

Sulfathiazole の抗結核菌作用について

(2) 形態的観察

国立療養所大府荘 (指導 勝沼六郎院長)

東村道雄・鈴木錦三郎

(受付 昭和30年1月28日)

緒言

Sulfathiazole (ST) が *in vitro* で著明な抗結核菌作用を有することは古くから知られているが、*in vivo* ではあまり効果がないので実用には供されていない¹⁻³⁾。

われわれは Sulfonamides の抗結核菌作用機構について観察し、抗結核剤研究の基礎的事実を得ようとしてこの研究をはじめたが、ここでは *M. avium* および *M. tuberculosis* var. *hominis* に *in vitro* で有効であった ST を sulfonamides の代表として³⁾、結核菌形態におよぼす影響を観察した。本報では ST により *in vitro* で著明な阻止を受ける *M. avium* を材料として観察した。sulfonamides の結核菌の形態におよぼす変化については Courmont et al.⁴⁾ が変形と非抗酸化とを認めて簡単な報告をしているが、系統的な観察はほとんどないように思われる。

実験方法

被検菌は *Mycobacterium avium* 獣調株を使用した。ST の力価検定は pH 7.0, Sauton 培地 (Asparagin の代りに Sod. glutamate 使用) 2 ml を規準とする倍数稀釈法によつた。ST 液は武田の Sulzol-S 注射液すなわち p-Aminophenylsulfaminthiazole-N⁺-dextrose sodium sulfonate を使用し、第1本目を ST とし、100,000 mcg/ml とし、以下倍数稀釈で 0.0004 mcg/ml まで 29 本の稀釈列を作り、30 本目を対照とした。他の培地使用の場合も上に準じた。被検菌は 200 ml 容量 Erlenmeyer flask 入り 3% glycerine bouillon 50 ml に 37°C 5 日培養した菌膜をとり、ガラス玉入り丸コルベンで振盪した後生理的食塩水 (生食水) に 100 mcg/ml の割合に浮遊させたものを 0.1 ml 宛接種した。第1報に述べたように 3,200~1,600 mcg/ml 以上の濃度に認められる完全阻止は非特異的なものと考えて観察の対照から除外した。以上の稀釈列を 3~5 組作つて 37°C 10 日培養し、その間毎日観察した。形態的観察は各試験管から白金耳で鈎菌し slide glass 上において乾燥させ、火焰固定後、Ziehl-Neelsen 法で染色鏡検した。染色は次の如く行つた。50°C に温めた Ziehl 液を満載して

分放置、水洗、3% 塩酸 alcohol 1 分、水洗、Löffler の methylene blue 液 1 分、水洗。

実験成績ならびに考案

(1) Sauton 培地中で Sulfathiazole によつて起る形態的变化 (第1表参照)

(i) 2 日後: ST 濃度 200 mcg/ml 以上では発育は完全に阻止される。100 mcg/ml 以下では管底発育が起る。この時には対照も管底発育にとどまる。この管底発育を鏡検するといずれも ST の濃度および有無に關係なくすべて methylene blue (MB) 好染の非抗酸性桿状菌 (nafb) の網状構造又は集団である。すなわちこの非抗酸性型は正常発育の初期に認められるものと変りない。

(ii) 3 日後: ST 濃度 1,600 mcg/ml 以上では発育がないが 800 mcg/ml 以下では管底発育が認められ、0.4 mcg/ml 以下では菌膜形成が認められる。鏡検所見は 800~100 mcg/ml では nafb の網状構造ないし集団が認められ、50 mcg/ml 以下では漸次 Fuchsin (F) 淡染の抗酸性桿状菌 (afb) と nafb の混合となる。定型的所見は中心部に F 濃染 afb があり、それを包んで弱 afb および nafb があり、周辺程 nafb が多い像である。3.2 mcg/ml 以下では F 淡染 afb と F 濃染 afb の混合となる。0.4 mcg/ml 以下の菌膜を形成するものは、afb, 弱 afb を主とし nafb を混じる網状構造から成る。これは対照と同様であつて菌膜を形成する形態的單位に対照との差を認めない。

