

細胞内結核菌に及ぼす抗結核剤の影響

吉 武 洋 海

結核予防会結核研究所一所长 隈部英雄

受付 昭和 31 年 1 月 10 日

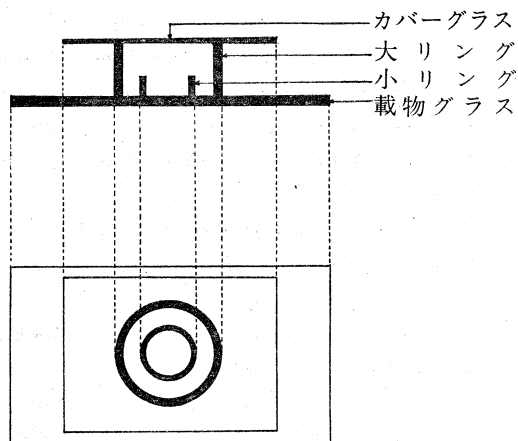
緒 言

SM, PAS, INAH 等の抗結核剤が相次いで発見され、試験管内実験においてはもちろん、生体内の病変に対しても効力のあることが認められ、結核症の治療に大きな変革をもたらすに至ったが、これら薬剤の治療効果は必ずしも試験管内実験成績とは一致していない。この点に関して、組織培養下に、Streptomycin (SM), p-aminosalizilic acid (PAS), isonicotinic acid hydrazid (INAH), Viomycin (VM), Terramycin (TM) Pyrazinamide (PZA) の細胞内結核菌に対する抗菌力を観察し、試験管内実験成績との比較を行った。

実験材料ならびに実験方法

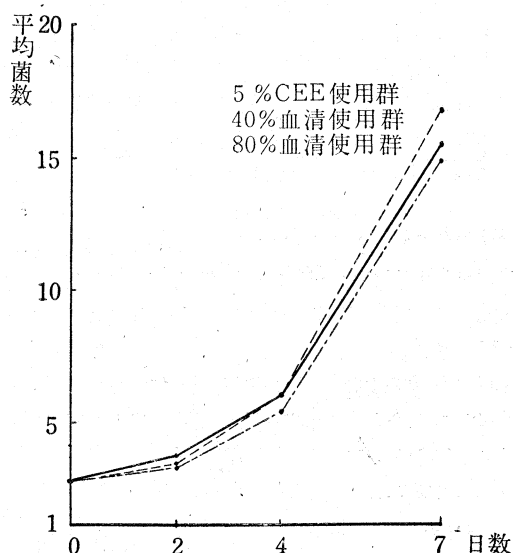
詳細は総合医学13巻4号¹⁾に報告したがその大要を記すと、人型菌 H₃₇Rv を 0.05% に Tween 80 を加えた 10% 馬血清加 Kirchner 培地に 7~10 日培養したもの、または Sauton 培地に 2 週培養後、5% Tween 80 蒸溜水稀釈液を加えて菌浮游液を作製²⁾したものを遠沈、その上清をとり、結核菌の単個菌浮游液を作製する。これと海狸腹腔内単球浮游液を混じて結核菌貪食細胞を作製し、図 1 に示すような培養器中に各薬剤を加えた培養液を用いて培養、一定時間後に染色、顕微鏡下にその菌数を数えて、貪食細胞中の平均菌数を求め、これにより細胞内結核菌に対する抗菌力の比較を行った。

第 1 図



第 2 図

CEE の有無および血清濃度の異なる培養液を用いた場合の細胞内結核菌の増殖



培養液は初期の実験では、血清濃度は 20%，これに鶏胎児組織液 (CEE) を 5% に加えたものを用いたが、後には 40% 血清タイロッド稀釈液を用い CEE は用いていない。Bloch³⁾, Dessan⁴⁾ は試験管内において、CEE の結核菌増殖促進を認め、一方 Abramson⁵⁾ は促進作用は認めないとのべている。CEE の有無および血清濃度の差による細胞内結核菌の増殖を比較した結果図 2 清に示す如く、各群の間には著明な差は認められず、CEE の有無および血清濃度の差による成績の変動はほとんどないものと考えられる。

