

Streptomycin 依存性結核菌を用いた増殖休止菌 に対する抗結核剤の効果に関する研究

第1編 試験管内実験

太 田 令 子

京都大学結核胸部疾患研究所内科学第1

受付 昭和 46 年 4 月 1 日

STUDIES ON THE EFFECT OF ANTITUBERCULOSIS AGENTS AGAINST TUBERCLE BACILLI IN THE RESTING STATE, USING STREPTOMYCIN-DEPENDENT STRAIN (18-b)*

I. Studies *In Vitro*

Yoshiko OHTA

(Received for publication April 1, 1971)

As one of the big problems of antituberculous chemotherapy for the chronic pulmonary tuberculosis, "microbial persistence", a capacity of the drug-susceptible microorganisms which are able to survive against the activity of the drug *in vivo*, has been pointed out. This phenomenon indicates a limitation in tuberculosis chemotherapy other than the drug resistance. In this report, an intensified antituberculous regimen were applied *in vitro* upon the resting cells of streptomycin-dependent (18-b) strain, isolated from the human origin, under streptomycin-starved condition. By using silicone-coated slide culture method, kanamycin, isoniazid and ethambutol were used singly or in combination upon the resting cells. It was obtained that the drugs were slightly effective against the resting cells, but the effect was less than that against the growing cells.

This experiment suggests that tubercle bacilli in the resting state cannot survive half a year. If it is true, tubercle bacilli brought in to the resting stage might die in a relatively short period.

第1章 緒 言

長期の化学療法にもかかわらず、体内の結核菌を絶滅することがきわめて困難であることは、周知の事実である。その原因の一つとして、最近とくに microbial persistence¹⁾ すなわち、結核菌が薬剤に感受性でありながら、長期にわたる化学療法にもかかわらず、生体内で生き残るという現象が注目されてきた。この現象に関連

して、McDermott¹⁾、McCune²⁾、金井ら³⁾から興味ある動物実験の成績が報告されている。つまり、生体内で生きてはいるが、ほとんど増殖を休止している結核菌に対しては、化学療法剤が作用しがたいということである。

しかし、はたして増殖休止状態の結核菌には化学療法を強化しても全く意味がないのであろうか。この点を明らかにするために、予研より分与された streptomycin (SM) 依存性人型結核菌 18 b 株⁴⁾を用いて *in vitro* お

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

よび *in vivo* における一連の実験を試みた。

人型結核菌の SM 依存性株は、1948 年 SM 治療によりかえつて病状が悪化した結核患者の痰から Spendlove³¹⁾ がはじめて分離した。その後も人型結核菌の SM 依存性株についての報告は少なくないが^{32)~37)40)}、分離方法が種々であるために分離菌の SM 要求量も、依存性の安定度も区々であつた。

1955 年橋本⁴⁾は強毒人型菌 H₃₇株から、きわめて安定な SM 依存性菌を分離した。この菌の SM 要求量は 50 mcg/ml 以上であり、長期の培地継代によつてもきわめて安定であり、この株を 18 b 株と名付けている。

18 b 株は SM 投与を中止することにより簡単に増殖休止状態となり、動物体内でも、培地上でも増殖休止のまま生存を続け、再び SM を投与することにより増殖を開始することが金井⁴⁰⁾により報告された。これらの性質が、増殖休止菌に対する強力な化学療法の効果を検討する実験に好都合であるため、本実験に 18 b 株を用いることにした。

第2章 18 b 株と H₃₇Rv 株との薬剤感受性の比較

第1節 実験材料

使用培地：10% 牛血清加 Kirchner 培地（以下培地という）、硫酸 streptomycin 100 mcg/ml 添加 10% 牛血清加 Kirchner 培地（以下 SM 100 mcg/ml 添加培地という）を用いた。

菌株：研究室保存の人型結核菌 H₃₇Rv 株および、予研より分与された SM 依存人型結核菌 18 b 株⁴⁾を用いた。

Silicone-Coated Slide（以下 SS という）：東⁶⁾の方法に従つて作製した。

試験管：内径約 10 mm、長さ 120 mm のガラスキャップ付小試験管を使用した。

被検薬剤：SM, INH, sodium para-amino-salicylate (PAS), TH, cycloserine (CS), EB, KM, viomycin (VM), pyrazinamide (PZA), sulfisoxazole (SI), tetracycline (T.C.), sodium o-aminophenolmethanesulfonate (SOM), disoxyl (DAT), tibione (Tb1) および ethionamide (TH) の sodium methanesulfonate (THS) を用いた。

