染されたハツカネズミを INH 或いは KM で治療しても感染生菌数を減少せしめる効果は殆んどなかったが、他方、この streptomycin 要求株を SM を与えることによって増殖せしめた場合、上述の化学療法は顕著な効果を示したと言っている。

即ち、結核菌の発育に不適当な環境では、化学療法の効果が激減することが知られ、又試験管内実験的にも同様な傾向のあることが認められている。そこで、薬剤作用温度を結核菌の発育に不適当な温度までに低下させることで同様

な現象が認められるものかどうか。またその際の耐性獲得はどうなるであろうか。更に、そのような環境で化学療法を強化する可能性はあるであろうか。以上のような諸点に関する検討を意図して試験管内実験的研究を行なった。まず培養温度を任意に選び 25°C 及び 4°C とし、新抗結核剤 Rifampicin (RFP と略す) を中心に抗結核剤を試験管内で作用させ、それらによる結核菌発育阻止効果を検討し、従来常用されてきた培養温度 37°C における効果と比較検討した。

RFP¹²⁾ は放線菌に属する *Streptomyces mediterranei* より産出される抗生物質 Rifamycin SV を基本とした一連の化合物のうちから選ばれた Rifamycin SV 誘導体であって、3-[(4-methyl-1-piperazinylimino) methyl] rifamycin SV の化学構造を有する半合成抗生物質である。RFP は Gruppo-Lepetit 社の研究陣を中心として開発され比較的最近に臨床的に使用されるようになった新しい抗結核剤であって、in vitro 及び in vivo の実験で優れた抗結核性を発揮すること^{13~22)} は既によく知られている。RFP は橙赤色（レンガ色）の無味無臭の粉末状ないし針状結晶で、吸湿性はない。クロロホルムに溶け易く、メタノールにやや溶け難く、水には極めて溶け難い物質である。RFP は温度、湿度ならびに光に対し極めて安定であるが、長期に空気中に放置すると分解生成物（酸化による）が経時的に増加する傾向がみられる。

実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

試験管：内径 1 cm、高さ 12 cm のガラスキャップ付小試験管を使用した。シリコーン被覆スライド：東の方法^{23~24)} によって作製した。即ち普通のスライドガラスを縦に 3 切したもの（幅 8~9 mm、高さ 7.5 cm）をクローム硫酸中に 24 時間浸漬、流水中で数時間洗滌してから乾燥、更にベンジンで洗滌した後、室温で乾燥し、このスライドを粘度 350 centistokes の Dimethyl Silicone (DC 200 Fluid) をクロロホ

ルムに 2% (v/v) に溶かした処理液中に瞬時浸漬した後室温で風乾し、300°C 1 時間熱処理したものを使用した。

菌株：教室保存の H₃₇R_v 株で 1% 小川培地において 4 週間培養したものを使用した。

菌液及び菌接種方法：上述の H₃₇R_v 株の菌集落に石油ベンジンを加え、よく振盪して菌集落を培地面より剥離させ、粗大菌塊を含んだ菌液とし、これを別の試験管に移し、石油ベンジンを加え、よく振盪して菌を分散させ、2~3 分間静置して粗大菌塊を沈殿せしめた後、上清を他の試験管に移し硫酸バリウム標準液と比色することによって、約 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液とした。この菌液中にシリコーン被覆スライドを約 2 cm の深さに瞬時浸漬して菌を付着させた。

低温培養装置：トキワ式エアバス低温恒温器を使用した。

培地：pH ca. 6.5 の 10% 牛血清加キルヒナー培地を用いた。

被検薬剤：RFP, EB 及び INH で RFP 単独、RFP+EB 2 者併用、RFP+EB+INH 3 者併用の 3 群について検討した。RFP は dimethylformamide (DFA) で溶解し 1 mg/ml まで稀釈し、その後は培地を用いて稀釈した。INH の稀釈は 10% 牛血清加キルヒナー培地で行なった。EB は蒸留水で溶解し 2 mg/ml まで稀釈し、以後培地を用いて稀釈した。

第2節 実験条件及び実験方法

薬剤作用温度：37°C, 25°C, 4°C とした。

薬剤作用形式：RFP 単独、RFP+EB 2 者併用、RFP+EB+INH 3 者併用の 3 群とし、薬剤濃度は RFP 100 mcg/ml, EB 200 mcg/ml, INH 100 mcg/ml を第 1 管濃度とし、以後それぞれ倍数稀釈法により第 19 管までとし、第 20 管は薬剤非含有対照培地とした。

