

# 抗結核剤による結核菌（ミコバクテリウム）の形態、 發育様式の変化に関する研究

## Ⅲ 薬剤の作用条件を種々変化せしめた場合および SM, INH を 同時にあるいは前後して作用せしめた場合

伊 藤 義 昭

京都大学結核研究所細菌血清学部（主任 植田三郎 教授）

国立宇多野療養所（所長 日下部周利博士）

受付 昭和32年11月27日

### 緒 言

SM, INH によつて結核菌の發育初期集落がいかに変化を受けるかについては前報<sup>1) 2)</sup>に述べたごとくである。すなわち SM, INH はおのおの特異な形態的变化を結核菌に起きしめるが、両剤いずれを作用せしめた場合にも変化するのは配列の先端部の菌体のみであり、配列の基部の菌体は変化しないこと、また人型菌においてはその変化の推移が遅く、非病原性 *Mycobacterium* では速いこと等が明らかとなつた。これらの所見は結核菌の初期集落中配列の先端部の菌体は生活状態にあり、このような生活状態にある菌体だけに SM および INH による変化が起ることを示すものごとくである。

このような点をさらに詳細に検討すべく、培養の古い集落、あるいは休止ないし死滅せしめた菌に抗結核剤がその形態にいかん作用するかについて観察した。かねて SM, INH 両剤を同時にあるいは前後して作用せしめた場合、いかなる変化を示すかも興味あることと考へて検討を加えた。

### 材料および方法

菌株、培養基等は前報<sup>1) 2)</sup>と同じであるが、ことに菌株については主として非病原性のスメグマ菌、A-1 株を用い、下記のごとく主要な項目についてはさらに人型菌、鳥型菌についてもこれを確かめた。

方法は下記各項において述べるが、ただ SM, INH 以外の薬剤は次のごとく用いた。すなわち石炭酸、ホルマリンはともに 1% 水溶液、サルファチアゾールは Salzol-S (20% 武田) から 1% 水溶液を作り、これらを原液として、稀釈し作用せしめた。

また各項の実験はいずれも少なくとも 2 回以上繰返して確かめた。

### 実 験 成 績

#### I. 培養のやや古い集落に SM あるいは INH を作用せしめた場合

キルヒナー培養基に培養した場合、A-1 株においては 1 週、H<sub>37</sub>Rv 株においては 4 週前後には培養基表面に發育が十分にみられる。このような菌膜に SM, INH の阻止濃度を添加作用せしめ、2 週後までその変化を第 1 報<sup>1)</sup>と同様の方法で観察した。

古い集落においては多数の菌体は変化を受けず、配列の先端部の少数の菌体あるいは菌膜中の一部分の菌体のみに SM, INH に特徴的な変化がみられた。すなわち發育ごく初期の集落においてはほとんどの菌体が変化を示した<sup>1) 2)</sup>のにもかかわらず、古い集落では一部少数の菌体が変化を起したにすぎなかつた。このような所見は薬剤作用 2 週後まで追及してもほぼ同様な状態に留まり、変化する菌体が増加するような傾向はみられなかつた。

#### II. 氷室 (5°C) において SM あるいは INH を作用せしめた場合

キルヒナー培養基にスメグマ菌、鳥京株、H<sub>37</sub>Rv 株の初期集落を形成せしめ、これに SM 各種濃度を添加し、また A-1 株、H<sub>37</sub>Rv 株に INH 各種濃度を添加し、これらを氷室内に移して作用せしめ 1 週後まで観察した。その一部は 5 日後に再び 37°C に返してその後の変化をみた。5°C においては薬剤を添加しなかつた対照においても發育は全然みられず、また初期集落中の菌の形態、染色性はほとんど不変であつた。薬剤 (SM あるいは INH 各濃度) 添加のものにおいても対照におけると同様にならぬ変化をも認めなかつた。すなわち氷室内では菌は氷室に移した当初の状態に留まつて發育せず、また同時に薬剤による変化も示さなかつた。しかしながらこのような状態の菌を再び 37°C に返せば、対照では發育が再開せられ、薬剤添加のものでは最初から 37°C に置いたものと同様に大多数の菌体に特徴的な変化が起つた。