第2節 実験方法

18 b 株については SM 100 mcg/ml 添加 1% 小川培地上で 3 週間培養し、斜面上に発育した集落から約 1.0 mg/ml 石油ベンジン菌液を作製した。対照として検討した H₃₇Rv 株については、1% 小川培地上で 3 週間培養した集落から約 1.0 mg/ml の石油ベンジン菌液を作製した。

薬剤含有培地は、常用の試験管倍数希釈法（培地 2 ml）を用いた。第 1 管の薬剤濃度はおのおの SM 10

mcg/ml, INH 1.0 mcg/ml, PAS 5.0 mcg/ml, CS 100 mcg/ml, EB 100 mcg/ml, KM 10 mcg/ml, Tb1 10 mcg/ml, VM 10 mcg/ml, DAT 100 mcg/ml, PZA 1,000 mcg/ml, SOM 100 mcg/ml, T.C. 10 mcg/ml, SI 500 mcg/ml としたが THS は TH に換算して 5.0 mcg/ml とした。

実験手技は、SS の先端から約 20 mm を石油ベンジン菌液中に瞬時浸漬して菌を付着させ薬剤倍数希釈列の試験管に投入し、37°C で 2 週間または 4 週間薬剤を作用させた。薬剤作用後 18 b 株菌は SM 100 mcg/ml 添加培地中で、また H₃₇Rv 株菌は SM を含まない培地中で 4 週間培養後、殺菌効果を判定した。

第3節 実験成績

判定方法は、発育阻止力は 2 週間または 4 週間薬剤作用終了時に、殺菌力は薬剤作用終了後 4 週間薬剤非含有培地で培養後に、それぞれ肉眼的に判定した。判定基準は菌集落が SS 表面の 2/3 以上を覆うとき（卅）、2/3~1/3 のとき（十）、1/3 以下のとき（+）とした。なお集落数 100 以下の場合はその数を数えた。（+）以下の場合には発育阻止効果または殺菌効果ありと認め、その中の最低濃度を発育阻止最低濃度および殺菌最低濃度として表 1 に示した。

18 b 株は発育増殖に SM を必要とすることを除けば諸種抗結核剤に対して H₃₇Rv 株とほとんど同じ感受性をもっていた。

第3章 SM 飢餓状態にある 18 b 株の残余発育

第1節 実験材料

Table 1. Drug-sensitivity of 18 b-Strain and H₃₇Rv

Strain Drug	MIC (mcg/ml)				MSC (mcg/ml)	
	2 weeks		4 weeks			
	H ₃₇ Rv	18 b	H ₃₇ Rv	18 b	H ₃₇ Rv	18 b
SM	1.25	>100.0	2.5	>100.0	5.0	>100.0
PAS	0.625	0.313	0.625	6.625	>5.0	>5.0
INH	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	1.0	1.0
KM	0.625	0.313	1.25	0.625	2.5	2.5
CS	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
TH*	0.313	0.625	0.625	0.625	2.5	2.5
VM	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0
EB	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25
Tb1	≥2.5	≥2.5	≥5.0	≥5.0	≥5.0	≥5.0
DTA	≥25.0	≥25.0	≥25.0	≥25.0	≥25.0	≥50.0
PZA	125.0	250.0	250.0	500.0	500.0	500.0
SI	31.3	31.3	31.3	31.3	>500.0	>500.0
T.C.	0.313	0.313	0.313	0.313	1.25	1.25
SOM	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	6.25

* TH-S: Methane-sulfonate of ethionamide, MW: TH: TH-S=1:1.6

菌株: 18b 株を SM 100 mcg/ml 添加 Sauton 合成培地上で約3週間培養した菌膜およびこの菌膜を SM を含まない Sauton 合成培地に移して 18 日間 SM 飢餓状態で培養した菌膜を用いた。

培地, SS および試験管: 第2章と同じものを用いた。

第2節 実験方法

実験1では SM 100 mcg/ml 添加 Sauton 合成培地上に発育した 18b 株の菌膜から、約 0.1 mcg/ml の石油ベンジン菌液を作製し、SS を瞬時浸漬して菌を付着させ、37°C で SM 飢餓状態で培養した。