実験操作：Silicone-coated Slide Culture 法（シリコーン被覆スライド培養法、S.S.C. 法と略する）²³⁾ を用いた。1% 小川培地上に 4 週間培養した菌集落を集めて 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液をつくり、池田の方法²⁵⁾ によりその

菌液中にシリコン被覆スライド (S.S.) を可及的同時に数秒間浸漬して菌を附着させた。即ち SS を約50枚、等間隔に縦に並列させることのできる金網セットを用い、菌液中に SS を約50枚、可及的同時に浸漬して菌附着 SS を得る。この結核菌附着 SS を上述の薬剤含有培地系列に投入し 37°C, 25°C, 4°C の3種類の培養温度でそれぞれ同様の薬剤作用形式で培養し実験を行なった。

結核菌発育阻止効果の判定は薬剤作用を始めてから第3週目に行なった。

判定方法：肉眼的に SS 上に発育した結核菌の集落が SS 表面の 2/3 以上を被うとき(卅)，2/3～1/3 のとき(++)，以下のとき(十)とし，集落数100以下の場合には(+)とする代りに大略その数を記入した。

実験成績及びその比較検討

各作用方式の判定成績を示したのが表1である。

この判定成績をどのような基準で比較検討すべきかは種々の考え方がある。対照と比較すれば(+)の成績も発育阻止作用を受けていることを示している。(十)は更に強い発育阻止

作用を受けたことを示しており、集落数 100 以下の場合ますます強い作用を受けたことになる。この場合、1 個の集落も認めない最低薬剤濃度で各作用方式を比較することができるが、この方法によると自然耐性菌の発育が存在する場合は評価を誤まるおそれがある。発育阻止作用が著明で、しかも自然耐性菌等による誤まりの少ない判定成績で比較検討するのが最も妥当である。(十)を境界とする判定成績はこの意味から最も比較検討に適当していると考えられる。

したがって本論文においては(十)まで発育
阻止効果あり、(廿)、(卅)は効果なしと判断す
ることとした。

このような基準で評価した実験成績は以下に示す如くである。

第1節 培養温度 37°C の場合

RFP 単独作用の場合、発育阻止最低濃度は第9管即ち 0.39 mcg/ml であり、RFP+EB 2 者併用では第10管即ち 0.195 mcg/ml (RFP 濃度) であり、更に RFP+EB+INH 3 者併用では第11管即ち 0.098 mcg/ml (RFP 濃度) であった、以上、単独<2 者併用<3 者併用の順に、試験管にして1 管ずつ発育阻止効果が強くなった。

表1 結核菌發育阻止效果

培養温度	薬剤名	作用形式	第1管濃度 (mcg/ml)	試験管番号 (第2管より第19管まで倍数希釈, 第20管は対照培地)																	結核菌 発育の程度																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18	19	20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
37℃	RFP	単独	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									</

第2節 培養温度 25°C の場合

結核菌の発育は肉眼的に全くみられなかった。

第3節 培養温度 4°C の場合

25°C における結果と同様、結核菌の発育は肉眼的に全くみられなかった。

考 按

結核菌の発育と温度についてはかなり古くから知られている。結核菌は、37~38°C でよく発育し、30°C 以下或いは 40°C 以上で発育しない。鳥型菌は 40°C でもよく発育する。他の抗酸菌の中で、*M. ulcerans*, *M. balnei* は 30~33°C のみ発育する²⁶⁾。とされている。

本実験において、培養温度 25°C 及び 4°C の場合、肉眼的に発育が全くみられなかったことは当然の結果といえよう。このように、結核菌の発育に不適当な条件下で、抗結核剤を作用させた時に菌の発育が阻止され、更にどの程度殺菌されるかということを知りたいわけで、これについては次の第2篇で報告する。

結 語

SSC 法を用いて、RFP 単独、RFP+EB 2 者併用、RFP+EB+INH 3 者併用について、培養温度 37°C, 25°C, 4°C のもとで結核菌発育阻止効果を比較検討した。

培養温度 37°C では、RFP 単独<RFP+EB 2 者併用<RFP+EB+INH 3 者併用の順に試験管にして1管ずつ効果が強くなった。他方、培養温度 25°C, 4°C では肉眼的に菌の発育は全くみられなかった。

