

Griselimycine の半合成誘導体 27753RP の抗結核 作用に関する試験管内実験的検討

第4編 結核菌の発育に不適当な条件と R.P. の抗菌力

〔I〕 低温下の抗菌力

〔II〕 ガス曝露下の抗菌力

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第一

柴 田 安 宅

(昭和59年2月3日受付)

緒 言

結核化学療法は生体内の結核菌を絶滅させることが最終目標である。そのために抗結核薬の併用、投与法の工夫、投薬期間の延長、そして新薬の開発などの研究が行なわれてきたが生体内の結核菌を完全に絶滅させるのは今日においてもなお困難である。

in vitro における成績では、抗結核化学療法剤は結核菌の代謝の盛んな増殖期において強い抗菌力を示すが、発育停止状態に近づくほど抗菌力は減弱するのが常である。

また、生体内ではその病巣の条件により長期の化学療法を行なっても生き残り、しかも耐性菌になっていない結核菌 (persister) が存在するといわれている。

一方、McDermott¹⁾, McCune²⁾ ら、及び金井³⁾らの動物実験による報告によれば、生体内で生き残っているが発育停止に近い状態にある結核菌に対して化学療法の効果はほとんど認めないという。教室の太田^{4,5)} は Streptomycine 依存性結核菌 18b 株を用いた試験管内実験及び動物実験を行ない、抗結核薬の isoniazid (INH), kanamycin (KM), ethambutol (EB) による化学療法を試みたが、Streptomycine を含有しない培地及び Streptomycine を投与しない動物で

は、18b 株は発育停止状態にあり殺菌効果を示さなかった。

in vitro における結核菌の発育に不適当な環境での化学療法の効果については教室の前川⁶⁻⁹⁾、山鳥^{10,11)} が種々の環境をつくり実験を行ない報告している。

今回もこれらの検討に準じて、まず第1に温度変化による薬剤効果の変動を検討した。

著者も第3編までは薬剤作用温度を 37°C とし試験管内実験を行ない検討してきた。しかし薬剤作用温度を低下させ結核菌の発育に不適当な環境にした場合、R.P. はどのような抗結核作用を示すのだろうか。その温度を 25°C 及び 4°C とし、37°C の場合の効果と比較検討を行なった。

第2に薬剤作用時のガス環境の変更である。通常の in vitro の検討は大気の下で行なわれてきた。この大気を炭酸ガス、窒素ガスで置換した場合、薬剤効果はどうなるであろうか。

好気性菌である結核菌はその発育にももちろん酸素を必要とする。海老名¹²⁾ は培養瓶中の空気を酸素、炭酸ガスから成る各種混合ガスに置き換え、その中での結核菌の発育状態を調べ、人型結核菌は肺細胞内ガス組成に近いガス組成が最も発育に適していると報告している。

また、山鳥^{10,11)} は試験管内実験において、液

体培地上の空気を酸素, 窒素, 炭酸ガスを各単独で置換して結核菌の発育状態を検討した。SSC 法を用いたこの実験では, 各ガスの種類, 及びガスの流入期間のいずれにおいても, 4週間の培養では肉眼的に結核菌の発育は認めなかったと報告している。

今回も同様な条件のガス曝露下において, R.P. の薬剤効果を検討した。

〔I〕 低温下の抗菌力

第1章 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 (S.S と略す), 菌株, 菌液及び菌接種方法, 培地, 被検薬剤等は全て第1編と同様である。

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: R.P. 10 µg/ml, SM 50 µg/ml, RFP 10 µg/ml を第1管濃度として, 以後各々倍数希釈法により第9管までとし第10管は薬剤非含有対照培地とした。

実験操作: シリコン被覆スライド培養法 (SSC 法と略す) を用いた。教室保存の H₃₇Rv 株を1%小川培地上に4週間培養し, その菌集落を集めて 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液をつくり, 池田の方法によりその菌液中に S.S を数秒間浸漬して菌を付着させた。この結核菌付着 S.S を薬剤含有培地系列に耳鼻科用ピンセットを使い投入し, 37°C, 25°C, 4°C の3種の培養温度で薬剤を作用させた。

判定方法: 結核菌発育阻止効果は薬剤作用3週間終了時に判定した。また, 殺菌効果は実験開始4週間後, 生理的食塩水で3回洗浄して薬剤を除去し, 3 ml の薬剤非含有培地に置換して 37°C で4週間培養後に判定した。

