

細胞内結核菌発育に及ぼす Cortisone の影響 (続報)

—SM, PAS, INH の細胞内結核菌発育阻止濃度に関する研究—

岩 井 和 郎

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

受付 昭和 35 年 11 月 28 日

緒 言

最近副腎皮質 ホルモンである Cortisone の臨床的応用が盛んとなり、その抗炎症作用を利用して感染症に対する化学療法剤との併用が盛んに行われている。炎症時に Cortisone を使用すると滲出反応の抑制、肉芽形成の阻止傾向がみられ一見病巣形成を抑制するかのごとくにみえるが、その反面生体内での菌増殖が促進され最後には菌血症で死亡することは多くの動物実験の成績が示すところである。しかし同時に抗生物質を使用することによりかかる生体内菌増殖を阻止し、しかも組織反応を最小ならしめときには痕跡を止めぬ程度に吸収治療せしめることが期待しうる。実験結核症におけるかかる試みは Spain¹⁾, Morgan²⁾, Karlson³⁾, Cummings⁴⁾, Bloch⁵⁾ らにより早くから行われ、いずれも組織反応を抑制しようとしているが、組織内菌増殖は化学療法単独よりも多いとする報告もみられている。臨床的にはことに滲出性結核性漿膜炎に対して、解熱、一般状態の改善とともに滲出の抑制、Fibrin の析出の減少などの効果が認められており、後遺症状なく治療せしめるために用うべき薬剤であるとする報告がみられる⁶⁾。

著者は前報⁷⁾において組織培養を用いて Cortisone 処置動物細胞内結核菌発育が、無処置動物細胞内結核菌発育に比して促進されておき、Cortisone 処置動物細胞にはある変調のおこっていることを報告したが、今回は Cortisone 処置動物細胞に喰菌せしめて培養するにあたり、培地内に抗結核剤 SM, PAS, INH をそれぞれ混入してその細胞内結核菌発育阻止力について検討し、Cortisone と化学療法との併用療法に対する一資料とする意味での実験を行った。

実験方法

成熟健康モルモットまたは家兎を用いて、これに Hydrocortisone acetate 10 mg または 20 mg 5~7 日間注射し対照として無処置動物をとつた。これらの動物より前報に詳述せるとき方法にて腹

腔内滲出細胞を採取し、これに H₃₇Rv を喰菌せしめて二重リングによる静置培養法により 7 日間培養を行い、培地内に Dihydro SM 1, 10, 100 γ /cc, または 5, 50 γ /cc, PAS-Na 1, 10, 100 γ /cc, INH 0.001, 0.01, 0.1 γ /cc の割合に加え、48 時間ごとに液を新調して交換した。2, 4, 7 日後に標本を固定して染色し細胞内平均菌数を算定、Cortisone 処置動物細胞と無処置動物細胞との間で各薬剤の細胞内結核菌発育阻止に対する影響を比較検討した。