実験成績

I. SM, PAS, INAH による細胞内結核菌増殖阻止

DHSM 0.1 γ ~1,000 γ , PAS 0.01 γ ~100 γ , INAH 0.01 γ ~100 γ を用いて細胞内結核菌の増殖に対する阻止力を観察した。実験当初において、標本中の細胞数は約 2 万/cc、結核菌貪食細胞数の全細胞数に対する比 (貪食率) は約 15%、平均菌数 1.9、1 個の細胞中の菌は大多数

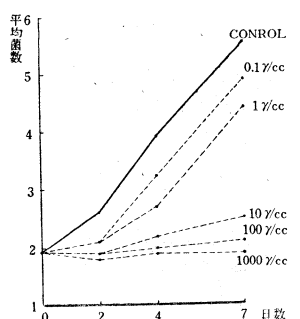
の場合1~2コで、6コ以上の菌を貪食した細胞はない。また細胞外にも菌はほとんど認められない。

A. 対照群における結核菌の増殖

培養2日後には菌体の伸長とともに僅かながらも菌の

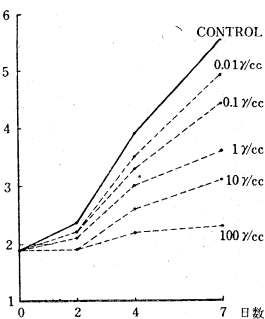
第3図

SMの細胞内結核菌増殖阻止力



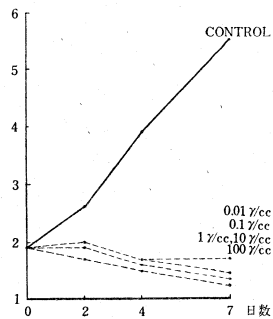
第4図

PASの細胞内結核菌増殖阻止力



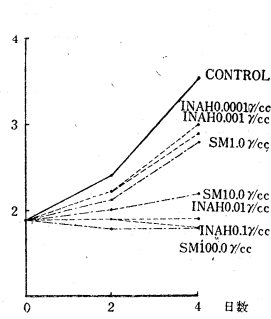
第5図

INAHの細胞内結核菌増殖阻止力



第6図

INAH, SMの細胞内結核菌増殖阻止力



増殖がみられ、4日後にはかなりのまた7日後には著明な増殖が認められ、細胞体内に菌が充満し、核は周辺に圧迫されるに至つたものもかなり見出され、平均菌数は5.5を示した。

B. SM使用群における結核菌の増殖 (第3図)

SM0.1γ, 1γ群では、初期においては結核菌の増殖は対照に比しやや劣るが、その後の増殖は著しく、対照とほぼ平行した増殖を示し、一部には著明な増殖像がみられる。

これに対し10γ群では、7日後においても菌の増殖はかなり少なく、平均菌数は2.5、10コ以上の菌を入れた細胞は見出せない。100γ, 1000γではほぼ完全な増殖阻止を認めた。

C. PAS使用群における結核菌の増殖 (第4図)

図に示す如く、0.01γ, 0.1γ群では初期における結核菌の増殖は対照に比しやや劣るが、その後の増殖は著明で、7日後における増殖は対照のそれとほとんど差を認めない程度である。1γ, 10γでは、なおその増殖阻止力は著明ではなく、菌の増殖はかなり明かにみられる。100γでは著明に増殖を阻止したが、なお菌増殖の傾向が明かに認められ、完全阻止はえられない。

D. INAH使用群における結核菌の増殖 (第5, 6図)

図5, 6に示す通りである。この2つの実験は、貪食率および平均菌数はほぼ同程度であつて、十分に比較しうるものと考えられる。INAH0.001γ以下の濃度では菌の増殖はかなり認められるが、0.01γ以上では完全に増殖を阻止した。

またこの場合、時間の経過とともに平均菌数の減少および菌体の抗酸性の低下が認められ、この傾向は濃度の高いほど著しい。

II. VM, TMによる細胞内結核菌増殖阻止

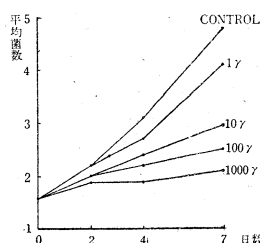
VM1γ~1,000γ, TM1γ~100γを用いて細胞内結核菌に対する増殖阻止力を観察した。実験当初において、標本中の細胞数は8,000/cc, 貪食率は16%平均菌数1.7,

