

原 著

結核菌の発育に不適當な条件と化学療法

V. 培養温度と化学療法剤の効果 (2)

前 川 暢 夫・池 田 宣 昭・裏 辻 康 秀

京都大学結核胸部疾患研究所内科1

受付 昭和 48 年 9 月 22 日

THE EFFECTS OF ANTITUBERCULOSIS CHEMOTHERAPY
IN VITRO UNDER VARIOUS CONDITIONS INADEQUATE
FOR THE GROWTH OF TUBERCLE BACILLI*

V. Incubating Temperature and Chemotherapeutic Effect (2)

Nobuo MAEKAWA, Nobuaki IKEDA and Yasuhide URATSUJI

(Received for publication September 22, 1973)

Chemotherapeutic effects of RFP alone, two-drug regimen of RFP·EB and three-drug regimen of RFP·EB·INH to *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv were evaluated *in vitro* by changing the incubating temperature at 37°C, 25°C and 4°C.

Comparing the results obtained at 25°C and 4°C with those at 37°C, the chemotherapeutic effects were remarkably lowered in the latter even in the three-drug regimen and the development of drug-resistance to RFP was not observed in such an inadequate condition for the growth of tubercle bacilli.

According to these results, it seems almost impossible to intensify the antituberculosis chemotherapeutic effect under the thermal condition inadequate for the growth of tubercle bacilli *in vitro*.

緒 論

結核化学療法の最終的な目標は、生体内の結核菌を絶滅することにあるといえようが、長期間にわたって化学療法を行つても生体内の結核菌を完全に死滅させてしまうことが困難であることは周知の事実である。これに関連して最近注目されている現象は McDermott¹⁾, McCune²⁾ および金井³⁾ らが報告している microbial persistence と表現されるものである。これは動物実験において、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菌があつて、しかもその菌は使用された抗結核剤

に感受性であることを意味している。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の効果が及び難いということである。はたしていかに化学療法の術式を強化しても増殖休止状態にある結核菌に対しては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、すでに教室の太田⁴⁾⁵⁾ は国立予防衛生研究所より分与された Streptomycin 依存性人型結核菌 18b 株を用いて増殖休止状態にある結核菌をつくり試験管内および動物実験を行なつたが、また別の角度から、われわれは結核菌の発育に不適當と思われる種々の環境を作りこれらをモデルとして実

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

験を行なつてきた^{6)~9)}。第1報⁶⁾では、結核菌の発育に不適當と考えられる培養温度 25°C および 4°C で INH を中心に薬剤を作用させた場合、結核菌に対する薬剤効果が非常に減弱されることを報告したのであるが、今回は第1報と同様な条件、すなわち結核菌の発育に不適當な培養温度 25°C および 4°C で RFP を中心に抗結核剤を試験管内で作用させ、それらによる結核菌発育阻止効果ならびに殺菌効果を、従来常用されてきた培養温度 37°C における効果と比較検討し、またその際の RFP 耐性獲得についても検討した。RFP は、Gruppo Lepetit の研究者を中心として開発され比較的最近に臨床的に使用されるようになった新抗結核剤で *Streptomyces mediterranei* の作る抗生物質 Rifamycin SV の半合成的誘導体であり、in vitro および in vivo の実験で優れた抗結核性を発揮することはすでによく知られていて、われわれの実験成績¹⁰⁾でも特に優れた殺菌力を示す点に特徴があると考えられる。

実験方法

Silicone-coated Slide Culture 法¹¹⁾ (SSC 法) を用い、培地は 10% 牛血清加キルヒナー培地、菌株は教室保存の H₃₇R_V 株を使用した。薬剤作用形式は、RFP 単独、RFP・EB 2 者併用、RFP・EB・INH 3 者併用の 3 群とし、薬剤濃度は RFP 100 mcg/ml、EB 200 mcg/ml、INH 100 mcg/ml を第 1 管濃度とし、以後それぞれ倍数希釈法により第 19 管までとし、第 20 管は薬剤を含まない対照培地とした。実験操作は、1% 小川培地上に 3 週間培養した集荷を集めて 0.1 mg/ml のベンジン菌液を作製し、池田の方法¹²⁾により、その菌液中にシリコン被覆スライド (SS) を可及的同時に数秒間浸漬して菌を付着させた。この結核菌付着スライドを上述の薬剤含有培地系列に投入し 37°C、25°C、4°C でそれぞれにつき同様