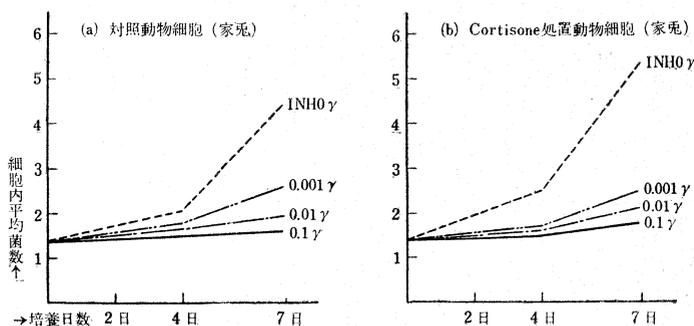
実験成績

〔1〕 INH の細胞内結核菌発育阻止濃度に及ぼす Cortisone 処置の影響

対照動物細胞と Cortisone 処置動物細胞に喰菌せしめて培養し、培地内にそれぞれ INH 0, 0.001, 0.01, 0.1 γ /cc を加えた場合の成績は図 1 に示すごとくである。これによると対照動物細胞内では当日の細胞内平均菌数は 1.3 コで、7 日目に INH 0 γ /cc 4.4 コ、0.001 γ /cc 2.6 コ、0.01 γ /cc 1.8 コ、0.1 γ /cc 1.5 コとなり、0.1 γ /cc でほぼ完全発育阻止をみる。Cortisone 処置動物細胞内では当日 1.4 コ、7 日目 0 γ /cc 5.4 コ、0.001 γ /cc 2.5 コ、0.01 γ /cc 2.1 コ、0.1 γ /cc 1.8 コを示し、培地内 INH 0 γ /cc の場合には対照細胞に比し細胞内菌発育は著明であるが、INH 各濃度含有培地内では両実験群ともほとんど同じ発育状態を示している。

〔2〕 SM の細胞内結核菌発育阻止作用に対する

図 1 細胞内結核菌発育に対する INH の影響

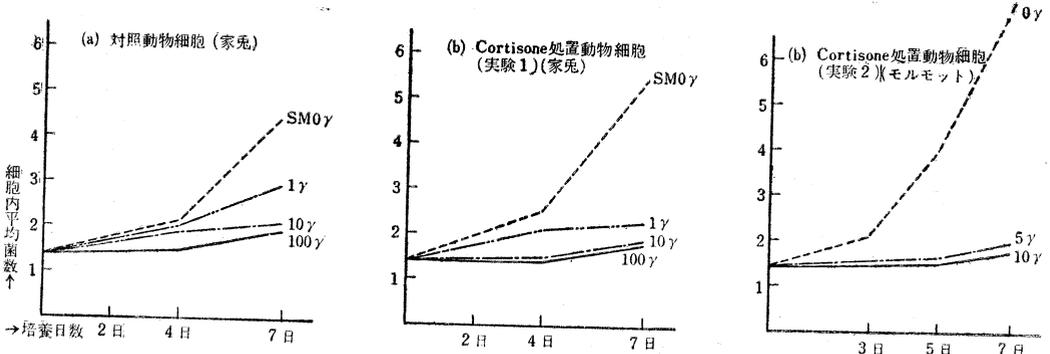


Cortisone 処置の影響

培地内に SM を 0, 1, 10, 100 γ/cc の割合に加えた

場合の両動物細胞内菌発育は図 2 に示すごとくである。すなわち対照動物では当日 1.3 \times , 7 日目 1 γ/cc 2.9

図 2 細胞内結核菌発育に対する SM の影響



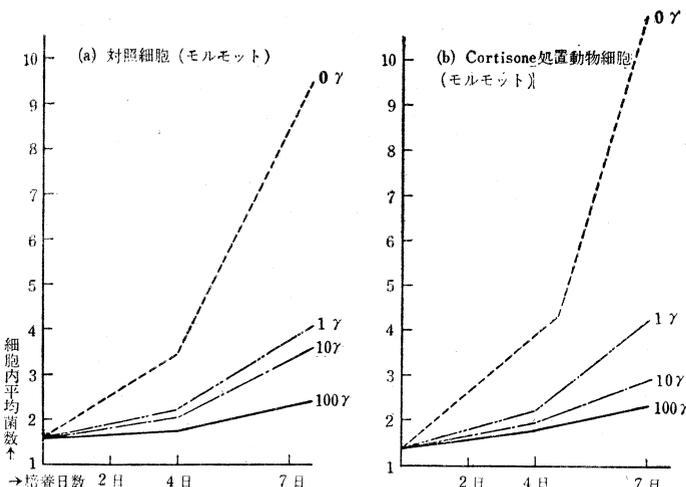
\times , 10 γ/cc 2.1 \times , 100 γ/cc 1.9 \times を示すのに対して Cortisone 処置動物細胞内では SM 1 γ/cc 2.3 \times , 10 γ/cc 1.9 \times , 100 γ/cc 1.7 \times を示し, 10 γ/cc と 100 γ/cc とがほぼ一致した曲線を示し, さらに 1 γ/cc の発育曲線は対照動物の 10 γ/cc のそれに, その数値も曲線の形も一致するのがみられた。