貪食細胞は1~2コの菌を入れたものが約80%で、5コ以上の菌を貪食したものは約1%である。

A. 対照群における結核菌の増殖

第7図

Viomycinの細胞内結核菌増殖阻止力



第8図

Terramycinの細胞内結核菌増殖阻止力

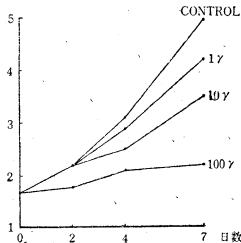


図7, 8に示す如く、時間の経過とともに明かな増殖が認められ、7日後には平均菌数は4.8で10コ以上の菌を有する細胞はかなりの数に見出される。

B. VM使用群における結核菌の増殖 (第7図)

VM1γでは、7日後における菌の増殖はかなり著明で、対照に比し僅かに劣るにすぎず、10γにおいてもなおかなりの菌の増殖が認められる。100γ以上の濃度では著明に増殖を阻止するが、なお完全な増殖阻止はえられない。

C. TM使用群における結核菌の増殖 (第8図)

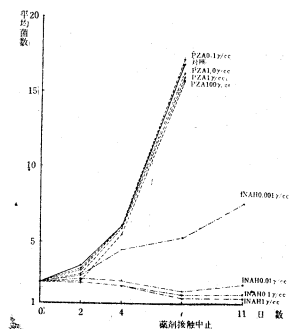
TMの著明な増殖阻止作用は100γにおいてのみ認められ、1γ, 10γでは菌の増殖はかなり著しい。

III. INAH, PZA 単独およびその併用による細胞内結核菌増殖阻止および殺菌作用

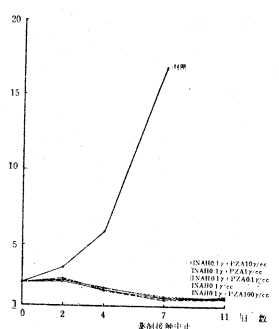
INAH 0.001γ~0.1γ, PZA 0.1γ~100γの単独およびこれらの併用による細胞内結核菌増殖阻止および殺菌

作用について観察を行つた。実験当初においては、細胞数は約2万/cc、食喰率は約18%、平均菌数2.5、食喰細胞中1~2コの菌を食喰したものが約70%、6コ以上の菌を食喰したものは6%で、8コ以上の菌を食喰したものはみられない。なお本実験では、Sauton 培地に2週培養したH₃₇Rvに5% Tween 80 蒸溜水稀釈液を加えて菌浮游液を作製した。

第9図 INAH, PAS 単独による細胞内結核菌の増殖阻止作用および殺菌作用



第10図 INAH0.1γ と SZA併用による細胞内結核菌の増殖阻止作用および殺菌作用

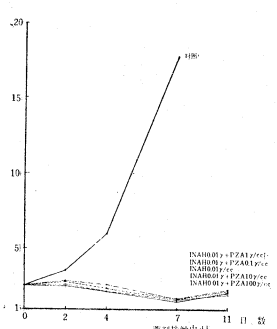


(第10図)

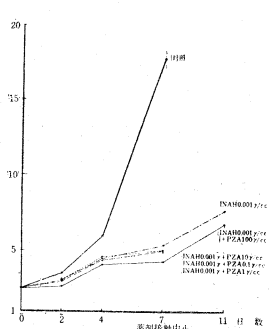
INAH0.01γ に P Z A を併用した実験成績も、INAH 単独の場合と全く同様であつて、併用による増殖阻止および殺菌作用の増強は認められず、薬剤接触中止後には僅かながら菌の増殖が認められる。(第11図)

INAH0.001γ に P Z A を併用した実験成績では、INAH 単独による成績に比し、P Z A 100γ を併用した場合

第11図 INAH0.01γ と P Z A 併用による細胞内結核菌の増殖阻止作用および殺菌作用



第12図 INAH0.001γ と P Z A 併用による細胞内結核菌の増殖阻止作用および殺菌作用



殺菌作用の観察に際しては、薬剤を加えた培養液を用いて7日間、その後薬剤を含まない培養液を用いて4日間培養し、薬剤接触中止後の菌増殖の状態から菌の生死を判断した。

A. 対照群における結核菌の増殖

9~12図に示す如く、4日までの菌の増殖はゆるやかであるが、その後急激に増殖し、7日後には平均菌数16.8、菌増殖のために細胞体が破壊されたものは約10%また細胞体内に菌が充満したものは約20%に見出された。