従って、培養温度 25°C 及び 4°C 等の環境で薬剤の発育阻止力を検討することは不可能であると考えられる。但し、このような発育に不都合な条件下におかれた結核菌が死滅しているかどうか、死滅していなければ接触した薬剤の種類や濃度による影響の差が見られるのではないかという問題が次篇以後の主題である。

本論文の要旨は第48回日本結核病学会総会（昭和48

年4月2日、福岡）において発表した。

欄筆するに当り、直接研究面で御教導下さった池田博士、並びに教室の諸先生方に深甚の謝意を表します。

又、長期間御助力頂いた教室員の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) McDermott, W.: Yale J. Biol. and Med., 30: 257, 1958.
- 2) McCune, R. et al.: J. Exp. Med. 123: 445, 1966.
- 3) 金井興美: 結核, 39: 537, 昭39.
- 4) 太田令子: 結核, 46: 295, 1971.
- 5) 太田令子: 結核, 46: 493, 1971.
- 6) 前川暢夫他: 結核, 46: 235, 1971.
- 7) 前川暢夫他: 結核, 46: 293, 1971.
- 8) 前川暢夫他: 結核, 46: 491, 1971.
- 9) 前川暢夫他: 結核, 47: 1, 1972.
- 10) 金井興美: 医学と生物学, 64(5): 147, 昭37.
- 11) 金井興美: 医学と生物学, 65(4): 70, 昭37.
- 12) 佐野光司他: リファジン文献集 Vol. 1 基礎編, 1, 第一製薬株式会社, 昭46.
- 13) Verbist, L. et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98: 923, 1968.
- 14) Hobby, G. L. et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97: 713, 1968.
- 15) Kradolfer, F.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98: 104, 1968.
- 16) Hobby, G. L. et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 99: 453, 1969.
- 17) Karlson, A. G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 101: 765, 1970.
- 18) 堂野前維摩郷他: 日胸, 28: 140, 昭44.
- 19) 吉田文香: 日胸, 28: 321, 昭44.
- 20) Maggi, N. et al.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 765, 1965.
- 21) Sensi, P. et al.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 699, 1966.
- 22) 前川暢夫他: 臨牀と研究, 50: 1795, 1973.
- 23) 東向一郎: 京大結研紀要, 7(3), 増刊1号, 461, 1959.
- 24) 東向一郎: 京大結研紀要, 7(3), 増刊2号, 22, 1959.
- 25) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12(1), 21, 1963.
- 26) 結核菌の臨床細菌学31, 結核予防会, 昭45.

第2篇 殺菌効果について

緒 言

前篇において述べた如くマウス、モルモットなどを用いた実験結核症治療実験において、抗結核剤 Isoniazid, Streptomycin, Kanamycin など投与しても、分離培養陰性にいたるまで組織中の菌を根絶することが不可能であるという事実はかなり古くから知られていた。このことはすでに McCune, Tompsett¹⁾ によって指摘されており、長期にわたる強力な化学療法剤の投与にもかかわらず、マウスの体内には感染菌が存続し、その上これらの菌は投与薬剤に対して耐性を獲得していない事実が強調された。

他方、Rees ら²⁾ によって示されたことは、マウスの感染慢性期における安定した菌数レベルは“static equilibrium”によるものであり、菌が組織中において分裂増殖を停止したまま生存するという事実である。ところで、慢性化した時期における感染菌数の固定化が static equilibrium か dynamic equilibrium か、言い換えれば、その時期においては感染菌は分裂をしないで生残をつづけるのか、或いは感染菌の増殖率と、宿主による感染菌破壊率とが丁度よく平衡状態にあるのか、そのどちらによるものかと問題提起した Sever, Youmans³⁾ の疑問があった。これに対し、Rees らは実験的事実を報告したわけである。

上述の2つの報告^{1~2)}は、感染菌が分裂増殖を止めて単に病巣内で生き残りつつある条件においては、化学療法の効果は期待できないという可能性を示唆している。この点は菌の薬剤耐性獲得とは別の面で、慢性感染症としての結核に対する化学療法の必然的な限界を意味するとも考えられる。

はたしていかに化学療法の術式を強化しても増殖休止状態にある結核菌に対しては全く意味がないのであろうか。教室では、結核菌の発育に不適当と思われる種々の環境を作りこれらを