培養日数は2日、3日、10日、15日、16日、17日、18日とし、培養終了後ただちに水洗し、10% フォルマリン液に投入して滅菌固定し、次いで Ziehl-Neelsen 氏法で染色、鏡検した。

実験2では SM を含まない Sauton 合成培地上で 18 日間培養して増殖休止状態にあると思われる 18b 株菌膜から、約 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液を作製し、SS に菌を付着させ、37°C で培養した。

培養日数は5日、10日、20日とし、培養終了後ただちに水洗し、10% フォルマリン液に投入して滅菌固定し、次いで Ziehl-Neelsen 氏法で染色、鏡検した。

第3節 実験成績

成績は対照1では SM 100 mcg/ml 含有 Sauton 合成培地上で約3週間表面培養した 18b 株を SS に付着させて、SM を含まない培地内で培養したところ、約 11~15 日間は増殖が続くが、その後は増殖が停止することが分かった。

実験2では SM 非含有 Sauton 合成培地上で、SM 飢餓状態のまま 18 日間培養した 18b 株を SS に付着させて SM を含まない培地で培養したところ、5日、10日、20日間それぞれ培養した SS 上の菌は、培養しなかつた菌に比較して全く増殖が認められなかつた。

第4章 増殖休止状態にある 18b 株の生菌数の消長

第1節 実験材料

菌株: SM 100 mcg/ml 含有 Sauton 培地上で 18 日間表面培養した 18b 株の菌膜を SM を含まない Sauton 培地上に移殖し、18 日間培養して増殖休止状態になったものを用いた。

培地, SS および小試験管: 第2章と同じものを用いた。

第2節 実験方法

増殖休止状態の 18b 株菌膜から、約 0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液を作製し、SS に付着させ、培地 2 ml を注入した試験管に投入し、37°C で培養した。

培養日数は1~75日間とし、その間の適当な日に4枚ずつ取り出し、第1群はただちに水洗して 10% フォルマリンに投入滅菌し、Ziehl-Neelsen 氏法により染色し、

強拡大で鏡検した。第2群は SS を SM 100 mcg/ml 添加培地に移し、1週間 37°C で培養し、その後 Ziehl-Neelsen 氏法により染色し、弱拡大で鏡検した。また第3群は SS を SM 100 mcg/ml 添加培地に移してから2週間培養して2群と同様に処理した。第4群は SS を SM 100 mcg/ml 添加培地に移してから4週間 37°C で培養した後、肉眼的に判定した。

第3節 実験成績

第1群は7×90倍で鏡検し、各 SS につき5視野中の付着菌単位数を求めて平均値を出した。

第2群および第3群は、各 SS につき5視野を、7×10倍で鏡検し、平均値を求めた。また第4群は SS 上の23以上を菌集落が覆っているときは(++)、2/3~1/3のとき(+)、1/3以下のとき(+), 集落数 100 コ以下の場合にはその数を求めた。これらを表示したのが表2である。

Table 2. Number of Colonies of 18b under SM-starved Condition

No.	Days*	G 1	G 2	G 3	G 4
1	0	25	63	36	—
2	1	21	58	33	—
3	3	19	48	39	—
4	5	25	54	37	—
5	7	21	49	43	—
6	10		11	22	—
7	13		10	23	—
8	14		6	14	—
9	15	24	5	11	—
10	20		3	9	—
11	30		0~1	1	—
12	48	18	0	0	50
13	60		0	0	8
14	75		0	0	0

* Period of inoculation.

この成績のうち、第1群では、菌液に浸漬後ただちに染色鏡検した SS と比較して付着菌数にはほとんど変化がみられなかつた。このことから SS に付着した菌は、少なくとも 48 日間は脱落することはないことが分かった。

次に第2群および第3群の中で、SM を含まない培地中に1日~7日間置いた SS では SM 添加培地に移して培養することにより発育する集落数に著明な変化はみられなかつた。しかし 10 日~14 日間 SM を含まない培地内に置いた SS では発育する集落数は 23~13 に減少していた。30 日間 SM を含まない培地内に置いた SS では発育集落数は 130~1100 と減少していた。30 日間 SM を含まない培地に置いてから SM 添加培地に移して4週間培養した SS では、肉眼判定により 70 コの集