B. INAH, P Z A 単独使用による結核菌増殖阻止および殺菌作用

INAH 0.001γ ではかなりの菌の増殖が認められるが0.01γ 以上の濃度では増殖は完全に阻止され、時間の経過とともに平均菌数の減少がみられる。一方、P Z A 単独では結核菌増殖阻止作用は認められず、菌の増殖は対照群のそれとほとんど同程度である。薬剤接触中止後の結核菌の増殖を観察すると、INAH0.1γ 群では菌の増殖像は認められず、ほぼ完全に殺菌されたものと考えられる。しかし、0.01γ 群では軽度ながら増殖が認められ、完全殺菌はえられない。

C. INAH, P Z A 併用による結核菌増殖阻止および殺菌作用

その成績は図10, 11, 12に示す通りである。INAH 0.1γ では結核菌の増殖は完全に阻止され、また7日間の薬剤接触によりほとんど完全に殺菌されており、これにP Z A の併用を行つてもその影響は全く見られない。

にはやや平均菌数の低下がみられるが、その差は著明なものではなく、増殖像はほぼ同程度で、また薬剤接触中止後の菌増殖も INAH0.001γ 単独の場合のそれとほぼ平行しており、著明な増殖阻止および殺菌作用の増強は認めえない。(第12図)

総 括

人型菌H₃₇Rvの細胞に対する毒性について、Bloch⁶⁾はH₃₇Rvで感染した顆粒細胞は早急に死滅するとのべMackness⁷⁾もH₃₇Rvはそのままでは組織培養の実験には適しないとのべている。しかし、本実験ではH₃₇Rvは十分実験に使用しえたので、この菌株を用いて抗結核剤の細胞内および10%馬血清加Kirchner培地または1%KH₂PO₄培地における抗菌力を観察した。抗結核剤の抗菌力は接種菌量により異なることはいうまでもない(8~11)。本実験に用いたH₃₇Rvに対する抗結核剤の増殖阻止力を10%馬血清加Kirchner培地及び1%KH₂PO₄培地において観察すると、表1~5に示す如く、接種菌量により、その最低阻止濃度にかなりの差が認められる。

一方、組織培養実験における生菌数は、10⁻³mgの菌量を用いた試験管内実験とほぼ同程度であるので、接種菌量10⁻¹mgの試験管内実験と組織培養下における成績とを比較した。SMによる細胞内結核菌の増殖阻止は、Magoffin¹²⁾、Mackness⁷⁾、Suter¹³⁾の報告の如く、試験管内実験に比し、かなり高い濃度を要する。すなわち、1%KH₂PO₄培地においては、0.1γで不完全阻止、

第1表 SMの結核菌増殖阻止力

菌株 H₃₇Rv培地 1%KH₂PO₄培地

4週判定

SM濃度(γ/cc) 菌量(mg)	対 照	0.01	0.1	1	10
10 ⁻¹	冊	冊	冊	冊	—
10 ⁻²	冊	冊	冊	冊	—
10 ⁻³	冊	冊	冊	冊	—

第2表 PASの結核菌増殖阻止力

菌株 H₃₇Rv

培地 10%馬血清加 Kirchner 培地

4週判定

PAS濃度(γ/cc) 菌量(mg)	対 照	0.1	1	10	100
10 ⁻¹	冊	冊	冊	冊	—
10 ⁻²	冊	冊	冊	冊	—
10 ⁻³	冊	冊	冊	冊	—

第3表 INAHの結核菌増殖阻止力

菌株 H₃₇Rv

培地 10%馬血清加 Kirchner 培地

4週判定

INAH濃度(γ/cc) 菌量(mg)	対 照	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10
10 ⁻¹	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻²	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻³	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

第4表 Viomycinの結核菌増殖阻止力

菌株 H₃₇Rv

培地 10%馬血清加 Kirchner 培地

4週判定

VM濃度(γ/cc) 菌量(mg)	対 照	0.75	1.5	3	6	12	24	48	96
10 ⁻¹	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻²	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻³	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻⁴	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

第5表 Terramycinの結核菌増殖阻止力

菌株 H₃₇Rv

培地 10%馬血清加 Kirchner 培地

4週判定

TM濃度(γ/cc) 菌量(mg)	対 照	0.75	1.5	3	6	12	24	48	96
10 ⁻¹	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻²	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻³	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
10 ⁻⁴	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