(iii) 6 日後: 一般に日数とともに各 cells の抗酸度が増加している。菌膜を構成する菌 (cell) はほぼ同様であるが、菌体内に抗酸性顆粒を明瞭に認めるものないし念珠状の抗酸性顆粒連続体 (afgg) を認める。管底発育ないし微弱な菌膜を作る 6.3~0.8 mcg/ml では afb の集束、集団ないし網状構造を主とし、弱 afb, nafb を混じる。

(iv) 10 日後: 800~400 mcg/ml では nafb および淡紫色に染まる菌 (nafb と afb の中間型) の網状構造である。200~50 mcg/ml では淡紫色菌及び afb の網状構造、25~6.3 mcg/ml では afb 及び弱 afb の網状構

表 I. Sulfathiazole の *M. avium* に対する発育阻止作用。

Sauton 培地 (PH 7.0) 2 ml 規準倍數稀釈法。
glycerine bouillon 5 日培養菌 10 mcg 接種。
37°C. 十, 卅 管底発育, 卅, 卅 菌膜形成。

ST 濃度	日数	2	3	4	6	10
800		—	+	+	+	+
400		—	+	+	+	+
200		—	+	+	+	+
100		+	+	+	+	+
50		+	+	+	+	+
25		+	+	+	+	+
12.5		+	+	+	卅	卅
6.3		+	+	+	卅	卅
3.2		+	+	卅	卅	卅
1.6		+	+	卅	卅	卅
0.8		+	卅	卅	卅	卅
0.4		+	卅	卅	卅	卅
0.2		+	卅	卅	卅	卅
0.1		+	卅	卅	卅	卅
0.05		+	卅	卅	卅	卅
0.025		+	卅	卅	卅	卅
0.012		+	卅	卅	卅	卅
0.006		+	卅	卅	卅	卅
0		+	卅	卅	卅	卅

造, 3.2 mcg/ml 以下の菌膜の構成はほぼ前述と大差がない。しかし ST 濃度が小となるにつれて正常な陳旧培養にも認められる陳旧型の淡紫色菌および MB 淡難染の nafb (発育初期の nafb が MB に美しく好染し, また淡染する時でも美しい新鮮な感じに染まるの) に対して, 陳旧培養に現われる上述の菌は淡染と云うより難染という感じで, MB に濃染しても淡染しても汚なく染まる) を相当含み, afb, afgg, nafb の網状構造となつて

(考案) ST の阻止作用を受けて管底発育の状態が発育が停止する領域では, 上述のように集落は nafb から成る。肉眼でみえなかつた接種菌が管底発育として認められる迄発育したのであるから, ここに認められる管底発育は主として新生菌と考えられる。すなわち新生した菌が nafb 又は少なくとも抗酸化が弱くとどまつているわけである。詳しくみると 3 日後の所見の項に記したように nafb ないし弱 afb の集りの中心部に少数の F 濃染の afb を認める。この少数の afb ははじめに接種された菌自身又はすぐそれから発育した菌と考えられる。なんとなれば以下に示すように最初に ST 含有培地中に接種された菌自身は抗酸性を失うことなく, また nafb の抗酸化も妨げられないからである。

前報³⁾したように ST の *M. avium* に対する発育阻止は部分阻止の形をとる。すなわち発育阻止が起るまでに lag phase (48~72 時間) が必要であり, この間にあ

る程度の増殖が起つて管底発育となる。ST の発育阻止濃度 (これは部分阻止を意味する) では ST 含有培地に最初に接種された菌自身は抗酸化を失うことなく, また非抗酸性型から抗酸性型に変わることも可能である。そしてこの接種菌から nafb が次々と新生して初期の管底発育を形成することも対照と同様である (この発育初期の nafb から nafb を次々と新生する過程は正常発育でも認められるものであつて特異なものではない⁵⁾)。しかし対照ではこの新生した nafb の抗酸化が起るのに, 発育阻止濃度の ST 中ではこの新生した nafb の抗酸化が遅延するわけである。