モデルとして実験を行なってきた^{4~7)}。著者は前篇において述べた如く、結核菌の発育に不適当な培養温度を1つのモデルとして選び、任意に培養温度を 25°C 及び 4°C として、Rifampicin (RFP) を中心に抗結核剤を試験管内で作用させ、それらによる結核菌発育阻止効果を、従来常用されてきた培養温度 37°C における効果と比較検討した。25°C, 4°C では肉眼的に菌集落の発育はみられなかった。つまり、25°C 及び 4°C という培養温度では、結核菌はいわゆる resting cells の状態となり、増殖発育を休止している状態となるものと解釈できよう。本篇では、このような菌発育に不適当な条件のもとで抗結核剤を作用させ、結核菌がどの程度殺菌されるか、また死滅していなければ接触した薬剤の種類や濃度による差がみられるかどうかを検討するため前篇の実験にひき続き、試験管内実験を行なった。

なおここで用いる“殺菌”なる語は実験の性質上、細菌がその試験管内増殖能を失うという意味で使用していることをおことわりしておく。

実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

試験管、シリコン被覆スライド、菌株、菌液及び菌接種方法、培地、被検薬剤等は全て第1篇と同様である。

第2節 実験条件及び実験方法

結核菌発育阻止効果判定後、殺菌効果を検討する目的で、培養温度 37°C, 25°C, 4°C 各群の、結核菌附着シリコン被覆スライド (SS と略す) を生理的食塩水で洗滌する。1枚の SS につき、3本の試験管に分注した生理的食塩水で SS を3回ずつ洗滌し、それぞれ薬剤非含有培地系列の該当試験管に移し、すべて 37°C で更に4週間培養を続けた。判定方法は肉眼的に SS 上に発育した結核菌の集落が SS 表面の 2/3 以上を

被うとき(卅), 2/3及至1/3 のとき(十), 1/3 以下のとき(十)とし, 集落数100以下の場合には大略その数を記録した。殺菌効果の判定時期は薬剤含有培地から薬剤非含有培地系列へSS を移し, 37°C で4週間培養後とした。

実験成績及びその比較検討

各作用方式の判定成績を示したのが表1である。

第1節 培養温度 37°C の場合

SS 上の結核菌発育が(卅), (十)は殺菌効果なし, (十)以下は殺菌効果ありとすれば RFP 単独では, 殺菌最低濃度は第9管即ち 0.39 mcg/ml であり, RFP+EB 2者併用では, 殺菌最低濃度は第8管即ち RFP 濃度にして 0.78 mcg/ml であった。そして, RFP+EB+INH 3者併用では, 殺菌最低濃度は第11管即ち RFP 濃度にして 0.098 mcg/ml であった。

第2節 培養温度 25°C の場合

RFP 単独では殺菌最低濃度は第3管, 即ち 25 mcg/ml であり, RFP+EB 2者併用では第4管, 即ち RFP 濃度にして 12.5 mcg/ml であり, 更に RFP+EB+INH 3者併用では殺

菌最低濃度は第6管, 即ち RFP 濃度にして 3.13 mcg/ml であった。

第3節 培養温度 4°C の場合

単独, 2者併用, 3者併用いずれの場合も殺菌効果は全くみられなかった。

第4節 比較検討

培養温度 25°C の場合は 37°C の場合より殺菌効果が減弱された。その差は試験管にして5管程度(薬剤濃度にして32倍程度)である。更に, 供用薬剤を増す毎に殺菌効果が増強されたかという点に関して検討すれば, 培養温度 37°C の2者併用を除いて, 単独<2者併用<3者併用の順に殺菌効果の増強がみられた。培養温度 37°C の場合, 単独作用と3者併用との差は試験管にして2管であり, 25°C の場合, 単独作用と3者併用との差は試験管にして3管であった。

考 按

第1節 実験条件及び実験方法に対する考察

本実験に使用したシリコン被覆スライド培養法⁸⁻⁹⁾はスライドに吸着した結核菌が普通の細菌学的操作では殆んど脱落しないと示う特徴を

表1 殺菌効果

培養温度	薬剤名	作用形式	第1管濃度 (mcg/ml)	試験管番号 (第2管より第19管まで倍數稀釈, 第20管は対照培地)																										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
37℃	RFP	単独	100								1	20																		
	RFP EB	2者併用	100 200								1	4																		
	RFP EB INH	3者併用	100 200 100								1		6	30	40															
25℃	RFP	単独	100																											
	RFP EB	2者併用	100 200																											
	RFP EB INH	3者併用	100 200 100	50	100																									
4℃	RFP	単独	100																											
	RFP EB	2者併用	100 200																											
	RFP EB INH	3者併用	100 200 100																											