いずれも肉眼的に S.S 上に発育した結核菌集落が S.S 表面の2/3以上覆う時(卅), 2/3~1/3の時(十), 1/3以下の時(+), 集落数100以下の時その数を記入した。

第2章 実験成績及びその比較検討

第1節 結核菌発育阻止効果について

判定成績は表1に示した。

1) 培養温度 37°C の場合: R.P. の発育阻止最低濃度 (MIC) は第7管即ち 0.156 µg/ml, SM は第6管即ち 1.563 µg/ml, RFP は第8管即ち 0.078 µg/ml であった。以上の如く R.P. の MIC は RFP には劣るが SM より優れていることを認めた。

2) 培養温度 25°C の場合: 結核菌の発育は肉眼的に全く認めなかった。

3) 培養温度 4°C の場合: 25°C と同様, 結核菌の発育は肉眼的に全く認めなかった。

第2節 殺菌効果について

判定成績は表2に示した。

1) 培養温度 37°C の場合: R.P. の殺菌最低濃度 (MBC) は第6管即ち 0.313 µg/ml, SM は第3管即ち 12.5 µg/ml, RFP は第6管即ち 0.313 µg/ml であった。以上の如く R.P. の殺菌効果は SM よりはるかに優れ, RFP に匹敵する殺菌力を示した。

2) 培養温度 25°C の場合: R.P. の MBC は第6管即ち 0.313 µg/ml, SM は第5管即ち 3.125 µg/ml, RFP は第8管即ち 0.078 µg/ml であった。この場合も R.P. の殺菌効果は RFP より劣るが SM より優れていることを認めた。

表1 発育に不適当な条件下の RP の抗菌力 MIC

			試 験 管 番 号									
			(第2管より第9管まで倍数希釈、Kは対照培地)									
培 養 温 度	薬 劑 名	第1管濃度 μg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
37℃	RP	10										
	SM	50										
	RFP	10										
25℃	RP	10										
	SM	50										
	RFP	10										
4℃	RP	10										
	SM	50										
	RFP	10										

■(卅) ■(十) ■(+)

表2 発育に不適当な条件下の RP の抗菌力 MBC

培養温度	薬剤名	第1管濃度 $\mu\text{g/ml}$	試験管番号 (第2管より第9管まで倍数希釈, Kは対照培地)									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	K
37°C	RP	10	13	15	25	9	11					
	SM	50	10	15	15							
25°C	RFP	10					50					
	RP	10										
	SM	50										
	RFP	10	4	12	40	40						
4°C	RP	10	1									
	SM	50										
	RFP	10										

■(—) ▨(—) ▩(—) □(—)
数字はコロニー数を示す

3) 培養温度 4°C の場合 : R.P. の MBC は第2管即ち $5\mu\text{g/ml}$, SM 及び RFP の殺菌効果は全くみられなかった。

4) 比較検討

(—)～(+)を殺菌効果ありとすれば, 培養温度 37°C の場合に比べ 25°C の場合は, その殺菌効果の減弱を認めなかった。培養温度 4°C の場合は 37°C 及び 25°C の場合より殺菌効果の減弱を認めた。その差は R.P. 及び RFP で6管～8管(薬剤濃度にして32～128倍)であった。

しかし, (+)を殺菌効果なしとすれば, 培養温度 25°C の場合は 37°C の場合より殺菌効果の減弱を認めた。

第3章 考 按

結核菌は 37°C～38°C でよく発育するが, われわれは発育に不適当な環境下即ち 25°C 及び 4°C で培養を行い, R.P. の抗菌力を検討した。

結核菌発育阻止効果について : 肉眼的に結核菌の発育は全くみられなかった。

殺菌効果について : (—)～(+)を殺菌効果ありとすると, 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 SM と RFP は2管(4倍)の差があり, R.P. はいずれの場合も安定した成績を示し, R.P. の殺菌力は RFP よりはやや劣るが

SM に比べて優れていると考えられる。

第4章 結 語

結核菌の発育に不適当な培養温度 25°C 及び 4°C で R.P. の抗菌力をシリコン被覆スライド培養法を用いて検討した。

1) 結核菌発育阻止効果について

培養温度 25°C 及び 4°C の場合, とともに結核菌の発育は肉眼的に全くみられなかった。

培養温度 37°C の場合, R.P. の MIC は $0.156\mu\text{g/ml}$, SM は $1.563\mu\text{g/ml}$, RFP は $0.078\mu\text{g/ml}$ であり, R.P. は RFP には劣るが, SM より優れていることを認めた。