培地内に SM 5 γ/cc , 50 γ/cc を含有させた場合の Cortisone 処置動物細胞内菌発育は, 図 2 に示すごとくいずれも同様な経過をとつてほぼ完全発育阻止がみられ, これから Cortisone 処置動物細胞内結核菌発育に対する SM の阻止濃度は対照動物のそれに比しある程度まで低下しているごとくにみられる。

[3] PAS の細胞内結核菌発育阻止作用に及ぼす Cortisone 処置の影響

培地内に PAS-Na 0, 1, 10, 100 γ/cc を入れて行った実験では, 図 3 に示すごとく両実験群間にほとんど差を認めず, Cortisone 処置により PAS の細胞内結核菌発育阻止濃度が低下することはほとんどみられな

図 3 細胞内結核菌発育に対する PAS の影響



かつた。

総括および考案

細胞内結核菌発育に対する抗結核剤の阻止濃度についての組織培養による実験的研究は, in vitro における抗菌力と in vivo における効果との違いを説明する一つの根拠として多くの研究者たちによりなされている^{8)~14)}。それらによると SM, PAS, Viomycine, Terramycine などは細胞内の抗菌力と細胞外のそれとの間にかなりの開きがあるが, INH, Cycloserine などは細胞内外ともに同程度の抗菌力を示すとされている。Cortisone 投与動物においてはかかる細胞内外の抗菌力の差がいかに変化しているかを知り, Cortisone と化学療法との併用に対する一指標を得ることが今回の実験の目的であつた。

実験の結果はまず INH を培地内に加えた場合は, 対照動物細胞内においても Cortisone 処置動物細胞内においても, 0.1 γ/cc ではほぼ完全発育阻止をみており, すべての濃度において両細胞群間の差は認められなかつた。現在までの報告によれば INH は 0.01~0.1 γ/cc にて完全阻止をみるとされており, この点において著者の成績は一致している。抗結核剤の効果は菌が静止の状態にあるときよりも盛んに発育しているときの方が強いという考え¹⁵⁾があるが, 細胞内菌発育の促進されている Cortisone 処置動物細胞についてとくに INH の低濃度で効くということはこの実験では認められなかつた。

SM についての実験では, Cortisone 処置動物細胞内では 5 γ/cc ではほぼ完全発育阻止をみており, 1 γ/cc における発

育状態は対照動物細胞内における 10 γ /cc のときの発育状態に相当するという成績を得た。現在までの他の研究者たちの成績も、対照動物細胞内結核菌発育は SM の 10~100 γ /cc の間で阻止されるとしていることから、Cortisone 処置動物細胞内菌発育に対する SM の阻止濃度は低下しているごとくと思われる。

PAS については両動物細胞内においてほぼ同様な抗菌力を示し、とくに Cortisone 処置による影響は認められなかつた。

細胞内の結核菌に対する抗結核剤の効果が試験管内のそれと等しいためには、その薬剤が培地内で破壊ないし

不活性化されず、よく細胞内に滲透し、かつ細胞内でその活性を十分に保っていることが必要であろう。INH が細胞内外での効果のほぼ等しいことは、これらの条件をほぼ満足させているためと思われる。

細胞内外の効果の異なる薬剤については一般に細胞内に滲透しにくいと考えられており、ことに分子量の大きさが関係するのではないかとされている。Shepard¹⁵⁾ は細胞内外での効果の差のないものと、あるものに分けると、前者は分子量 100~200 であり後者は 400 以上であるのは興味ある点であるとしている。今ここに最近の研究成績も含めて各種薬剤の細胞内抗菌力と分子