落を認め、60日間置いたものでは8コの集落を認め、75日間置いたSSでは全く集落発育を認めなかつた。

これらの成績を総合すると、18b株をSMを含まない培地内で培養すると、その期間が長いほど、増殖能力が低下すると思われる。

本実験では増殖休止状態にするために、18b株を18日間SM飢餓状態に置いてあるので、このことを考慮に入れると、*in vitro*においてSMを含まない培地内で約1カ月間、増殖休止状態になつてからは、約2週間は生菌数はあまり減少しないが、それ以上SM飢餓状態が続けば増殖する能力はかなり急速に失われるものと思われる。したがつて18b株に対する抗結核剤の効果を検討する場合には増殖休止状態にしてからは2週間以内にとどめるべきで、それ以上にわたる場合には生菌数の自然減少を十分顧慮する必要がある。

第5章 増殖休止菌に対する抗結核剤の殺菌効果

第1節 実験材料

使用培地、菌株、SSおよび試験管は第4章に記載したものと同様のものを用い、薬剤はINH, KM, EB, THSを用いた。

第2節 実験方法

実験1: SM 100 mcg/ml 添加 Sauton 合成培地上で約3週間表面培養した18b株菌膜をSMを含まないSauton 合成培地上に移し、10日間SM飢餓状態で培養した菌膜から、約1.0 mg/mlの石油ベンジン菌液を作製した。別にSM 100 mcg/ml 添加 Sauton 合成培地上で約3週間培養した菌膜から約1.0 mg/mlの石油ベンジン菌液を作製した。これら2種類の菌液をおのおのSSに付着させて薬剤倍数希釈列に投入した。

薬剤倍数希釈列は、増殖状態の18b株にはSM 100 mcg/ml 添加培地を、増殖のほとんど休止した18b株にはSMを含まない培地を用いた。

1) INH 単独、2) INH-KM、3) INH-KM-TH および 4) INH-KM-TH-EB について比較した。

薬剤作用期間は4週間とした。

実験2: SM 100 mcg/ml 添加 Sauton 培地上で約3週間表面培養した18b株をSMを含まないSauton 培地に移してから、18日間SM飢餓状態で培養し、完全に増殖休止状態になつた菌膜より約1.0 mg/mlの石油ベンジン菌液を作製しSSに菌を付着させて薬剤を作用させた。また増殖中の18b株からも1.0 mg/mlの石油ベンジン菌液を作製し、SSに付着させて薬剤を作用させた。実験2においてはINH単独とINH-KM-TH-EB併用を薬剤作用期間を変えて(2週間と4週間)比較検討した。

第3節 実験成績

判定方法は2週間あるいは4週間薬剤を作用させた

Table 3. Minimum Sterilizing Concentration in Each Regimen (18b)

	Drug	Period	(mcg/ml)	
			2 W	4 W
Growing cells	INH			1.562
	INH-KM			0.391
	INH-KM-TH			0.391
	INH-KM-TH-EB			0.195
Incompletely resting cells	INH			6.25(12.5)
	INH-KM			0.78(3.13)
	INH-KM-TH			0.39(1.56)
	INH-KM-TH-EB			0.39(1.56)
Growing cells	INH		3.906	1.95
	INH-KM-TH-EB		0.976	0.24
Resting cells	INH		31.25	7.81(31.3)
	INH-KM-TH-EB		7.81	3.90(7.81)

後、薬剤を含まない、SM 100 mcg/ml 添加 Kirchner 培地で4週間培養し、肉眼的にSS上に増殖した菌集落数を判定した。判定成績を総括して殺菌最低濃度を表3に示した。増殖休止状態の18b株に対しても、INHの濃度が高ければ殺菌効果が認められた。またINHにKM, TH, EBを併用すると、わずかながら併用効果も認められた。

殺菌最低濃度(MSC)の基準としては、対照が(+)の場合は菌集落数100以下を殺菌効果ありとするのが適当と思われる。この基準では、増殖休止状態の18b株のMSCはINH単独では31.3 mcg/ml、4剤併用ではINH 7.81 mcg/mlであつた。

第6章 増殖休止菌の耐性獲得について

第1節 実験材料ならびに実験方法

使用培地、SS、試験管、使用薬剤は第5章と同様である。

菌株は、第5章の殺菌効果判定のさいに増殖の認められた菌集落について、使用薬剤に対する耐性検査を行なつた。

すなわち菌集落の発育したSSより石油ベンジン菌液を作製し、その約0.1 mlをSM 100 mcg/ml 含有1%小川培地に流して37°Cで約4週間培養し、発育した全集落について耐性検査した。