2) 殺菌効果について

培養温度 37°C の場合, R.P. の MBC は $0.313\mu\text{g/ml}$, SM は $12.5\mu\text{g/ml}$, RFP は $0.313\mu\text{g/ml}$ で R.P. は RFP に近い殺菌効果を示し SM より優れていることを認めた。

また 37°C の場合と 25°C の場合を比較すると SM 及び RFP は2管(4倍)の差があるが, R.P. はその差がなく, R.P. の殺菌効果が強いものであることを認めた。

培養温度 4°C の場合, R.P. の MBC は $5\mu\text{g/ml}$ で SM 及び RFP の殺菌効果は全く認めず, 37°C や 25°C の場合より殺菌効果の減弱を認めた。

〔Ⅱ〕 ガス曝露下における P.R. の抗菌力

第1章 実験材料及び実験方法

シリコン被覆スライド(S.S), 菌株, 菌液及び菌接種方法, 培地等はすべて〔Ⅰ〕低温下の抗菌力の実験の場合と同様である。

ガス : 窒素及び炭酸ガスを用いた。

容器及び装置 : 200 cc 枝付きコルベンとコルベン連結装置(図1参照)を使用した。

薬剤作用温度 : 37°C とした。

被検薬剤 : SM は蒸留水で 10mg/ml まで希釈しその後は培地を用いて希釈して $1\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ とした。RFP はジメチル

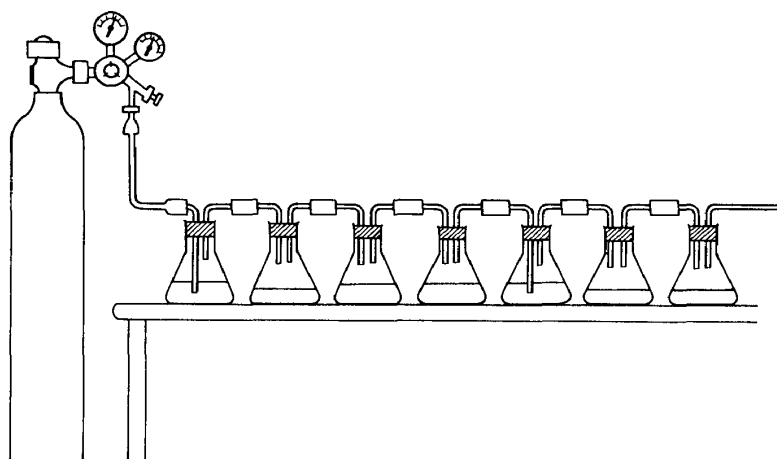


図1 実験装置略図

ホルムアルデヒド (DFA) を用いて 1 mg/ml まで希釈しその後は培地を用いて希釈して 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, とした。R.P. は溶解希釈液としてプロピレングリコールを用い 1 mg/ml とし、以後培地で希釈して 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml とした。

実験操作：200 cc の枝付きコルベンに 10 cc ピペットで培地を 99 ml 注入し、各薬剤を各々 1 ml 加え、前記の薬剤濃度になるように全体で 100 ml とした。各コルベンに耳鼻科用ピンセットで菌付着 S.S を 3 枚ずつ投入した。このコルベンを薬剤別にわけ、薬剤濃度の付濃度から高濃度への順に配列し、異なる薬剤間には空のコルベンを各々配列した。

枝付きコルベンの連結には内径 5 mm, 長さ 15 cm のゴム管を使用した。ガスボンベより接続した最初及び最後のコルベンには、各々水を入れ枝付きの一方は水中に達し、他の一方は達しないようにしてガスの流入を確認した。薬剤含有培地についてはコルベンの枝付きは培地に達しないようにして、培地上の空気をガスで置換するようにした。

この装置にガスボンベより窒素、炭酸ガスをそれぞれ単独で 4 週間流入させ、この装置全体をふ卵室に置き 37°C で培養した。対照として薬剤非含有培地に S.S を入れガスを流入させたものと、流入させないでふ卵室に放置したものと 2 つの対照を作製した。