10γで完全阻止を示すのに対し、細胞内結核菌は10γでなお明かな増殖を示し、100γ以上ではほぼ完全な増殖阻止がみられた。SMは比較的安定で^{14)~16)}、かつ血清の存在によつても結核菌のSMに対する感性は変らない⁷⁾といわれており、したがつて、この現象は培養液中において、SMの抗菌力が低下することに原因するものでは

なく、Marshall¹⁷⁾の主張する如く、SMは細胞外液相中に局限され、細胞内への移行が困難なものと考えられる。PASはKirchner培地中では10γで完全阻止、0.1γで不完全阻止を示すが、細胞内結核菌に対する阻止力は極めて弱く、100γにおいてもなお軽度の菌増殖が認められ、完全阻止には100γ以上の濃度を要するもの

と考えられ Mackaness の報告と一致する。PAS 溶液は常に新しいものを使用しており、また本剤は血清の存在する培地中においても比較的安定であるといわれている¹⁶⁾ ので、この阻止力の差は培地中の PAS 抗菌力低下に原因するとは考えられず、SM と同様に細胞内に移行し難いものであろう。一方、INAH は Suter¹⁵⁾、Mackaness¹⁸⁾ の報告と同様に、細胞内結核菌増殖阻止濃度と、Kirchner 培地中における阻止濃度との間には差が認められず、したがって、INAH は容易に細胞内に移行しうるものと考えられる。また、INAH 実験群においては、諸家^{19)~20)} の報告の如く、結核菌の抗酸性の低下が認められ、特に高濃度の場合に著しい。平均菌数が時間の経過とともに減少したことは、この抗酸性の低下により菌体の被染性が弱くなったことが1つの原因と考えられる。VM は試験管内では、1~6.25 γ で結核菌の増殖を阻止し、血清の存在する培地では、血清のない培地に比し、約2倍の VM を要するといわれる^{21)~26)}。また Mackaness は Dubos-Davis 培地では 6.25 γ 、細胞内の結核菌は 100 γ で増殖を阻止されたという。本実験では Kirchner 培地中では 3 γ で不完全阻止、6 γ で完全阻止を示したが、細胞内結核菌は 10 γ でも明かな増殖を示し、また 1,001 γ においても僅かながら増殖像が認められ、細胞内結核菌の増殖阻止には、Kirchner 培地中における成績に比し、多量の VM が必要であり、その阻止力は SM と PAS の間に位置する程度と考えられる。TM の抗菌力については、Hobby²⁷⁾ は 4~16 γ 、Mackaness は Dubos-Davis 培地中においても、また細胞内の結核菌も 12.5 γ で増殖を阻止するとのべているが、本実験では、Kirchner 培地中では 12 γ で不完全阻止、24 γ で完全阻止を示したが、細胞内結核菌は 100 γ においてのみ明かに増殖が阻止されるにすぎず、その成績は PAS とほぼ同様であった。PZA の結核菌増殖阻止作用については Trachis²⁸⁾ は 1,000 γ においてもなお菌の増殖を認め、Steenken²⁹⁾ も血清を含まない培地中においても 100 γ ~200 γ で僅かに増殖を阻止するにすぎないという。本実験においては、PZA の細胞内結核菌増殖阻止作用はほとんど認められず、100 γ においても菌の増殖は対照のそれとほとんど変りがない。なお 1,000 γ では細胞に毒性を示し、細胞は 96 時間後には全く死滅した。INAH の殺菌作用について、Mackaness¹⁸⁾ は Dubos-Davis 培地中では 10 γ で、細胞内結核菌は 1 γ に 11 日間接触することにより、また馬場³⁰⁾ は 1 γ に 4 週間接触で完全殺菌を認めている。上野³¹⁾ はその際、接種菌量によりその作用に多少の変動があることを報告している。本実験の成績では、細胞内結核菌は INAH 0.01 γ では完全殺菌はえられないが、0.1 γ に 7 日間接触した場合には、接触中止後の増殖は認められず、ほぼ完全に殺菌されたものと考えられる。この成績は諸家の報告に比してやや異り、INAH