Courmont et al.⁴⁾ は arylsulfonamides 中で変形した青染菌を認めたとのみ報告しているがその機序にはふれていない。これは Waksman & Smith⁵⁾ によつても loss of acidfastness と記され streptomycin による *M. avium* その他の変形, 抗酸性消失と同一性質のものと解されている。しかしわれわれの得た結果から考えると ST 含有培地中でみられる nafb は接種菌の抗酸性脱失によつて起つたものでなく, ST 中で新生した菌の抗酸化遅延によるものである。また ST 中で特異な菌の変形を認めたことはなく, 単に発育遅延のための発育の phase のずれを認めたのみである。従つてこの点は接種された菌自身が著明な変形を示す streptomycin の場合と異なつていると考える。

なお新生菌の抗酸化阻害は上述の例では 10 日後にも 400 mcg/ml の ST 中で nafb が認められたが, 他の例では数日後に抗酸化が認められた。すなわちこの抗酸化の阻害は阻止というような判然として強力な作用ではなく, 遂にはいずれの場合も抗酸性となるのであつて, 抗酸化の遅延というべきものである。

(略語) 抗酸性桿状菌=afb, 非抗酸性桿状菌=nafb, 抗酸性顆粒=afg, 抗酸性顆粒連続体=afgg, methylene blue=MB, fuchsin=F, sulfathiazole=ST, p-aminobenzoic acid=PABA

(2) 高濃度の sulfathiazole 中に浸漬された菌の形態的变化

形態的变化をみるため大菌量を使用し, 高濃度の ST 液として Sulzol-S を使用したので pH の変化を考えて pH 7.8 の Buffer 培地⁵⁾4 ml を規準として ST の 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/ml の稀釈列を作り, おのおの glycerine bouillon 7 日菌の 10 mg/ml 浮游液 1 ml 宛を添加した。37°C 10 日観察するとはじめ数日は 2.5 mg/ml 以下の濃度では一過性に発育可能と思われた。24 時間, 4 日, 11 日後に菌を釣菌して観察し, 11 日後に菌を生食水で 3 回洗滌して Sauton agar に塗抹培養した。1~3 日の発育遅延は認められたがいずれも発育を示した。しかし ST 濃度が高いものでは若干発育程度が少なかつた。これらの菌の形態的観察で多数の

afb が終始認められ、抗酸性が消失することはないと思われた。10~5 mg/ml の高濃度の ST 中ではほとんど発育像を認めなかつたが、最初に投入した菌群中の nafb がむしろ減少する傾向を認めた。また対照中では7日以後培地陳旧化とともに陳旧性の非抗酸化が起るが、このような像は ST 中では認め難かつた。2.5 mg/ml 以下では nafb が増えていたが、この濃度では菌の発育が起つていないのが認められるので、この nafb を抗酸性脱失によるものと考えすることは出来ない。いずれにしても終始 afb 多数を認めたことは ST によつて afb が nafb に変ることを否定するものと考える。

(3) p-Aminobenzoic acid 含有 Sauton 培地中で認められる形態的变化

100 mcg/ml の割合に p-Aminobenzoic acid (PABA) を含有させた Sauton 培地で (1) と同様に検定した。この場合2日後の管底発育は800ないし400 mcg/ml の ST 中でもすでに afb であり、4日後800 mcg/ml 以下の ST 中で発育した菌膜も afb および弱 afb から成つていた。

(考案) PABA を含む Sauton 培地中では ST の阻止作用が消失して菌膜形成が起るが、同時に抗酸化の遅延も認められなくなり、発育のはじめから afb の集落が認められた。ST による抗酸化の遅延が PABA 添加によつて恢復したことは PABA の代謝が抗酸化の現象と関係していることを想像させる。Dubos⁷⁾ は "The Bacterial Cell" 中に mycobacterium の抗酸性が本質的に脂質、蠟質、mycolic acid と関係しているものではないと思われると述べている。Dubos の云うように抗酸性がむしろ例えば細胞壁の物理化学的性質に関連した細胞体制のある特殊性によるものであらうと云う可能性を考えるならば、あるいはかような可能性に PABA の代謝が関係する可能性もあらう。