耐性検査は松島⁴⁾の方法に準じた。

耐性培地は、SM 100 mcg/ml 添加培地に、次の濃度に薬剤を加えたものである。すなわちINHは5.0 mcg/ml、1.0 mcg/ml、0.1 mcg/ml、KMは100 mcg/ml、10 mcg/ml、5 mcg/ml、THは10 mcg/ml、5 mcg/ml、2.5 mcg/ml、EBは25 mcg/ml、10 mcg/ml、5 mcg/mlとした。

判定は2週間培養後に行なつた。

INH 0.1 mcg/ml で (+) 以下に増殖したもの、および EB 5 mcg/ml で (+) 以下のものは、いずれも耐性なしと判定し、その他は菌集落数 20 コ以上で耐性ありとした。

第2節 実験成績

ほとんど増殖を休止しているが、わずかに増殖していると思われる 18 b 株、あるいは増殖休止状態の 18 b 株では、INH 単独作用、4 剤併用群とも 2 週間作用群でも 4 週間作用群でも全く耐性上昇は認められなかつた。

増殖中の 18 b 株においては、2 週間薬剤を作用させたものはいずれも耐性上昇を認めなかつたが、4 週間作用させたものでは INH 単独作用群で INH 5.0 mcg/ml に不完全耐性獲得がみられ、4 剤併用群では INH 5.0 mcg/ml および EB 5 mcg/ml に不完全耐性を示したが、他の薬剤では耐性を認めなかつた。

第7章 考 案

第1節 実験方法に関する考察

本実験には Silicone-Coated Slide 培養法⁵⁾を用いたが、それは結核菌の微小集落や、殺菌力の定量的判定にきわめて都合がよいからである。SS への菌付着に関しては、すでに内藤⁶⁾の研究があり、付着菌数は浸漬する菌液濃度および浸漬回数により左右されるが、同一濃度の菌液で浸漬回数が等しければ、ほぼ同数の菌が付着することが知られている。

また SS に付着した菌は、洗浄、培地の置換等によつて容易に脱落しないことは池田⁷⁾によつて確かめられている。

次に、18 b 株を結核菌として抗結核剤の殺菌効果判定実験に用いることの適否を省察する必要があるが 18 b 株の薬剤感受性を 15 種の抗結核剤に関して H₃₇Rv 株と比較した結果、SM 依存性である点を除いては、諸種抗結核剤に対して H₃₇Rv 株とほとんど同じ感受性を持ち、抗結核剤の抗菌作用に関する実験に用いることができることが確かめられた。

次に SM 供給を中止して増殖休止状態にあると考えられた 18 b 株が、はたして実際に分裂増殖を停止しているかどうかを検討する必要がある。この点に関しては、金井⁸⁾の約 2 週間という報告がある。著者も本論文において、SS 培養法により検討した結果、11 日から 15 日で増殖休止状態になることが分かつた。

一方、実際に実験で用いた増殖休止菌は、SS 培養法によらずに SM 100 mcg/ml 添加 Sauton 合成培地上で表面培養した菌膜を、SM を含まない Sauton 合成培地表面に移植したものであるから、この移植のさいに菌膜の下面に培地がついたまま移せば、その培地内に含まれた SM によつて 18 b 株の残余発育の期間が長くなるこ

とも考えられる。そこで著者は 18 b 株菌膜を SM 含有培地から SM を含まない培地に移す場合、滅菌濾紙で菌膜に付着した SM を含む培地を可及的に除去する操作を行なつた。さらに SS を用いた残余発育期間は第 3 章で述べたように 11 日～15 日間であるが、抗結核剤の作用に関する実験に用いるための増殖休止菌としては、SM を含まない培地での培養期間を 18 日に延長し、確実に増殖休止の状態となるように注意した。このような菌から作製した菌液により菌を付着させた SS を SM を含まない培地で 2 週間培養し鏡検したところ、菌の増殖は全く認められなかつた。このことから SM を含まない培地で 18 日間培養すると、確実に増殖休止状態の菌が得られるものと考えられる。