判定方法：肉眼的に観察して S.S 上に発育し

た結核菌の集落が S.S 表面 (S.S のベンジン菌液付着部分) の 2/3 以上を覆う時(卅), 2/3~1/3の時(十), 1/3以下の時(+), 集落数100以下の場合はその数を記録した。

結核菌発育阻止効果の判定時期はガス流入終了時、即ち実験開始後 4 週間目に行なった。

殺菌効果の判定時期は結核菌発育阻止効果判定後、S.S の薬剤洗浄を行ない薬剤非含有培地に移し培養して 4 週間目に判定した。即ち、MIC 判定後、ガス流入を止め、耳鼻

科用ピンセットでコルベンから S.S を取り出し、あらかじめ準備しておいた生理的食塩水 4 ml の入った小試験管の中に S.S を入れ、順次新しい生理的食塩水の入った小試験管に移すことにより各 3 回ずつ洗浄した後、薬剤非含有培地に移した。そしてこの S.S を 37°C で培養して、4 週間後に判定した。

第2章 実験成績及び比較検討

結核菌発育阻止効果についての成績は表 3 に示した。いずれの薬剤濃度、いずれのガス流入においても肉眼的には結核菌の発育は認められ

表3 ガス曝露下における結核菌発育阻止効果
〔炭酸ガス、窒素ガス共に共通〕

薬 剤	濃 度			
RP	0.1	—	—	—
	1	—	—	—
	10	—	—	—
SM	1	—	—	—
	10	—	—	—
	100	—	—	—
RFP	0.1	—	—	—
	1	—	—	—
	10	—	—	—
K ₁		—	—	—
K ₂		卅	卅	卅

K₁：薬剤非含有培地でガスを流入

K₂：薬剤非含有培地でガスを流入せずふらん室に放置

表 4 殺 菌 効 果

炭酸ガス				
薬 剤	濃度			
RP	0.1	—	10	12
	1	—	—	—
	10	—	—	—
SM	1	10	8	15
	10	25	20	／
	100	35	22	／
RFP	0.1	4	7	5
	1	—	—	1
	10	—	—	—
K		++	++	++

窒素ガス				
薬 剤	濃度			
RP	0.1	+	50	+
	1	50	80	+
	10	50	1	30
SM	1	+	80	+
	10	80	+	50
	100	20	40	62
K		++	++	++

斜線は判定不能
数字は集落数
K : 対照

なかった。またガスを流入させた薬剤非含有培地でも肉眼的に結核菌の発育を認めなかった。薬剤非含有培地でガスを流入せずふ卵室に放置した対照では、いずれの場合も結核菌の発育を認めた。

殺菌効果についての成績は表 4 に示した。

1) 薬剤別の検討

R.P. : 炭酸ガス流入の場合は著明な殺菌効果を示した。窒素ガス流入でも炭酸ガス流入の場合より弱いものの、殺菌効果を認め、わずかながら薬剤濃度の上昇に伴う殺菌効果の増強傾向を認めた。

SM : R.P. と同様に炭酸ガス流入の場合はかなり強い殺菌効果を示したが、薬剤濃度の上昇は殺菌効果を強めなかった。一方、窒素ガス流入の場合は炭酸ガス流入の場合に比し、殺菌効果は近いものの、わずかながら薬剤濃度の上昇による殺菌増強の傾向を認めた。

RFP : 炭酸ガス流入の場合、著明な殺菌効果を認めた。

2) ガス別の検討

炭酸ガス : R.P., SM, RFP のいずれにおいてもかなり強い殺菌効果を示したが、薬剤濃度の上昇による殺菌効果の増強傾向を認めなかった。一方、R.P. は SM より殺菌効果に優れており、RFP に似た殺菌効果を示した。

窒素ガス : R.P. 及び SM 共に殺菌効果を認

め、薬剤濃度の上昇に伴ない、わずかながら殺菌効果の増強傾向を認めた。

第 3 章 考 察

大気中には窒素が約78%, 炭酸ガスが約0.03%含有している。これらを単独で100%に近い濃度で液体培地上の空気を置換することにより、窒素ガス、炭酸ガスのいずれの場合も結核菌発育阻止効果を認めたことを山鳥¹⁰⁾は報告している。海老名¹³⁾によれば、人型結核菌は窒素濃度約78%, 炭酸ガス濃度約5%で発育に適していると報告している。