ちなみに A-1 株に INH を作用せしめた場合についてみるに、氷室においては上記のごとく対照では発育も起らず、薬剤添加のものでは変化もまた起らないが、室温 (20°C) では対照はやや緩徐に発育し、薬剤添加のものでは変化は起るがその変化の推移もまた 37°C の場合に比して緩徐であつた。

### III. 蒸留水中で薬剤を作用せしめた場合

次に蒸留水中 (37°C) で SM, INH の各濃度を各菌型に作用せしめた場合について検討した。

非病原性菌、ことに A-1 株はその初期集落を蒸留水に移したのちにおいても微弱ながらも発育増殖を続けた。しかしあらかじめ薬剤を含む蒸留水中に移したときには発育はみられず既存の菌体に遅れて変化が観察された。

鳥型菌においてはその集落を蒸留水に移した場合、肉眼的には発育は認めがたいが、蒸留水中で薬剤をただちに作用せしめた場合にはやはり変化が起つた。しかしその速度は非常に遅れた。さらに蒸留水中に 5~7 日放置してのちこれに薬剤を添加作用せしめた場合にはもはや特徴的な変化はほとんど起らなかつた。

人型菌においては蒸留水中で薬剤をただちに作用せしめても薬剤による変化はほとんど認められないか、あるいは変化はごく軽度に留まつた。さらに蒸留水中に数日放置後薬剤を作用せしめた場合にはほとんど変化は認められなかつた。

### IV. 加熱した発育初期集落に対する薬剤の作用

A-1 株の初期集落を形成せしめ、これを 56°C の水浴中で 30 分加熱してのち、薬剤を含むキルヒナー培養基に移し、5 日後まで観察した。対照すなわち加熱後薬剤を含まない培養基に移した集落においては、数日間発育はみられず (のちには一部ごく少数の菌体からは発育が起るごとくであつた)、また形態、染色性については染色性の多少の低下以外はほとんど変化はなかつた。加熱後薬剤含有培養基に移した集落においてもまたほとんど変化を認めず、上記の対照と同様であつた。すなわち加熱死滅せしめた上記のごとき集落においては薬剤による特徴的な変化は起らなかつた。

### V. 乾燥した発育初期集落に対する薬剤の作用

A-1 株の初期集落をあらかじめ滅菌スライド上に置いた 1 滴の蒸留水中に浮かばせ、37°C で乾燥し、そのまま 37°C に 1 週間放置後、薬剤を含むキルヒナー培養基をその上に滴下し、そのスライドを湿室内に納めて 4 日後まで変化を追及した。乾燥操作のみでは染色性は変化を受けなかつた。しかしこれに薬剤を含まない培養基を添加したものでは染色性の全般的な多少の低下が起つた。またこのような乾燥した初期集落は上記の観察期間中には発育を起さなかつた。

薬剤含有培養基を添加した集落においてもまた対照と

ほぼ同様な所見であつて、各薬剤に特有ななんらの変化も認められなかつた。

VI. その他の薬剤 (石炭酸, ホルマリン, サルファチアゾール) をあらかじめ作用後あるいは同時に SM あるいは INH を作用せしめた場合

#### (a) 石炭酸

A-1 株に対し石炭酸 0.01% (水溶液中) では発育が許され、同時に SM あるいは INH を加えたものでは SM あるいは INH に特有な変化がみられた。これに対し、石炭酸 0.1%, 1% を作用せしめたものでは発育はみられず、またこの場合石炭酸のみによつては形態、染色性にほとんど影響を認めなかつた。この石炭酸 0.1%, 1% と SM あるいは INH とを同時に作用せしめたものでは SM あるいは INH による変化はみられなかつた。さらに石炭酸 0.1%, 1% に接触 1 日後 SM あるいは INH を含むキルヒナー培養基に移した場合は発育はみられず、また SM あるいは INH による変化も起らなかつた。