第2節 実験成績に及ぼす生菌量の自然減少の影響

SM 飢餓状態で培養すると、18 b 株は 11～15 日間残余発育した後増殖休止状態となる。さらに SM を含まない培地で培養を続けると、一部の菌は再び SM を供給しても増殖しない状態になる。このような菌の割合は、SM 飢餓状態での培養期間が長いほど大きくなり、75 日間 SM 飢餓状態で培養するとほとんど全部の菌が増殖能力を失う。すなわち再び SM を供給しても増殖しない菌となる。この状態は抗結核剤による殺菌とは区別する必要がある。

増殖休止菌の殺菌効果についての実験を考えてみると、増殖休止状態の 18 b 株から作製した SS を、さらに 4 週間 SM を含まない培地内で抗結核剤を作用させる場合には、その菌は最初から数えると 6 週間以上 SM 飢餓状態におかれたことになり、その結果抗結核剤の効果以外にも、生菌量の減少が影響すると思われる。したがつて SM 非含有培地中での薬剤作用期間はできる限り短期間であることが望ましい。この点から、本実験では薬剤作用期間を 2 週間または 4 週間とした。

増殖休止菌に対する薬剤の殺菌効果と、増殖中の菌に対する殺菌効果とを同時に比較することができるかどうかという問題が起こってくる。2 週間薬剤作用させた菌では、SM を含まない Sauton 合成培地上で 18 日間培養したのと加えると 32 日間 SM 飢餓状態におかれたことになり、生菌数はその間自然減少のみによつても 1.3～1.10 に減少すると思われる。また 4 週間薬剤を作用させた群ではさらに生菌数は減少する。それゆゑ増殖休止菌の殺菌効果と増殖中の菌の殺菌効果を厳密に比較することはできない。しかしながら生菌数の自然減少は、増殖休止菌に対して見かけ上の殺菌効果として示されるので、本実験の結果からは、増殖休止菌では増殖中の菌よりも殺菌効果が劣ると言えよう。

増殖休止菌に対する INH 単独 2 週間作用群の最低殺菌濃度 MSC は、(一) 以下を殺菌効果ありとすれば 31.25 mcg/ml、菌集落 100 コ以下とすれば 62.5 mcg/

ml, 菌集落 10 コ以下とすれば 125 mcg/ml となる。また INH 単独 4 週間作用群では (+) まで殺菌効果ありとすれば MSC は 7.81 mcg/ml, 100 コ以下とすれば 31.25 mcg/ml, 10 コ以下とすれば 62.5 mcg/ml である。4 剤併用群については, 2 週間作用群では (+) 以下を殺菌効果ありとすれば MSC は INH について 7.8 mcg/ml, 菌集落 100 コ以下とすれば 31.25 mcg/ml, 10 コ以下とすれば 62.5 mcg/ml である。4 週間作用群では (+) 以下を殺菌効果ありとすれば MSC は INH について 3.9 mcg/ml, 菌集落 100 コ以下とすれば 7.8 mcg/ml, 10 コ以下とすれば 31.25 mcg/ml となる。

以上の結果から, いずれにしても臨床的に内服によつては得にくいような高濃度ではあるが, 増殖休止菌といえども薬剤の作用を全く受けないとは言えないと思われる。

耐性上昇については, 増殖休止状態で薬剤作用を受けた菌については, 全く耐性上昇を認めなかつた。一方増殖中の菌では耐性上昇したものもあつた。

今井³⁰⁾, 池田³⁰⁾らは結核菌の INH 耐性獲得の問題を薬剤作用環境と薬剤濃度の点から追求し, 耐性獲得は菌増殖に好都合な環境ほど早くかつ高度であると報告しているが, 本実験の成績でもこの示唆が明らかにされたわけである。

第3節 諸家の報告との比較考察

増殖休止中の結核菌に対する抗結核剤の作用に関する報告は, 動物実験が主で, 試験管内実験はほとんど行なわれていない。わずかに金井⁸⁾の, Sauton 培地上で SM 100 mcg/ml の存在下に増殖している 18 b 株と, 増殖休止中のものに対して, INH 10 mcg/ml あるいは KM 100 mcg/ml を添加して殺菌効果をみて, 増殖中の菌は接触後 3 日で生菌量が 1/10 程度に減少したが, 増殖休止菌では全く影響を受けなかつたという報告がある。