(4) Sauton 培地で 200 mcg/ml Sulfathiazole 耐性菌を検定した場合の形態的变化

ST 耐性菌は前報³⁾で得たものを使用し、本報の (1) と同条件で検定した。ST 濃度 200 mcg/ml 以下で菌膜形成が認められた。

(i) 4日後: 200 mcg/ml の ST 中の管底発育を鏡検するとすでに afb の網状構造が認められた。すでに菌膜が生じた 50 mcg/ml 以下に生育したものは afb, 赤紫色菌, 紫色菌の混合からなつている。

(ii) 6日後: 200 mcg/ml の ST 中で菌膜が形成されるが、これは afb および弱 afb の集団である。一般に顆粒化の傾向が強く、桿状菌の菌体内に抗酸性顆粒 (afg) があきらかに認められるものが多く、afgg, 遊離の afg の型のものも相当認められる。

(iii) 10日後: 未だ管底発育である 400 mcg/ml の集落も afb 赤紫色菌の網状構造である。

(小括) ST 200 mcg/ml 耐性菌を前と同様に Sauton 培地で検定すると、感性菌でみられた抗酸化の遅延は認められなかつた。高濃度 (200~25 mcg/ml) の ST 中で発育した耐性菌は顆粒化の傾向が著明であつた。

(5) p-Aminobenzoic acid 含有 Sauton 培地で Sulfathiazole 耐性菌を検定した場合

PABA 100 mcg/ml 含有 Sauton 培地で同様に検定した。PABA の添加により 800 mcg/ml 以下の濃度で菌膜を形成した。この場合も4日後、6日後に800~400 mcg/ml で生育した菌膜を観察してみると、矢張 F 濃染乃至赤紫色の桿状菌が主となつているが、抗酸性短桿菌および顆粒が相当認められた。すなわち抗酸化の遅延はなく初期から afb の集団が認められ、顆粒化は感性菌の場合より著明であつた。

(6) Glycerine bouillon 中で Sulfathiazole によつて起る変化

pH 7.0, Glycerine bouillon (3% glycerine, 0.5% meat extract, 0.5% peptone) で稀釈法で検定した。接種菌は nafb 群と afb 群と2種使用した。nafb は glycerine bouillon 48 時間培養の管底発育から菌液を作り、あらかじめ一部を鏡検してほとんど全部 MB 好染 nafb であることを確めた。afb は同じく6日培養菌を振盪して菌膜表面の菌を分離遊離させ、この浮遊液を軽く遠心して上清をとつたものでほとんど全部 F に均一好染する afb よりなる。接種および検定は Sauton 培地の場合と同様である。

(i) 3日後: nafb 接種群でも afb 接種群でもその形態的变化はほぼ同様であつた。例えば nafb 接種群で 25~1.6 mcg/ml の ST 中で生育した管底発育を検すると、集落は MB に淡染又は濃染する網状組織からなるが、個々の菌は区別し難くいゆる substance cyanophile⁷⁾ の形となつている。この中心部には矢張少数の afb が認められる。この所見は接種した nafb 自身の抗酸化が起つていることを示す。そして接種した菌から nafb を次々に新生する過程によつて管底発育の状態に達し、この管底発育を構成する新生菌は非抗酸性のまま発育が阻害されている。対照および低濃度の ST 中では菌膜形成が起り集落の大部分は afb からなる。ただしこの両者の境界は判然と区別されず漸次移行している。afb 接種の場合の所見も以上とほぼ同様である。

(ii) 6日後: 阻止を受けて管底発育にとどまるものは nafb の網状構造からなるが、若干紫色調を帯びている。菌膜を形成するものは対照とほぼ同様の構成を示す。

(iii) 10日後: 管底発育を示す集落も大部分 afb の集団となつている。

(考案) ほとんど全部 nafb からなる菌液を接種に用いて ST の作用を検定しても、接種された菌自身は抗酸化する。したがつて nafb 接種でも afb 接種でも検定系

列の鏡検所見は相似の像を示す。すなわち接種された菌自身の抗酸化は発育阻止濃度の ST 中でも阻害されないが、この接種菌から ST 中で発生した新菌は抗酸化を阻害されて、抗酸化遅延が起ると考えられる。