(++)

(++)

(+)

(-)

数字は集落数を示す。

 (卅)
 (++)
 (+)
 (—)

数字は集落数を示す。

もち、培養中に培地を繰り返し置換することも十分可能である。石油ベンジン菌液¹⁰⁾を用いると、菌液濃度が一定であればスライド上の吸着菌単位数はほぼ一定であるという利点がある。更に、石油ベンジンは結核菌塊を単孤菌化する作用があるのでスライドにそれぞれ吸着され、發育した菌集落の多寡を肉眼的に観察することが容易になるわけである。しかしながら他方、石油ベンジン自体の結核菌障害作用がかなり強いものであることは大きな欠点である。内藤ら¹¹⁾によれば、石油ベンジン自体の結核菌障害作用は、菌液作成から SS 浸漬操作終了迄の時間を30分以内に制限することで、殆んど避け得ることが判明した。又、菌液濃度が低くなるに従って成績判定の際の誤差が大きくなる可能性があるのでやむを得ない場合以外は 0.1 mg/ml 以上の菌液濃度で諸実験を行なうのがよいとされている。

第2節 諸家報告との比較考察

前川ら⁴⁾は既に結核菌の發育に不適當な培養温度 25°C 及び 4°C で、INH を中心に抗結核剤を作用させたときの殺菌効果を検討している。それによると、INH 単独及び INH+SM+EB+PAS 4 剤併用の 2 方式を用いて、シリコン被覆スライド培養法によって実験を行なったところ、薬剤作用温度が 25°C 及び 4°C では 37°C に比較して化学療法の効果が非常に減弱され、37°C で薬剤を作用させた場合と 25°C で薬剤を作用させた場合とでは、INH 単独ならびに INH+SM+EB+PAS 4 者併用いずれの場合も、その殺菌効果の点で、試験管にして12管前後（薬剤濃度にして 2¹² 前後）の著明な差が認められ、又、INH 単独よりも 4 者併用時の方がわずかながら強い殺菌効果があったと報告されている。これに対し、著者の行なった実験成績でも、ほぼ同様の傾向を認めたが、培養温度 37°C で薬剤を作用させた場合と 25°C で薬剤を作用させた場合とを比較すると RFP 単独及び 2 者併用並びに 3 者併用いずれの場合もその差が 5 管前後（薬剤濃度にして 32 倍程度）

であり、その差が比較的小さく、このことは RFP の殺菌力がかなり強力であることを示唆するものであろう。

結 語

(1) 結核菌の發育に不適當な培養温度で、RFP を中心に抗結核剤を作用させた場合、37°C における殺菌効果と比較して、いずれの薬剤作用形式でも殺菌効果は非常に減弱された。

(2) RFP 単独作用と RFP+EB+INH 3 者併用とでは、37°C、25°C いずれにおいても、わずかながら 3 者併用群のほうが強い効果を示した。この成績のみからの判断が可能であるならば、RFP は単独でもかなり強い殺菌力を發揮するので、これに他の抗結核剤を併用しても殺菌効果の強化はあまり期待できないかもしれない。

本論文の要旨は第48回日本結核病学会総会（昭和48年4月2日、福岡）において発表した。

擧筆するに当たり、直接研究面で御教導下さった池田博士、並びに教室の諸先生方に深甚の謝意を表します。

又、御助力頂いた教室員の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) McCune, R. M. Jr., Tompsett, R.: J. Exp. Med., 104: 737, 1956.
- 2) Rees, R. J. W. et al.: Brit. J. Exp. Path., 42: 83, 1961.
- 3) Sever, J. L., Youmans, G. P.: Am. Rev. Tuberc. 76: 616, 1957.
- 4) 前川暢夫他：結核, 46: 235, 1971.
- 5) 前川暢夫他：結核, 46: 293, 1971.
- 6) 前川暢夫他：結核, 46: 491, 1971.
- 7) 前川暢夫他：結核, 47: 1, 1972.
- 8) 東向一郎：京大結研紀要, 7-3, 増刊1号, 461, 昭34.
- 9) 東向一郎：京大結研紀要, 7-3, 増刊2号, 22, 昭34.
- 10) 山本 寿：京大結研紀要, 3-1, 49, 昭29.
- 11) 内藤益一他：京大結研紀要, 12-2, 112, 昭39.