表 1

細胞内外に差あり	薬名	S M	P A S	T M	K M	V M	
	分子量		730.12	211.26	440	600.24	489.51~505.35
細胞内外に差なし	薬名	I N H	I H M S	I P N	INHG (Na)	IHMS (Ca)	サイクロセリン
	分子量	137.14	271.23	301.2	371.29	536.55	102

量との関係を見ると表1のごとくなる。すなわち細胞内で効果の減少する SM, Terramycine, Viomycine, Kanamycine²²⁾ などはいずれも 400 以上の分子量を示すが PAS のみは 211.26 という数字を示す。細胞内外の効果の等しい INH, Cycloserine などはいずれも分子量は 200 以下であるが、IHMS, IPN, INHG-Na, INHG-Ca などは 200 をこえている。PAS については後述するのて除外して、INH の誘導体については最近それが培地内で分解して INH となつて抗結核性を示すという報告¹⁶⁾ がみられ、細胞内にも遊離 INH となつて滲透することが考えられるので、この表から各種薬剤の分子量と細胞内抗菌力との関係を求めることは可能であると思われる。この点につき Eagle¹⁷⁾ は「ある種の哺乳動物細胞において放射性同位元素をもつ SM は細胞内に活性形で入りうる」として SM は細胞内滲透性が悪いという考えに対して否定的な見解をとっているが、放射性 SM が細胞内で細胞外と同じ濃度に存在するか否かについての量的な記載がなく、十分の根拠とはなしがたい。

一般に薬剤が細胞内に滲透するにさいしては濃度勾配の差や分子量の問題のほか、薬剤の細胞膜に対する界面活性的影響、薬剤の細胞膜への融解性、細胞膜荷電の状態、原形質蛋白質との結合の難易などが影響を与えるとされている。したがつて抗結核剤の細胞内滲透性を考えるにあたり、その分子量のみを取上げるのはすべてを尽しているとはいえないが、少なくともその1つの大きな因子であることは前述の表から推察しうる。

細胞内で薬剤がなんらかの機序によつて不活性化されるのではないかという点に関しては、細胞内の pH の

問題があるが、SMは病巣内で一部非働化されるという考え¹⁸⁾ もあり、さらに大沢¹⁹⁾ の行つた実験によれば SM を D・N・A 溶液と混合すると光電比色計にて両者の結合を考えさせる吸収曲線がみられるとしている。また五味²⁰⁾ の研究によると SM, INH は血清 Albumin との結合は起りにくいながら PAS は生体内で血清 Albumin とほぼ 100% 結合した状態となり、PAS の生体内で効果の少ないことを結びつけて考えている。これらの成績から細胞内に滲透した薬剤が蛋白質と結合し、そのために細胞内効果の減退することも考えられ、ことに PAS は分子量の小さいことからその可能性は否定できない。五味の報告はさらに 10% Albumin 加 Dubos 培地と 96.7% 血清含有 Dubos 培地における PAS の抗菌力の比較を行うと、後者は前者の約 1/2 に低下しているのがみられるとしているが、現在までの組織培養によるこの種の研究では培養液は 40~80% の割合に血清を含んでおり、48 時間ごとに液を新調交換したとしても培地内ですでに抗菌力の低下することが考えられ、PAS について細胞内外の抗菌力の差を論ずるには検討の余地が残されている。

Cortisone 処置にさいして、INH, PAS は対照動物細胞内におけるほぼ同様な細胞内抗菌力を示すが、SM のみはより低濃度で効果があるごとくと思われるのは、細胞に何かある変化がおこり、その結果細胞膜の透過性の充進をきたしたのではないかととも思われる。しかし Cortisone 処置動物における細胞の物理化学的变化についてはまだほとんど知られておらず、いかなる機序のもとにかかる現象がおこつたかの説明は今後の研究にまたねばならない。

