

原 著

分裂休止結核菌に対する RFP の試験管内殺菌効果

金井 興美・近藤 瑩子

国立予防衛生研究所

受付 昭和 53 年 7 月 27 日

BACTERICIDAL EFFECT OF RIFAMPICIN ON RESTING
TUBERCLE BACILLI *IN VITRO*

Koomi KANAI* and Eiko KONDO

(Received for publication July 27, 1978)

A streptomycin-dependent strain of tubercle bacilli was adapted to grow in Tween-albumin medium in the presence of SM of more than 20 μg per ml. In the absence of SM, this strain survived at least for 10 days keeping an almost constant level of viable counts.

With this particular strain as test microorganisms, the relation between the bactericidal effect of chemotherapeutic agents and mycobacterial multiplication was examined in Tween-albumin medium. KM (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), INH (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and RFP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were highly active in killing the bacterial cells multiplying in the presence of SM, but the resting cells induced by depletion of SM were killed only with RFP.

This *in vitro* experiment confirmed our previous observations that RFP was effective on both multiplying and resting tubercle bacilli in mice. A suggestion was made that RFP might be effective in eliminating persistent bacilli in clinical tuberculosis.

緒 言

私たちは結核感染における persisters (持続生残菌) の存在に永年関心をもち、この現象は、感染菌が分裂休止状態になることによつて、本来有効であるはずの抗結核剤の殺菌作用から免れるためであると考えた¹⁾。この想定を実証するために、分裂増殖に SM を要求する変異株を用い、これを SM を含まないソートン培地上に残余増殖せしめたのち菌液となし、マウスに静脈接種して分裂休止菌感染のモデルをつくつた。このような感染に対しては INH による強力な治療も、その生菌数消長に何らの効果も示さないことを経験した²⁾。一方、RFP が分裂増殖の極めて遅い菌感染に対し、これまでの薬剤にない卓効を発揮することが報告された³⁾⁻⁵⁾。このこ

とによつて私たちは、RFP が結核感染における persisters にも有効ではなからうかと予想し、上述のマウス実験系でその可能性を実証した⁶⁾⁷⁾。

しかしながら、動物実験での成果にもかかわらず、試験管内での検討がこれまでなされていない。理由は定量的な実験方法が確立されなかつたためである。最近私たちは、これまで小川培地、ソートン培地で維持し、使用してきた SM 依存株を、Tween-albumin 液体培地 (Dubos 培地) に継代保存することに成功した。これを用いることによつて、菌の分裂増殖と抗結核剤の殺菌効果との関係は、試験管内での検討が容易になつた。

実験材料と方法

培地：10%にウシ血清アルブミンを含む Dubos 液体

* From the First Department of Bacteriology and Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiyosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

培地“栄研”を使用した。

菌株：SM 依存性結核菌 18b 株⁸⁾を SM 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有 Dubos 培地に継代し、均等発育させたものを接種菌液とした。

菌発育の測定：Coleman 分光光度計 255 型を用い、420 nm で菌液の濁度を測定し、発育量とした。

生菌数の測定：培養液の10倍希釈系列をつくり、その 0.1 ml を SM を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に含む 1% 小川培地に接種し、4 週から 5 週後の発生集落数を測定した。

成績

1) SM 依存性 18b 株の依存度：SM を 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に含む Dubos 培地を中試験管に 6 ml ずつ分注した。接種菌液としての前培養は、SM 含有 Dubos 培地で、その管底の発育部分を静置のまま上澄みをピペットで吸引して除き、新たに SM を含まぬ新鮮 Dubos 培地を加えて 1 mg/ml の濁度とした。これを更に10倍に希釈して前述の被検培地に 0.1 ml ずつ接種し、斜位に置いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養した。1 日後に綿栓をゴム栓にかえ培養を継続し、毎日 1 度は振盪した。それぞれの濁度の変化を 420 nm で追求した。

Fig. 1 に示すように、発育がもっともよくみられたのは、SM 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、これを中心に 20 μg , 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で旺盛な増殖を認めた。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においては 6 日遅れて濁度の増加がみられたが、その後 10 日経つても 1/2 以下の発育量であつた。また 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、SM を含まない対照とともに、濁度の上昇はみられなかつた。

2) SM 欠乏時における発育量と生菌数：SM を含ま

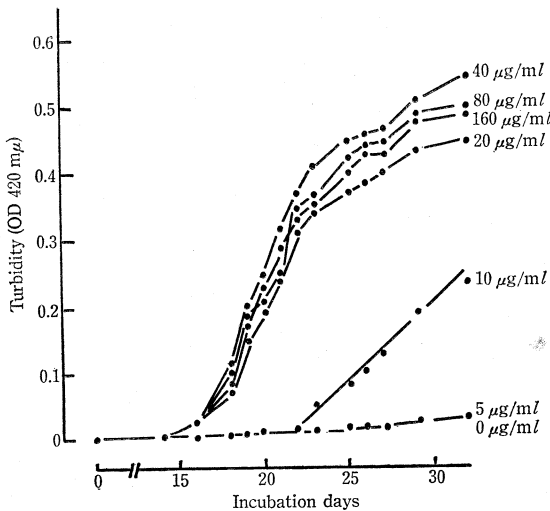


Fig. 1. Growth of a Streptomycin-dependent strain of tubercle bacilli in Tween-albumin medium containing Streptomycin in various concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