第3篇 薬剤耐性獲得について

緒 言

結核化学療法の効果は、薬物の濃度が病巣内で有効値以上に長く保たれば保たれるほど有効になる。新しい病巣では血液の供給が豊富であるのに反して、古い病巣では血管の乏しい結合織に妨げられ、血液の供給はより少ない。また一方、結合織に被包された乾酪巣内の菌は新しく乾酪化した病巣内の菌とは違って、resting stateにあると考えられる。resting stateの菌は化学療法剤の影響を受けにくい¹⁾。このような増殖休止状態の結核菌に対して化学療法強化の意味を検討するため、教室の太田²⁻³⁾は国立予防衛生研究所より分与された Streptomycin 依存性人型結核菌 18 b 株を用いた、試験管内及び動物実験を試みた。この株は1955年、橋本⁴⁾が人型結核菌 H₂ 株から分離に成功した極めて安定な Streptomycin 依存性 (50mcg/ml 以上)を示す菌株で、Streptomycin 投与を中止することにより、簡単に増殖休止状態となり、培地上でも動物体内でも増殖休止のまま生存を続け、ストレプトマイシンを投与すれば再び増殖を開始することが確かめられている。そしてストレプトマイシンに対する態度以外は標準実験株である H₃₇R_v 株と全く変わらない薬剤感受性を示す。太田によれば、試験管内実験で増殖休止状態にある結核菌に対して化学療法剤を作用させてみると、1剤のみを用いて次第に濃度を高めた場合でも、薬剤の数を増して4者併用とした場合でも、殺菌効果がある程度高められることがわかった。つまり、試験管内実験では、殆んど増殖を休止した状態にある結核菌に対する化学療法剤の効果は、増殖を続けている状態の場合に比べて低いけれども、化療術式を強化することの意味はわずかながら存在するということになる。

最近、結核化学療法の新しい武器として登場し、殺菌力の点ですぐれた特徴をもち、臨床的に

もかなりの評価を得ている Rifampicin (RFP) について、著者は、上述のような困難な障壁を打破できる薬剤ではなかろうかということ在意図して結核菌の発育に不適当な条件の1つとして低温培養環境を選び、その条件のもとで結核菌に RFP を中心として抗結核薬を作用させ試験管内実験を行なった。前篇では、菌発育に不都合な条件下で結核菌が死滅せずに生き残った場合、作用させた薬剤の種類や濃度による影響の差がみられるかどうかなどについて検討した。本篇では、結核菌の発育に不適当な培養温度 25°C 及び 4°C で RFP を作用させた場合、従来常用されてきた培養温度 37°C における場合と比較して、死滅しなかった菌株の RFP に対する耐性獲得はどうなるか、又その間に差がみられるかどうかを検討するため試験管内実験を行なった。

実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

試験管、シリコーン被覆スライド、菌株、菌液及び菌接種方法、培地、被検薬剤等はすべて第1篇と同様である。ただし、耐性検査に供するための増菌用培地は1%小川培地を使用した。

第2節 実験条件及び実験方法

第1篇と同様であるが、実験操作は、第2篇でのべた様に殺菌効果判定後、結核菌附着シリコンスライド (SS と略す) 上の菌集落を1%小川培地に移して4週間にわたり増菌し第1篇と同様に SSC 法を用いて行なった。即ち、菌集落の発育した SS を、小試験管に入れた約 2 ml の石油ベンジン中に投入し SS 上の全集落より石油ベンジン菌液をつくり、その菌液約 0.2~0.3 ml を1%小川培地に流し、増菌した。但し SS 上に発育した菌集落が極めて少数の場合は、SS を直接1%小川培地面に密着することで、全集落を増菌に供した。こうして4週間、

37°C 培養後, 1%小川培地上に發育した全集落で耐性検査を行なった。

耐性検査は1%小川培地上に發育した菌集落から石油ベンジン菌液をつくり, 硫酸バリウム標準液と比色することにより約 0.1 mg/ml の濃度とした。次いで SS をピンセットにはさんでこの菌液中に瞬時浸漬した後, 数秒間そのまま保持して, 石油ベンジンが蒸発・除去された後, 耐性培地に投入, 37°C で培養した。