実験結核症における Cortisone と化学療法ことに S M との併用効果の報告は、その病変形成は S M 単にやや優るか、これに近いといわれているが、組織内菌所見は S M 単に及ばないとするものもみられる。著者の成績の示すごとく細胞内結核菌に対して Cortisone 処置動物では S M がより低濃度で有効であるとするれば、上述の動物実験の成績は一見矛盾するかのごとくにみえるが、動物に対する S M 注射は多くは 1 日 1 回であり、ために血中 S M 濃度はあるときには高濃度に達するがその後長時間にわたり有効濃度以下となるので、たえず一定濃度の S M と接触する組織培養下の細胞とはかなり条件を異にするという点などもあり、同列に論ずる訳にはゆかない。勝²¹⁾も Cortisone と化学療法との併用にあたっては抗生物質の十分な量と期間とが必要であるとしているが、Cortisone と S M との併用療法においてもその血中濃度を一定に保つべく努めれば、その効果を増大せしめることも期待しうるのではないかと考えられる。

結 語

組織培養を用いて Cortisone 処置動物細胞内結核菌発育に及ぼす S M, P A S, I N H のそれぞれの阻止濃度を検討した。その結果 I N H, P A S については対照動物細胞のそれと変りないが、S M については Cortisone 処置動物細胞において細胞内菌発育に対する完全阻止濃度は低下するごとくに思われた。これらの成績よりその要因についての考察を行った。

稿を終るに臨み、御校閲戴いた隈部所長、岩崎病理部長、ならびに御指導、御鞭撻戴いた吉武博士に謝意を表す。

引 用 文 献

1) D.M. Spain : Am. Rev. Tuberc., 62 : 337, 1950.

- 2) T.E. Morgan, S.H. Wanzer : J. Bact., 67 : 257, 1954.
- 3) A.G. Karlson et al. : Dis. of Chest, 20 : 469, 1951.
- 4) M.M. Cummings, P.Roch et al. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 596, 603, 1952.
- 5) R.G. Bloch et al. : J. Lab. Clin. Med., 38 : 133, 1951.
- 6) R.L. Yeager et al. : Am. Rev. Tuberc., 76 : 708, 1957.
- 7) 岩井和郎 : 結核, 34 : 29, 昭34.
- 8) R.L. Magoffein, W.W. Spink : J. Lab. Clin. Med., 37 : 924, 1951.
- 9) E. Suter : Am. Rev. Tuberc., 65 : 775, 1952.
- 10) G.B. Mackerness : Am. Rev. Tuberc., 66 : 125, 1952.
- 11) 吉武洋海 : 結核, 31 : 228, 昭31.
- 12) 川守田淳 : 抗菌研雑誌, 11 : 76, 昭30.
- 13) C.C. Shepard : J. Bact., 73 : 496, 1957.
- 14) 小野みどり : 呼吸器診療, 13 : 691, 昭33.
- 15) G. Middlebrook, D. Yeagian : Am. Rev. Tuberc., 54 : 553, 1946.
- 16) 江見勇 : 京大研紀要, 7 : 101, 昭33.
- 17) H. Eagle, A.S. Saz : Ann. Rev. Microbiol., 9 : 173, 1955.
- 18) Pierre-Bourgeois et al. : Sem. Hôp., 33 : 1541, 1957.
- 19) 大沢義信 : 未発表.
- 20) 五味二郎 : 最新医学, 12 : 141, 昭32.
- 21) 勝正孝 : 第6回日本化学療法学会.
- 22) 初鹿野浩 : 未発表.

訂 正

本論文前報 (34 巻1号 29 ~ 34 頁) 中に誤りがありましたので訂正します。

31頁右段上6行目

……………Ⅱ群では4日4.4, 7日7.2……………→……………Ⅱ群では4日4.4, 7日9.2……………