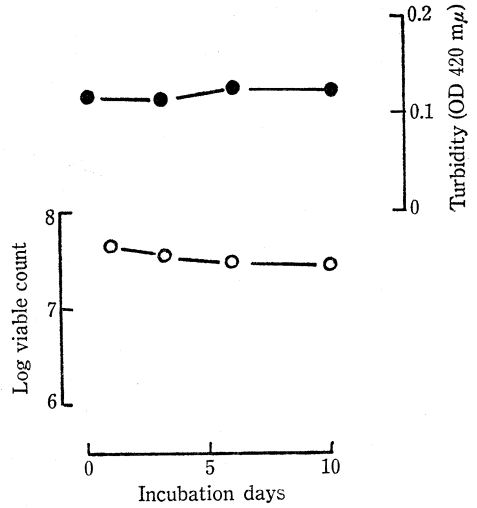


Fig. 2. Survival of a Streptomycin-dependent strain of tubercle bacilli in Tween-albumin medium without Streptomycin.

ない Dubos 培地中の約 1 mg/ml の濁度の菌液は、接種後 10 日目までほとんどその濁度の増加をみない (Fig. 2)。その間の生菌数にも、大きな変化はみられなかつた。

3) SM 添加, 不添加による 18b 株の増殖調節と化学療法の抗菌作用：SM 添加による増殖中の菌 (Fig. 3 右) と SM 不添加によつて増殖の抑制された菌 (Fig. 3 左) に対し、KM と EB はそれぞれ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, INH は 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, RFP は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で抗菌効果を比較した。

あらかじめ綿栓し滅菌した 50 ml 容量の三角フラスコ 10 個に、Dubos 培地 20 ml を分注し、そのうち 5 個には SM を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に添加した。ここに OD 420 nm で 0.15 の菌液 (約 1 mg/ml) を SM 添加培地には 0.1 ml, SM 不添加培地には 0.2 ml を接種し、3 日間培養した後、化学療法剤をそれぞれ上記の濃度に加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養を継続した。日を追つて培養液の一部をくみ出し 10 倍希釈系列をつくつて生菌数の消長をみた。

増殖菌に対しては、EB に静菌作用がみられ、INH, KM, RFP はともに顕著な殺菌作用を示し、生菌数は 7 日目には接種時の 1/1,000 程度となつたが、SM 不添加による非増殖菌では、EB, INH, KM いずれの存在においても 7 日に至るまで生菌数の減少をみることはなく、対照と同一菌数が維持された。この間、RFP のみは 7 日目において 1/10 以下に、10 日目においては 1/1,000 にまで生菌数を減少せしめた。

考 察

私たちが使用してきた SM 依存株 (18b) は、一般の小川培地上では 20~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の SM を要求すること

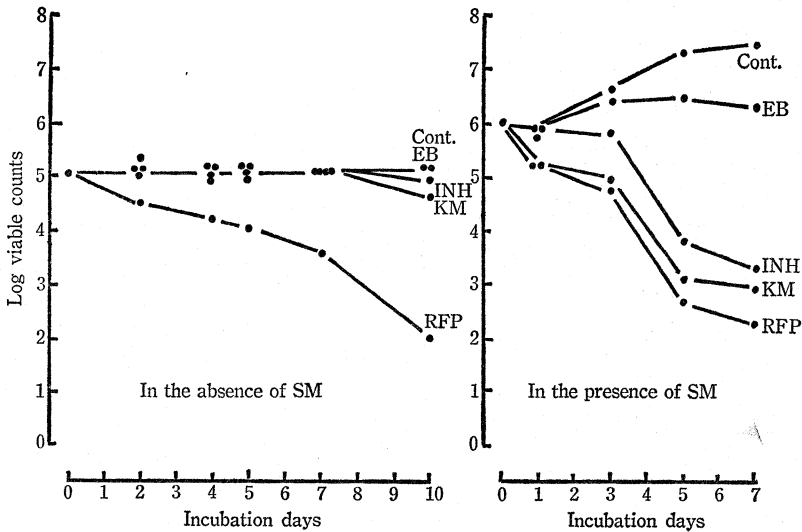


Fig. 3. Bactericidal test of INH, KM, RFP and EB with a SM-dependent strain of tubercle bacilli (18b) in Tween-albumin medium with or without SM.