本論文でも, 増殖中の 18 b 株菌では INH 10 mcg/ml 2 週間作用, 4 週間作用とも殺菌効果が認められた。KM 100 mcg/ml では 2 週間作用実験は行なわなかつたが, 4 週間作用では殺菌効果が認められた。しかし, 増殖休止菌では INH 10 mcg/ml 2 週間作用では, 対照 (卅) に対して (卅) と, かなり菌量減少がみられ, 4 週間作用でも対照 (卅) に対して (+) と菌量減少がみられる。この成績は金井⁸⁾の実験成績と相反するかにみえるが, 抗結核剤の殺菌効果は薬剤の作用期間³⁰⁾³¹⁾, 使用培地²⁹⁾³²⁾, 接種菌量³²⁾等によつてかなりの相違がみられる。金井の実験の薬剤作用期間は 3 日間であり, 本実験の 2 週間に比較して非常に短い。岩井³³⁾によると, SS 培養法における INH の H₃₇Rv 株に対する MSC は, 1 週間作用では 1,000 mcg/ml, 2 週間では 0.125 mcg/ml となつている。それゆゑ増殖休止菌については本論文の実験成績と金井の成績とを比較することはできない。

池田³⁰⁾によると, H₃₇Rv 株を 4°C および 25°C で培養するとほとんど増殖がみられない。その状態で INH 4 週間作用の MSC は 4°C では 500 mcg/ml, 25°C では 62.5 mcg/ml であつた。対照の 37°C での MSC は 0.0625 mcg/ml であつた。この実験は本論文の実験条件, 判定基準とだいたい同じであるので比較可能と思われる。池田の実験では増殖中の菌に比して, 増殖休止菌では MSC は著しく低下している。これに比較すると, 本論文では, 増殖休止菌の MSC は増殖中の菌の MSC の約 1/4~1/32 と差は比較的少ない。この相違は, 低温による増殖休止状態は, SM 飢餓にしたために増殖を休止した 18 b 株の状態とは別の, より代謝の低い状態であるためではないかと思われる。

第4節 本実験成績と臨床との関連性

増殖休止状態の結核菌に対する抗結核剤の殺菌効果は, 本実験の結果のみから考えると, *in vitro* という環境では作用濃度が十分高ければ認められるといえよう。また多剤併用効果も認められる。しかし増殖中の結核菌に対する薬剤の 4~32 倍の量を要すると考えられるので, 現在用いられている抗結核剤の投与量, 投与方法では生体内でこのような高濃度を期待することは困難である。しかし, *in vitro* という環境ではあつても, 増殖休止状態の結核菌に対しても化学療法を十分強化すれば, 殺菌効果が望みえないものでもないということは, microbial persistence¹⁾ に対処する手段の新しい可能性を示すように思われる。

結核菌は *in vitro* と *in vivo* では性状も異なることが知られており^{34)~36)}, また *in vivo* では生体免疫の存在その他 *in vitro* とは別の条件が加わるので, はたして *in vivo* でも増殖休止菌に対する抗結核の殺菌効果が得られるか否かが次の課題であろう。

耐性獲得については, 増殖休止中に作用させた薬剤については, 2 週間作用, 4 週間作用群とも耐性上昇を全く認めなかつた。このことから, *in vivo* でも増殖休止菌では耐性上昇は起こらないと想像される。また発育阻止状態すなわち増殖休止状態が長期間続くと, 18 b 株は再び増殖可能な環境に移されても増殖しなくなるが, これが菌の自然死³⁷⁾によるものか, どうかは明らかでない。

以上のことを臨床にあてはめて考えると, 生体内では生菌免疫力, 酸素欠乏, 薬剤作用その他種々の原因によつて殺菌されることなく生残り耐性獲得することなく増殖休止状態となつた菌は, 殺菌効果を得られなくても, 発育阻止効果の得られる薬剤投与を長期間継続することにより, 増殖休止状態のまま自然死することも考えられる。

第8章 結 語

Silicone-Coated Slide 培養法⁵⁾を用いて, 増殖休止状

態の SM 依存性人型結核菌 18b 株に対する抗結核剤の殺菌効果を検討した。使用薬剤は INH, KM, TH および EB で、種々の濃度における INH 単独作用および 4 剤併用時について検討した。