#### (b) ホルマリン

A-1 株の初期集落にホルマリンを 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% になるように添加すると 1 日後 0.01% まで発育が抑制されていた。これに SM あるいは INH を添加作用せしめ 3 日後まで観察した。ホルマリンによつて抗酸性が減弱する傾向がみられたが、SM あるいは INH による変化のごとき菌体の膨化、顆粒形成等はみられなかつた。

発育が阻止されている場合 (1%~0.01% ホルマリン) では SM あるいは INH を作用せしめても変化はみられなかつたが、ホルマリン 0.001% においては発育がみられ、これに SM あるいは INH を作用せしめた場合にはそれぞれの特徴的な変化が起つた。

#### (c) サルファチアゾール<sup>3)</sup>

A-1 株の初期集落にサルファチアゾールを 1%, 0.1%, 0.01% となるように添加し、1 日後 INH 100 $\gamma$  をさらに添加作用せしめ 6 日後まで観察した。

サルファチアゾールのみでは 0.1% および 0.01% では発育阻止はみられず、これに INH を作用せしめたときには INH に特徴的な変化がみられた。サルファチアゾール 1% 作用後のものでは発育は阻止されており、これに INH を作用せしめても INH による変化は観察されなかつた。またサルファチアゾール 1% のみによつて菌体内にやや大形の顆粒形成の傾向がみられたが、SM あるいは INH にみたごとき顕著な変化は起らなかつた。

VII. SM 作用後 INH 作用, INH 作用後 SM 作用, あるいは SM, INH 同時作用の場合

#### (a) 両剤を前後して作用せしめた場合

A-1 株の初期集落に SM 1,000 $\gamma$ , INH 100 $\gamma$  (両

者ともに阻止濃度) を別々にまず作用せしめ、1日後 SM を作用せしめたものには INH を、INH を作用せしめたものには SM をさらに添加作用せしめた。

いずれの場合にも最初に作用せしめた薬剤による変化が認められ、あとに加えた薬剤の影響は認めがたかつた。ただ INH 作用6~8時間後の集落(未だ INH に特徴的な変化を明らかに示していない)に SM を重ね

て添加作用せしめた場合は SM による変化を示すように変つた。しかし逆の場合すなわち SM 作用短時間後 INH 作用の場合はやはり最初に加えた SM による変化がみられ、INH による変化を示すことはなかつた。

(b) 両剤を同時に作用せしめた場合

A-1 株の初期集落に SM, INH を表1のごとき組合せで同時に作用せしめてその変化を2週後まで観察した。

表1 A-1 株の発育初期集落に SM, INH を同時に作用せしめた場合の変化

SM \ INH	0 (無効濃度)	10 (無効濃度)	100 (限界濃度)	1,000 (阻止濃度)	10,000 $\gamma/cc$ (阻止濃度)
0 (無効濃度)	---	---	SM 限界	SM 阻止	SM 阻止
1 (限界濃度)	INH 限界	INH 限界	混 合	SM 阻止	SM 阻止
10 (中等阻止濃度)	INH 中等阻止	INH 中等阻止	混 合	SM 阻止	SM 阻止
1,000 $\gamma/cc$ (中等阻止濃度)	INH 中等阻止	INH 中等阻止	混 合	SM 阻止	SM 阻止

- : 変化せず発育を続けた SM 限界: SM 限界濃度作用の場合の変化 SM 阻止: SM 阻止濃度作用の場合の変化 INH 限界: INH 限界濃度作用の場合の変化 INH 中等阻止: INH 中等阻止濃度作用の場合の変化 混合: SM による変化を示す菌体と INH による変化を示す菌体が混在して観察されたもの