耐性培地は, 10%牛血清加キルヒナー培地を用いた。小試験管を用いて, 耐性検査濃度は第1管を RFP 2 mcg/ml とし, 第2管から第9管まで倍数希釈し第10管は対照培地とした。

実験成績及びその比較検討

RFP 耐性検査成績は表1に示す通りであった。

培養温度 4°C, 25°C, 37°C すべて耐性上昇はみられなかった。低温で RFP を作用させた菌株と 37°C で RFP を作用させた菌株との間でとくに著明な差は認められなかった。

考 按

試験管内モデル実験の一つとして, 結核菌の發育に不適當な培養温度で, 菌を resting state

の状態にして Rifampicin を作用させた結果, 死滅しなかった菌株について耐性検査を行なったところ, 耐性上昇は認められなかった。

一般に resting state の菌には薬剤耐性ができ易く, また空洞のあるものに耐性ができ易いといわれる。in vivo における問題としては, 新鮮な病巣の場合には, 發育阻止された菌を食細胞などが処理しやすいのに対して, 乾酪巣の場合には菌の發育が止まってもすぐ処理されない場合が少なくないといわれる。また, 自然にも 10^{6-8} に1個程度の割合で耐性結核菌が存在するといわれている。病巣の性状によっては, 十分な濃度の薬剤が菌に到達し難く, 耐性の上昇がみられ易い条件の場合もある。

前川ら⁶⁾によれば, Isoniazid (INH) を中心に同様の実験が行なわれた結果, 4°C, 25°C の場合は INH 単独作用群も INH+SM+EB+PAS 4者併用群にも INH 耐性上昇は認められなかったと報告されている。

結 語

結核菌の發育に不適當な培養温度 4°C, 25°C で抗結核剤 Rifampicin (RFP) を単独作用させた菌株について, RFP 耐性検査を行なったところ, 4°C, 25°C, 37°C すべてについて耐性上

表1 RFP 耐性検査成績 (RFP 単独作用群)

耐性検査濃度 試験管番号 作用濃度		第1管濃度 2mcg/ml (第2管より第9管まで倍数希釈)																													
		培養温度 4℃									培養温度 25℃									培養温度 37℃											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
第1管濃度 100mcg/ml (第2管より第9管まで 倍数希釈)	1																														
	2																														
	3																														
	4																														
	5																														
	6																														
	7																														
	8																														
	9																														
	10																														
	11																														
	12																														
	13																														
	14																														
	15																														
	16																														
	17																														
	18																														
	19																														
	K																														

■ (++) ▨ (+) □ (—) S: 結菌發育により判定不能であった。

昇は認められなかった。

本論文の要旨は第48回日本結核病学会総会（昭和48年4月2日，福岡）において発表した。

稿を終るに臨み，直接研究面で御教導下さった池田博士，並びに教室の諸先生方に深甚の謝意を表します。

又，御助力いただいた教室員の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 石原 国：治療，55：12，33，1973.
- 2) 太田令子：結核，46：295，1971.
- 3) 太田令子：結核，46：493，1971.
- 4) 橋本達一郎：結核，30：4，237，461，707，1955.
- 5) 前川暢夫他：結核，46：7，235，1971.

THE EFFECTS OF ANTITUBERCULOUS CHEMOTHERAPY IN VITRO UNDER VARIOUS CONDITIONS INADEQUATE FOR THE GROWTH OF TUBERCLE BACILLI

Yasuhide URATSUJI

The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

Chemotherapeutic effects of RFP alone, two drug regimen of RFP·EB and three drug regimen of RFP·EB·INH to *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv were evaluated in vitro by changing the incubating temperature at 37°C, 25°C and 4°C.

Comparing the results obtained at 25°C and 4°C with those at 37°C, the chemotherapeutic effects were remarkably lowered in the incubating temperature, 25°C and 4°C even in the three drug regimen and the development of drug resistance RFP was not observed in such an inadequate condition for the growth of tubercle bacilli.

According to these results, it seems almost impossible to intensify the antituberculosis chemotherapeutic effect under the thermal condition inadequate for the growth of tubercle bacilli in vitro.