の殺菌作用は強く示されたが、これは本実験では生菌数がかなり少ないことがその原因の1つと考えられる。INAH、PZA 併用による殺菌作用の増強について、Dermott は動物実験において臓器中の結核菌は培養上検出されなかつたとのべ、Compagna³³⁾、Schwartz³⁴⁾ も臨床上良好な治療効果をえたとのべているが、本実験ではかかる殺菌作用の増強は認めえなかつた。以上の如く抗結核剤の細胞内結核菌に対する増殖阻止力を Kirchner 培地または 1%KH₂PO₄ 培地における阻止力と比較すると、INAH はいずれの場合にもほぼ同程度の阻止力を示すが、SM、VM、PAS、TM は細胞内結核菌増殖阻止には約 10 倍~100 倍近くの濃度を要し、その阻止力は INAH > SM > VM > PAS $\approx$ TM であった。この成績は諸家の動物実験成績^{35)~48)} に近似しており、この方法は抗結核剤の Screening Test としても十分用いるものと考えられる。

結 論

結核菌貪食細胞を用いて組織培養下に各種抗結核剤の細胞内結核菌に対する抗菌力を観察し、試験管内実験における抗菌力との比較を行った。

1. INAH は細胞内外を問わずいずれも同程度の増殖阻止力を示すが、SM、PAS、VM、TM は細胞内結核菌の増殖阻止には、試験管内実験に比し、かなり多量を要する。また PZA 単独では結核菌増殖阻止力はほとんど認められない。
2. INAH 0.1 γ に 7 日間接触することにより、細胞内結核菌はほぼ完全に殺菌される。
3. INAH と PZA を併用した場合の抗菌力は INAH 単独のそれとほぼ同程度で、PZA 併用による抗菌力の増強は認められない。
4. 本実験の成績は、動物実験成績に近似しており、この方法は抗結核剤の Screening Test として十分用いるものと考えられる。

本論文の一部は第 30 回日本結核病学会総会において発表した。

終りに臨み、御校閲を賜った岩崎部長に謝意を表する。

主 要 文 献

- 1) 吉武：綜合医学，13—4 に掲載予定
- 2) 大林他：結核診療，9—3, 603, 昭30.
- 3) Bloch, H. : J. Exp. Med., 83—5, 355, 1948.
- 4) Dessan, F.I. : Tubercle, 26—2, 75, 1945.
- 5) Abramson, S. : Am. Rev. Tbc., 65—6, 783, 1952.
- 6) Bloch, H. : Am. Rev. Tbc., 58—6, 662, 1949.
- 7) Mackaness, G.B. : J. Path. and Bact., 64—3,

- 429, 1952.
- 8) Knox, R. et al. : Lancet, 263—1, 854, 1954.
- 9) 岩崎 : 第30回結核病学会総会(特別講演), 昭30.
- 10) 上野 : 日本細菌誌, 9—7, 499, 1954.
- 11) 佐藤 : 医学と生物学, 25—1, 17, 1953.
- 12) Magoffin, R.L., Spina, W.W. : J. Lab. and Clin. Med., 37—6, 924, 1951.
- 13) Suter, E. : Am. Rev. Tbc., 65—6, 775, 1952.
- 14) Waksman : Streptomycin Williams & Wilkins Co. 45, 1940.
- 15) 佐藤 : 慶応医学, 29—2, 69, 昭26.
- 16) 上野 : 薬剤部長年報, 14—2, 8, 1954.
- 17) Marshall, E.K. : J. Pharmacol., XCii, 43, 1948.
- 18) Makaness, G.B. : Am. Rev. Tbc., 67—3, 322, 1953.
- 19) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tbc., 65—6, 765, 1952.
- 20) Wagner, W.H. et al. : Beitr. klin. Tbk., 110—3, 236, 1953.
- 21) Finlay, A. C. et al. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 1, 1951.
- 22) Bartz, Q.R. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 4, 1951.
- 23) Ehrlich J. et al. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 7, 1951.
- 24) Hobby, G. et al. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 17, 1951.
- 25) Youmans, G. P. and Youmans, A.S. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 25, 1951.
- 26) Steenken, W. et al. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 30, 1951.
- 27) Hobby, G. et al. : Am. Rev. Tbc., 63—4, 434, 1951.
- 28) Trachis, M.S. : Am. Rev. Tbc., 67—3, 393, 1953.
- 29) Steenken, J. & Wolinsky, E. : Am. Rev. Tbc., 70—2, 363, 1954.
- 30) 馬場 : 医療, 8—1, 8, 昭29.
- 31) 上野 : 日本細菌誌, 9—7, 499, 昭29.
- 32) Dermott, W. M. et al. : Am. Rev. Tbc., 69—3, 319, 1954.
- 33) Compagna, M. et al. : Am. Rev. Tbc., 69—3, 334, 1954.
- 34) Schwartz, W.S. and Moyer, R.E. : Am. Rev. Tbc., 70—3, 413, 1954.
- 35) Karlson, A.G., Feldman, W.H. : Am. Rev. Tbc., 58—1, 129—1948.
- 36) Karlson, A.G. et al : Am. Rev. Tbc., 62—2, 149, 1950.
- 37) Karlson, A.G., Feldman, W.H. : Am. Rev. Tbc. 68—4, 575, 1953.
- 38) 岩崎 他 : 日結, 11—7, 430, 昭27.
- 39) 岩崎 他 : 日結, 12—2, 107, 昭28.
- 40) Desbordes, et al. : Acta phtisiologica—5, 14, 1952.
- 41) 丸山 : 通信医学, 5—6, 426, 昭28.
- 42) 中院 : 綜合臨床, 2—1, 62, 昭28.
- 43) Siebnemann, C. : Am. Rev. Tbc., 68—3, 411, 1953.
- 44) 菅原 : 抗研誌, 9—1, 38, 昭28.
- 45) 岡 : 治療, 34—8, 749, 昭27.
- 46) 橋本 他 : 最新医学, 9—6, 96, 1951.
- 47) Karlson, A.G. : Am. Rev. Tbc., 63—1, 36, 1951.
- 48) Söderholm, B. : Act. Tuberc. scand. 27—1~2, 108, 1952.