に薬剤を作用させた。薬剤含有培地は 1 週間に 1 回新しく作製し交換した。おのおの 4 週間薬剤を作用させた後、殺菌力を検討する目的で生理的食塩水で SS を洗浄し、薬剤を含まない培地系列の該当試験管に移し、すべて 37°C で更に 4 週間培養を続けた。判定方法は肉眼的に SS 上に発育した結核菌の集落が SS 表面の 2/3 以上を被うとき (卅)、2/3 ないし 1/3 のとき (卅)、1/3 以下のとき (+) とし、集落数 100 以下の場合にはおおよそその数を記録した。結核菌発育阻止効果の判定は薬剤作用を始めてから第 3 週目に行い、殺菌効果の判定時期は薬剤含有培地から薬剤非含有培地系列に SS を移し、37°C で 4 週間培養後とした。なお、RFP 耐性検査は殺菌効果判定後、SS 上の集落を 1% 小川培地に移して増菌し同様に SSC 法を用いて行なつた。耐性検査濃度は第 1 管を 2 mcg/ml とし、以後第 9 管まで倍数希釈し第 10 管は対照培地とした。

実験成績

成績は別表に示す通りであつた。殺菌効果についてみると、SS 上の結核菌発育が (卅)、(卅) は殺菌効果なし、(+) 以下は殺菌効果ありとすれば、培養温度 37°C で薬剤を作用させた場合、RFP 単独では第 9 管 (0.39 mcg/ml) まで、RFP・EB 2 者併用では第 8 管 (RFP 濃度 0.78 mcg/ml) まで、RFP・EB・INH 3 者併用では第 11 管 (RFP 濃度 0.098 mcg/ml) まで殺菌効果を認めた。次に、培養温度 25°C の場合、RFP 単独では第 3 管 (25 mcg/ml) まで、2 者併用では第 4 管 (RFP 濃度 12.5 mcg/ml) まで、3 者併用では第 5 管 (RFP 濃度 6.25 mcg/ml) まで殺菌効果を認めた。培養温度 4°C の場合、殺菌効果は全くみられなかつた。37°C における薬剤作用群と 25°C における薬剤作用群との差は試験管にして 6 管程度 (薬剤濃度にして 2⁶ 程度) である。37°C、25°C

Table 1. Incubating Temperature and Growth of Tubercle Bacilli (H₄₇R_V) under Chemotherapy

Temp.	Drug	tt*																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	K
37°C	RFP	—	—	—	—	—	—	—	1**	20	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	RFP・EB	—	—	—	—	—	—	1	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	RFP・EB・INH	—	—	—	—	—	—	1	—	6	30	40	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
25°C	RFP	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	RFP・EB	+	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	RFP・EB・INH	50	100	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
4°C	RFP	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	RFP・EB	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	RFP・EB・INH	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

* Serial dilution method. Tube No.1 contains RFP 100 mcg/ml, EB 200 mcg/ml, and INH 100 mcg/ml.
 ** Figures in the table show the number of countable colonies.

Table 2. Development of Drug Resistance under Various Thermal Conditions

		RFP alone																																		
		4 °C										25 °C										37 °C														
tt**	*tt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K					
1		-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-	-					
2		-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-					
3		-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-					
4		-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-					
5		-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-					
6		-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-					
7		-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍		
8		-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍		
9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍		
10		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	
11		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	
12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	
13		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	
15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	卍	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍
16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍
17		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍
18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍
19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍
K		-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	-	-	-	-	-	卍	卍	卍	卍	卍	

* Serial dilution method. Tube No.1 contains RFP 2 mcg/ml.
 ** Serial dilution method.

いずれにおいても RFP 単独作用よりも 3者併用のほうが試験管にして 2管, わずかながら強い効果を示した。RFP 耐性検査成績をみると, 耐性上昇はほとんど認められず, また培養温度による差も特に認められなかつた。なお, 表中で斜線の部分は殺菌効果判定時に菌発育を認めなかつたものである。

考 察・結 論

① 結核菌の発育に不適当な培養温度で RFP を中心に抗結核剤を作用させた場合, 37°C における殺菌効果と比較して, いずれの薬剤作用形式でも殺菌効果は非常に減弱された。

② RFP 単独作用と RFP・EB・INH 3者併用とは, 37°C, 25°C いずれにおいても, わずかながら 3者併用群のほうが強い効果を示した。この成績のみからの判断が可能であるならば, RFP は単独でもかなり強い殺菌力を発揮するので, これに他の抗結核剤を併用しても殺菌効果の強化はあまり期待できないかもしれない。

③ RFP 耐性上昇はほとんどみられず, また培養温度

による耐性獲得の差も特に認められなかつた。

ここに報告した実験成績の要旨は共同研究者の 1人である裏辻により, 第 48 回日本結核病学会総会において発表された。

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, 1964.
- 4) 太田令子: 結核, 46: 295, 1971.
- 5) 太田令子: 結核, 46: 493, 1971.
- 6) 前川暢夫他: 結核, 46: 235, 1971.
- 7) 前川暢夫他: 結核, 46: 293, 1971.
- 8) 前川暢夫他: 結核, 46: 491, 1971.
- 9) 前川暢夫他: 結核, 47: 1, 1972.
- 10) 未発表.
- 11) 東向一郎: 京大結研紀要, 7(3) 増刊1号, 461, 1959.
- 12) 池田宣昭: 京大結研紀要, 12(1), 21, 1963.