Note: KM and EB 5 $\mu\text{g/ml}$, RFP 1 $\mu\text{g/ml}$, INH 2 $\mu\text{g/ml}$

が知られていたが⁹⁾, Dubos 培地においてはこの濃度限界は下降し, 10 $\mu\text{g/ml}$ でもある程度の抑制発育は観察された。この事実は, この培地が表面活性剤 Tween 80 を含むことと無縁ではないかもしれない。一方, 5 $\mu\text{g/ml}$ においては, SM 不含の対照培地と同じく濁度上昇を全くみなかった。また 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の SM 存在下の発育は, 濁度測定に供しうる均等発育をなし, 同時に, 薬剤添加による殺菌効果測定が可能であることを示唆した。

SM 不添加の場合に濁度上昇がなく, しかも10日前後生菌数レベルがほぼ一定に保たれるという観察は, 菌が分裂休止状態であることを示すものと考えてよいであろう。

以上のような基礎所見のうえに立つて 18b 株の分裂増殖を SM によつて制御し, それに対する化学療法剤の効果を検討したわけである。その成績は極めて鮮明なコントラストをなし, SM 存在下の旺盛発育菌に対して, KM, INH, RFP は極めて顕著な殺菌効果を示し, EB は静菌作用を発揮したが, SM 不添加環境での分裂休止菌に対しては, KM, INH は全く殺菌力がみられず, RFP のみが有効であった。実験の定量性を考慮して, 薬剤暴露菌体の洗浄操作を加えなかった。しかし効果を検討した薬剤濃度は 5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度であるので, 培養液の10倍希釈過程に有効濃度以下におちるであろうし, また, その有効濃度が生菌数測定用の小川培地上にもちこまれたとすれば, 上述の二つの場合の顕著な違いは現出しないはずである。

したがつて, これまでマウスで観察してきた現象が,

試験管内でも完全に支持されたわけである。

私たちは, SM 依存株の SM 欠乏菌が分裂休止しても, 代謝が全面的に停止したわけではなく, 自己を維持するに足る物質代謝, エネルギー獲得の道を維持していると考ええる。大腸菌その他の菌における知見^{10)~12)}を参考にすると, このような菌はチトクローム系に脱落があり, 酸化的代謝から解糖系へその依存度を高めている呼吸能の乏しい状態である。したがつて私たちは, 酸素分圧の低い乾酪壊死閉鎖病巣中の persisters のモデルとして, この変異株は好適であると考ええる。

そして, RFP の作用機序が DNA 依存性の RNA polymerase の作用阻害であるとすれば¹³⁾, 分裂休止状態の菌において, この代謝系がなお作動している可能性もあろう。この点は今後の興味ある研究課題であろう。

私たちはこれまでの一連の研究によつて, この SM 依存株を用いての実験方式が, 今後新たに開発されるであろう新抗結核剤の評価にすこぶる有効であろうと考えている。

結 論

1) SM 依存性結核菌株 18b を Tween-albumin (Dubos) 培地で発育せしめ, その満足すべき発育のためには 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の SM を必要とすることを認めた。

2) SM を含まない Dubos 培地において, この菌株は10日前後の間, ほぼ同一レベルの菌数を維持して生残する。

3) SM の添加, 不添加によつて Dubos 培地中にお

ける 18b 株の増殖を人為的に制御し、これに対する KM(5 μ g/ml), INH(2 μ g/ml), RFP(1 μ g/ml), EB(5 μ g/ml) の殺菌力を検討した。

4) KM, INH は分裂中の菌にのみ顕著な殺菌力を示し, RFP は分裂菌ならびに分裂休止菌の両者に殺菌的に働いた。EB は静菌的であった。

5) SM 依存株の SM 欠乏による分裂休止菌と感染個体におけるいわゆる persisters(持続生残菌)との類似性について論じた。

文 献

- 1) Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 19 : 181, 1966.
- 2) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 24 : 313, 1971.
- 3) Rees, R. J. W. et al.: Brit. Med. J., 1 : 89, 1970.
- 4) Holmes, I. B.: Intern. J. Leprosy, 42 : 289, 1974.
- 5) Holmes, I. B. and Hilson, G. R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145 : 1395, 1974.
- 6) 金井興美: 結核, 49 : 267, 1974.
- 7) 近藤瑩子・金井興美: 結核, 52 : 411, 1977.
- 8) 橋本達一郎: 結核, 30 : 707, 1955.
- 9) Kanai, K. et al.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 11 : 235, 1958.
- 10) Engelberg, H. and Artman, M.: Biochim. Biophys. Acta, 47 : 553, 1961.
- 11) Schaeffer, P.: Biochim. Biophys. Acta, 9 : 563, 1952.
- 12) Bragy, P. O. and Polglase, W. J.: J. Bacteriol., 88 : 1399, 1964.
- 13) Konno, K. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 107 : 1006, 1973.