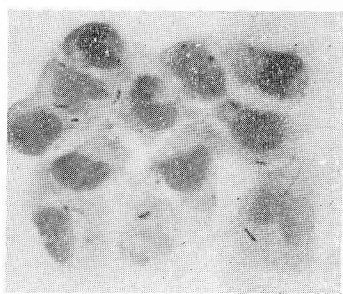


写真 1 培養当初の標本

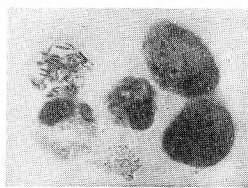


写真 2 対照群 7 日培養

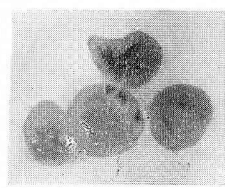


写真 3 SM 0.1 γ
7 日培養

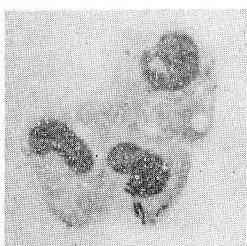


写真 4 SM 10 γ 7 日培養



写真 5 SM 1,000 γ
7 日培養



写真 6 PAS 100 γ 7 日培養

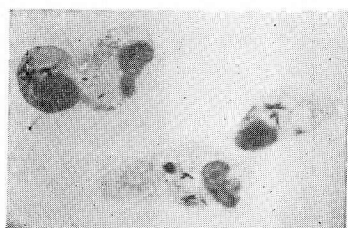


写真 7 INAH 0.001 γ 7 日培養

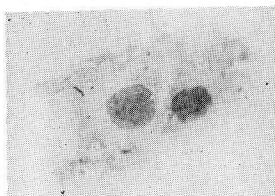


写真 8 INAH 0.01 γ 7 日培養

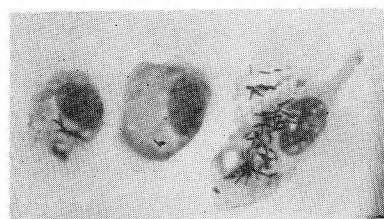


写真 9 INAH 0.001 γ 7 日接触後
4 日培養



写真 10 INAH
0.01 γ 7 日接
触後 4 日培養

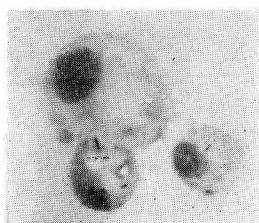


写真 11 INAH 0.1 γ 7 日接
触後 4 日培養



写真 12 PZA 100 γ 7 日培養