1. 分裂増殖中の 18b 株は、SM 依存性である点を除いては諸種抗結核剤に対して H₃₇Rv 株とはほとんど同じ感受性を示した。

2. 増殖休止状態の 18b 株は、増殖中の 18b 株よりも INH に対する感受性はかなり低く、MSC は 4~32 倍であつた。

3. 増殖休止状態の 18b 株の INH 単独作用群と INH, KM, TH および EB 併用群とを比較すると、わずかながら併用効果が認められた。

4. INH 単独作用時でも 4 剤併用時でも、増殖休止状態の 18b 株の薬剤耐性上昇は全く認められなかつた。

5. 以上の結果から、増殖休止状態の結核菌に対しても、強力な抗結核剤を用いれば殺菌効果が得られる可能性もあるものと考えられる。

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 39.
- 4) 橋本達一郎: 結核, 30 : 4, 237, 461, 707, 昭 30.
- 5) 東向一郎: 京大結研紀要, 7 (増刊第 1 号): 461, 昭 34.
- 6) 内藤益一他: 京大結研紀要, 12 : 112, 昭 39.
- 7) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12 : 21, 昭 38.
- 8) 金井興美: 医学と生物学, 65—4, 70, 昭 37.
- 9) Hobby, G. L. et al.: Amer. Rev. Tuberc., 76 : 1031, 1957.
- 10) Mitchison, D. A. et al.: Amer. Rev. Tuberc., 74 : 109, 1956.
- 11) 森下昭三: 胸部疾患, 4 : 585, 昭 35.
- 12) 稲津舜介: 鹿児島大学医学雑誌, 11 : 2732, 昭 35.
- 13) 稲津舜介: 鹿児島大学医学雑誌, 12 : 161, 昭 35.
- 14) Forbes, M. et al.: J. Bact., 84 : 1099, 1962.
- 15) 鈴木録三郎: 結核, 30 : 567, 昭 30.
- 16) Horai, Z. et al.: Med. J. Osaka Univ., 7 : 795, 1957.
- 17) Kanai, K.: Jap. J. Med. Sci. Biol. 8 : 63, 1955.
- 18) Ueno, T.: Rep. Med. Res. Probl. Jap. Anti-Tbc. Ass., 3 : 311, 昭 30.
- 19) Wagner, W. H.: Beitr. Klin. Tub., 110 : 236, 1953.
- 20) 池田宣昭: 未発表.
- 21) Spendlonge, G. A., Cummings, M. M., Fackler, W. B. & Michael, M. Jr.: Pub. Health Rep., 63 : 1177, 1948.
- 22) Yegian, D., Budd, V. & Vanderlinde, R. J.: J. Bact., 58 : 257, 1949.
- 23) Tison, F.: Ann. Inst. Pasteur, 77 : 767, 1949.
- 24) Lenert, T. F. & Hobby, G. L.: Amer. Rev. Tuberc., 59 : 219, 1949.
- 25) Owen, C. R., Adcock, J., Stow, R. M., Standt, L. W. & Davey, W. N.: Amer. Rev. Tuberc., 61 : 705, 1950.
- 26) Vanderlinde, J. & Yegian, D.: Amer. Rev. Tuberc., 63 : 96, 1951.
- 27) Doane, E. A. & Bogen, E.: Amer. Rev. Tuberc., 64 : 191, 1951.
- 28) 金井興美: 医学と生物学, 64—5 : 147, 昭 32.
- 29) 田中健一: 京大結研紀要, 13 : 45, 昭 38.
- 30) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12 : 21, 昭 37.
- 31) 池田宣昭: 未発表.
- 32) 久世文幸: 京大結研紀要, 12 : 97, 昭 38.
- 33) 岩井嘉一: 京大結研紀要, 14 : 99, 昭 40.
- 34) Segal, W. & Bloch, H.: J. Bac. 72 : 132, 1956.
- 35) Segal, W. & Bloch, H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 75 : 495, 1957.
- 36) Segal, W.: Amer. Rev. Resp. Dis., 91 : 285, 1965.
- 37) McCune, R. et al.: J. Exp. Med. 123 : 469, 1966.
- 38) 今井節郎: 胸部疾患, 1—4 : 164, 昭 32.
- 39) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12 : 43, 昭 37.
- 40) 村田太郎: 結核, 28 : 453, 昭 28.
- 41) 松島留蔵: 京大結研紀要, 8 (増刊 2 号): 595, 昭 35.