結果は表1に示すごとくで、SM の阻止濃度においては同時に INH が加えられていても、初期集落の変化は SM に特徴的な像を示した。SM の限界濃度(100 $\gamma$ )においては、そこに INH が同時に存在するときは、SM に特徴的な変化を示す菌体と INH に特徴的な変化を主として示す菌体とが混在して観察された。また同時に菌体の一部分が膨大した形態も出現した。しかし SM, INH いずれもその限界濃度を単独に作用せしめた場合には再発育が起つたが<sup>1) 2)</sup>、両剤の限界濃度を同時に作用せしめたものにおいては(また限界以上の濃度の組合せにおいてはもちろん)約2週後までには明らかな再発育の徴は認められなかつた。SM の無効な濃度においてはもちろん INH のみによる変化の像を示した。以上のいずれの場合においても集落の中心部にはやはり変化を受けない菌体が見られた。

#### 総括ならびに考案

以上種々なる操作によつて菌を休止あるいは死滅の状態にした場合には、これに SM あるいは INH のいずれを作用せしめても、当然変化を示すべき菌体に特徴的な変化を起さしめないことが明らかとなつた。また菌が休止に至らないまでも、その生活機能を低下せしめるとき条件(たとえば 37 $^{\circ}C$  から室温 20 $^{\circ}C$  に移す等)において薬剤を作用せしめた場合、その変化の推移が遅れるのが観察された。さらに前報<sup>1) 2)</sup>において明らかなごとく、発育の遅い人型菌ではその変化の推移がもつとも遅く、発育の速やかな非病原性菌ではその変化

もまた速やかに起つた。これらの所見はいずれも SM あるいは INH の作用が菌の生活状態と直接に関連して発揮されることを示している。Schaefer<sup>4)</sup>は INH による人型菌の形態的变化が培養基の C 源を除いた場合には起りにくいことを観察しているが、これも上記の所見からみて、ありうることと考えられる。

薬剤の作用を定量的に colony count 等で測定する方法、あるいは菌の代謝の見地からの研究においても、休止菌に対しては薬剤が作用しにくいことはよく知られている<sup>5)~7)</sup>。しかし Barclay ら<sup>8)</sup>の isotope で label した INH を用いた成績は一層興味深い。すなわち生活状態にある感性菌は INH をよく吸着する。しかし熱あるいはホルマリンで殺した死菌では吸着しない。ところが 5 $^{\circ}C$  において作用せしめたりあるいはあらかじめ SM を作用せしめたのち INH を作用させる等休止状態にした菌ではむしろ多量吸着せられることをみた。吸着しにくい場合は一応別として、休止状態(たとえば 5 $^{\circ}C$  において)では吸着は十分起る筈であるのに、上記著者の観察では特徴的な変化が起つていない点が注目される。ここでもやはり INH の特有な作用の發揮にはあらかじめ菌が生活状態になければならないことを一層考えさせた。

以上により発育ないし生活しつつある菌体のみが変化を受けることが明らかとなつたが、SM, INH あるいは両剤を同時ないしは時を異にして作用させたいずれの場合にも発育初期集落中配列の基部(中心部)には変化を受けない菌体が存在することおよび成熟した集落で

はこのような菌体が相当多数認められるということについて考察したい。上述の所見からみれば、これらの菌体は少なくとも生活状態にないことは疑いのないことである。しかしこのような菌体が単に休止状態にあるだけであるのか、あるいはもはや生活力を有しない変性菌体であるのかは本報までの成績からは断定されがたい。(このような菌体から薬剤の影響を取り除いた場合の再発育の有無は次報においてさらに検討されるであろう。)しかしながら植田<sup>9)</sup>は結核菌(ミコバクテリウム)は一般細菌と異なり、そのある発育時期についてみても、菌集団を構成している各菌体は発芽直後の易染性の菌体から、発育段階の進んだ古い抗酸性の菌体まで種々なる段階のものが存在することを示し、さらにこのような発育段階の古い菌体中にはすでに生活力を失い変性した菌体が含まれていることを考えている。上記著者の成績すなわち集落の中心部に位置するこのような抗酸性の菌体が配列の先端部の菌体に比べて薬剤に対する態度が明らかに異なるという観察は植田の考え方を支持するごとくである。