(7) Buffer 培地中で Sulfathiazole によつて起る形態的变化

Buffer 培地⁵⁾を用いて ST 稀釈列を作り、(6)と同様に nafb 接種群と afb 接種群とを分けた。得られた結果は(6)とほぼ同様であるが、この培地では容易に添付標本を作り得て、また菌相互の関連が壊れないので美しい標本を得た。また栄養源に乏しいためか他の培地の場合よりも抗酸化の遅延が著明であつて 10 日後でも 0.4 mcg/ml 以上の領域では管底発育の状態にとどまつて(対照および ST 低濃度では菌膜が形成され抗酸化しているのは勿論である)、美しい nafb の網状構造又は、nafb の小球状集団の集合であつた。ST 濃度が減じるにつれて漸次 afb の小集団を減じ、菌膜を形成するものは afb の網状構造となつた。そして一般に ST 濃度が大なる試験管程、正常発育(対照)の若い時に認められる集落の構成が認められた。

総 括

Sulfathiazole (ST) の *M. avium* にたいする発育阻止作用を Sauton 培地, glycerine bouillon, 及び Buffer 培地で形態学的に観察した。

(1) ST は上述の培地中で *M. avium* の発育を完全に阻止することはなく、阻止発現迄に或程度の lag がある。10 日後判定で Sauton 培地検定では 6.3 mcg/ml 以上の ST 中では発育は管底架状発育にとどまつて阻止された。この ST の発育阻止作用域では、最初にその ST 含有 Sauton 培地に接種された菌自身は抗酸化を阻害されることもなく、また抗酸性の脱失も起らない。この接種された菌から次々と非抗酸性菌が新生して、非抗酸性菌を主とする管底発育となるが(この過程は正常発育過程で認められる)、この新生した非抗酸性菌の抗酸化は ST によつて阻害を受けて、すなわち抗酸化が遅延する。

(2) 発育阻止濃度の ST 中で *M. avium* が受ける形態的变化は、ST 中で新生した菌の抗酸化遅延および発育遅延であつて、単に正常発育の遅延にとどまる。ST そのものに由来する特殊な変形や抗酸性の脱失は高濃度より ST 中でも認められない。

(3) 培地に PABA を添加した場合又は ST 耐性菌を接種した時には上述の抗酸化の遅延ははじめから認められない。

(4) ST 耐性菌が比較的高度の ST 中で発育する際には顆粒化の傾向が著明であつた。

御指導下さつた勝沼六郎院長と名大第一内科日比野進教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Northey, E. H.: The Sulfonamides and Allied Compounds, Reinhold Publ., New York, 1948.
- 2) 三浦義彰: サルファ剤および抗生物質を中心とする最近 10 年間の結核化学療法, 薬学, 2 (1), 59~72, 1948.
- 3) 東村道雄・君野徹三・橋本正・鈴木隼三郎: Sulfathiazole の抗結核菌作用について (1), Chemotherapy 掲載予定.
- 4) Courmont, P., Morel, A., et Perier, M. E.: Action infertilisante in vitro de quelques composés arylsulfonamidés vis-à-vis des cultures homogènes de Bacilles de Koch, Compt. rend. soc. biol., 129: 663~667, 1938.
- 5) 東村道雄: 結核菌の発育環に関する研究, 結核, 26: 315~319, 373~377, 1951; 医学と生物学, 23: 73~75, 117~120, 198~201, 1952; *ibid.*, 24: 75~77, 183~186, 1952; *ibid.*, 26: 7~9, 89~91, 1953.
- 6) Smith, D. G., and Waksman, S. A.: Tuberculo-static and tuberculocidal properties of streptomycin, J. Bact., 54 (2): 253~261, 1947.
- 7) Bezançon, F., Philibert, A., et Hauduroy, P.: Sur la structure des voiles jeunes des cultures de Bacilles Tuberculeux, Compt. rend. soc. biol., 90: 475~477, 1924.
- 8) 植田三郎: 結核菌の形態および発育様式, 結核新論 (II) 京都大学医学部芝蘭会編, 金芳堂, 昭 27. p. 67~100.
- 9) Hauduroy, P.: 結核菌の特異な染色性とその本質, 結核新書第 14 集, 東京, 医学書院, 1953. (植田三郎訳)