著者の実験でも約100%の窒素ガス、炭素ガス流入下ではいかなる場合も結核菌発育を阻止することを認めた。

殺菌効果については、炭酸ガス流入の場合、R.P., SM, RFP のいずれも殺菌効果を示した。R.P. は SM より殺菌効果が優れている傾向を認め、RFP の殺菌効果とほとんど同様の成績であった。窒素ガスの場合、炭酸ガスの場合に比し弱いものの、R.P. 及び SM は殺菌効果を認め、両者とも薬剤濃度の上昇に伴ない殺菌効果の増強傾向を認めた。

第 4 章 結 語

結核菌の発育に不適当と思われる条件を、試験管内実験的に、液体培地上の空気を窒素及び炭酸ガスで置換し、それぞれ単独に流入させる

ことにより作り出し、その条件下の抗結核薬の抗菌力を検討した。

1) 4週間のガス流入中はいずれの薬剤、薬剤濃度、ガスにおいても肉眼的に結核菌の発育を認めなかった。

2) 炭酸ガス流入で R.P., SM, RFP のいずれも著明な殺菌効果を示し、R.P. は SM より殺菌効果において優れており RFP に近い殺菌効果を示した。

3) 窒素ガス流入では炭酸ガス流入下より劣るものの R.P., SM 共に殺菌効果を示し、両者とも薬剤濃度の上昇に伴ない殺菌効果の増強傾向を認めた。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜った川合満講師、池田宣昭講師に深甚なる謝意を表す。また終始御協力頂いた山鳥英世博士、研究室の西尾貞子、

本間トキエの各氏に心から感謝する。そしてこの研究の機会を与えてくださった医療法人医仁会武田病院の武田隆男理事長と武田保秀院長に厚く御礼致します。

参 考 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, 昭和39年.
- 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) 山鳥英世: 結核, 56: 429, 1981.
- 11) 山鳥英世: 結核, 56: 465, 1981.
- 12) 海孝名敏明: 結核, 15: 514, 1973.
- 13) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12: 21, 1963.

EXPERIMENTAL STUDIES IN VITRO ON THE ANTITUBERCULOUS ACTIVITIES OF 27753RP (R.P), A SEMISYTHETIC DERIVATIVE OF GRISELIMYCINE

IV. Antituberculous Activities of R.P in Vitro under Various Inadequate Conditions for the Growth of Tubercle Bacilli

Ataka SHIBATA

*The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan*

(I) Antituberculous activities of R.P under low temperature.

The antituberculous activities of R.P against Mycobacterium tuberculosis H37Rv strain at 4°C or 25°C were investigated using SSC method.

1. Bacteriostatic effect

When the cultures were incubated at 4°C or 25°C, there was no growth of tubercle bacilli. But at 37°C, the MIC of R.P was 0.156 mcg/ml; SM, 1.563 mcg/ml; RFP, 0.078 mcg/ml, respectively. The bacteriostatic effect of R.P. was inferior than that of RFP, but it was superior to that of SM.

2. Bactericidal effect

At 37°C, the MBC of R.P was 0.313 mcg/ml; SM, 12.5 mcg/ml; RFP, 0.313 mcg/ml,

respectively. Bactericidal effect of R.P was inferior to that of RFP, but superior to that of SM. There was no difference of the bactericidal effect of R.P between at 37°C and at 25°C, so the bactericidal effect of R.P was fairly potent.

(II) Anituberculous Activities of R.P in Vitro under Several Kinds of Gas Exposures.

The antituberculous activities of R.P to tubercle bacilli (H37Rv strain) were evaluated in vitro by replacing the air with N₂ and CO₂ gases. The experiments were performed by using SSC method with Kirchner's liquid medium.

The results obtained are as follows :

1. There was no growth of tubercle bacilli in any sample, regardless of the kind of drug or gas during continuous exposure for four weeks.
2. With the CO₂ gas exposure, R.P, SM, and RFP showed remarkably strong bactericidal effects. The bactericidal effects of R.P was superior to that of SM, and similar to that of RFP.
3. Under N₂ gas exposure, the bactericidal effects of R.P and SM were less than those under CO₂ gas exposure. With the increase of drug concentrations, the bactericidal effects of these drugs increased under N₂ and CO₂ gas exposures.