次に SM, INH 両剤の併用によつて菌が示す変化について考察したい。一般に作用機作を異にした薬剤は菌の異なる機構(あるいは代謝)に作用すると考えられ、併用した場合相加ないし相乗的に作用する場合が多いとされるが、反対に拮抗的に働く Penicillin と Chlorphenicol の併用の例も知られている。さて上記で検討した SM, INH の併用について形態学的にみると、(1) SM が有効な濃度においては SM による変化がみられ、同時に INH が存在していても INH の働きは認められなかつた。また時を異にして両剤を作用せしめた場合 INH による変化が明らかに起る以前に SM が加えられると SM による変化の像を示すようになった。逆の SM 作用後 INH 作用の場合にも SM による変化がみられ、INH は影響を示さなかつた。同様な所見は Rist ら<sup>10)</sup>も報告している。次に(2) SM の限界濃度においては同時に限界濃度以上の INH が存在している場合 SM による変化を示す菌体とともに INH の作用による変化を主とした菌体が混在するのが観察された。これは前報<sup>1)</sup>にも述べたごとく SM 限界濃度では菌は少しく発育が許され、これに INH が作用するためであろうと考えられた。また一部には膨大した形態の形成も観察された。しかしながら(3)両剤ともに単独に限界濃度を作用せしめた場合には遅かれ早かれ耐性化による再発育がみられる(これについては後報にも詳述する)が、限界濃度の両剤が併用された場合(限界以上の場合もちろん)は約2週間の観察期間中には明らかな再発育はみられなかつた。すなわちこの耐性化の阻止という点において併用の効果を認めうるごとくであつた。

以上 SM, INH 併用の場合、前報<sup>2)</sup>において SM の作用が INH の作用に比してより直接的に菌の変性をきたさしめると考えたが、このことがさらに一層明らかとなり、併用しても少なくとも形態的には SM の作用のみが優先してみられ、併用の効果は明らかではない。しかし耐性化の阻止が併用によつて認められ、この両剤併用の効果はむしろこの点にあるようであつた。しかしながらこの耐性化の阻止については、両剤の濃度のある一定条件下ではむしろ反対に多数の耐性菌の発生がみられるという Szybalski ら<sup>11)</sup>の興味ある報告もある。このような点についての詳細な検討は後日にゆずる。

## 結 論

1. 結核菌およびその他の Mycobacterium が休止あるいは死滅の状態にあると考えられる条件下においては、SM あるいは INH はその特徴的な変化を菌に起きしめえなかつた。すなわち生活状態にある菌体のみ薬剤は作用し、形態的变化を起さしめた。また同様に菌の生活条件が不利な状態になると菌の薬剤による変化の推移が緩徐となつた。
2. 成熟した集落中配列の基部に位置した多数の抗酸性の菌体は薬剤によつて変化を受けなかつた。これらの菌体は少なくとも生活状態にないことが推断せられた。
3. SM および INH を同時に作用せしめた場合 SM による変化が優先して現われた。

御指導御校閲を賜つた植田三郎教授に満腔の謝意を表するとともに御援助を賜つた国立宇多野療養所日下部周利所長に深甚なる謝意を表する。

## 文 献

- 1) 伊藤：結核，33 (5) : 353, 昭33.
- 2) 伊藤：結核，33 (6) : 408, 昭33.
- 3) 東村・鈴木：結核，30 (6) : 320, 昭30.
- 4) Schaefer, B. : Am. Rev. Tuberc., 69 (1) : 125, 1954.
- 5) 金井：日本細菌学雑誌，9 (3) : 181, 昭29.
- 6) 小島：広島医学，8 (4・5) : 287, 昭30.
- 7) 鈴木・東村：結核，30 (10) : 567, 昭30.
- 8) Barclay, W.R. et al. : Am. Rev. Tuberc., 70 (5) : 784, 1954.
- 9) 植田：結核菌の研究 I, 南江堂, 昭28.
- 10) Rist, N. et Grumbach, F. : Rev. de la Tuberc., 16 (7・8) : 665, 1952.
- 11) Szybalski, W. & Bryson, V. : Am. Rev. Tuberc., 68 (2) : 280, 1953.