

原 著

抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較

東村道雄・水野松司

国立療養所中部病院

受付 昭和55年3月1日

A COMPARATIVE STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN
THE GROWTH RATE OF TUBERCLE BACILLI AND THE
CONCENTRATION OF ANTITUBERCULOUS AGENTS

Michio TSUKAMURA* and Shoji MIZUNO

(Received for publication March 1, 1980)

The relationship between the growth rate of tubercle bacilli and the concentration of antituberculous agents was studied. The growth rate was observed by two methods: First, the ratio of the time of appearance of visible colonies on a medium, to which 20 to 50 viable organisms were inoculated, taking the time on control medium as 1 (Tsukamura & Noda: Med. & Biol., 45: 150, 1957) (The appearance of colonies occurred after 13.8 ± 1.0 days, when inoculated 33.6 ± 6.3 viable organisms); second, the generation time measured by the method of Youmans and Youmans (J. Bacteriol., 58: 247, 1949) (Ogawa egg medium was used).

The test organism was *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and the Ogawa egg medium was used throughout. After homogenizing by shaking with glass beads, the bacteria were suspended in saline and a bacterial suspension, 10 mg wet weight /ml, was prepared. This suspension and its dilutions, 10⁻¹ to 10⁻⁵, were used as the source of inoculation. The inoculation was done using a spiral loop, which delivers a 0.02 ml amount (Tsukamura & Noda: Kekkaku, 32: 639, 1957). The tubes inoculated were stoppered by a gum cap with a pin hole and incubated at 37°C, and the growth of colonies was observed every day. Antituberculous agents were added to the medium before sterilization. The medium was poured at 7 ml quantities into tubes, 165 by 16.5 mm, and was made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes.

The results are shown in Fig. 1 and 2. The degradation of antituberculous agents in medium during the incubation at 37°C was tested as shown in Table 1. It was shown that, out of the ten agents tested, only rifampicin and ethionamide are degraded during the incubation. The degradation of rifampicin was more marked than that of ethionamide. The results showed necessity of modification of curves in cases of these two agents. It was suggested that, after such modification, the curve of rifampicin be similar to a straight line.

From the results obtained, the antituberculous agents could be classified into three groups.

Group I. The agents which belong to this group showed a straight line-relationship between the growth rate of tubercle bacilli and the concentration of an agent. Increase of the concentration of the agents in suggested to produce increased activity in lesions, showing a straight line-relationship. The following agents belong to this group: Streptomycin, kanamycin, *p*-aminosalicylate, ethambutol, rifampicin, cycloserine, and amithiozone.

Group II. Capreomycin and ethionamide belong to this group. Increase of the concentration

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

is accompanied by marked increase of activity. The increase of the activity is suggested to be higher than expected from the straight line-relationship. It is also possible that decrease of the concentration may cause a marked decrease of the activity. It is desired to make efforts to elevate the concentration of these agents in lesions.

Group III. Only isoniazid belongs to this group. This agent does show no activity if the concentration is lower than its critical concentration, but it shows almost complete inhibition of the growth when the concentration reaches the critical concentration. The use of higher concentrations than the critical one will not give much effectiveness. Use of a large dose of this agent will have only meaning to maintain effective concentration for a longer period.

緒 言

抗結核剤の結核菌に対する作用は、殺菌作用と静菌作用に分けて考えられる。抗結核剤の中で、殺菌作用 (*in vitro*) が報告されているのは、streptomycin (SM)^{1)~3)}, isoniazid (INH)^{4)~6)}, kanamycin (KM)^{7)~11)}, capreomycin (CFM)¹²⁾, rifamycin SV ないし rifampicin (RFP)¹³⁾¹⁴⁾ であつて、*p*-aminosalicylate (PAS), cycloserine (CS), ethionamide (TH), ethambutol (EB), amithiozone (Tb₁) には殺菌作用はないと考えられている。殺菌作用は、結核菌が活発に増殖している条件でだけ、試験管内実験で認められるものであつて、果たして、人体内で殺菌作用が起こっているかどうかについては証拠がない。一方、殺菌作用がないとされている PAS や sulfisoxazole を低濃度を含む培地に結核菌が発育した場合、菌はいつたん発育しても早急に発育能力を失うという観察もある¹⁵⁾。したがつて、殺菌作用がある抗結核剤の方が有効であると短絡的に考えることはできない。現に、殺菌作用のある CPM よりも、殺菌作用のない EBの方が、臨床的に有効であることは、臨床家が頻々経験するところである。いずれにしても、生体内の抗結核剤の濃度は、比較的低い濃度にとどまることは確かであるから、より重要なのは、低濃度の抗結核剤の作用の仕方であると思われる。

東村¹⁶⁾は1959年に、SM, PAS, INH, Tb₁ の低濃度における結核菌にたいする作用 (*in vitro*) を観察した。その結果によると、SM, PAS, Tb₁ では、結核菌の発育に影響を与えない濃度より少し高い濃度で発育遅延が起こることが見出された。しかも、この発育遅延は、濃度の増加に対して直線的関係を示して強くなつた。一方、INH では 0.02 μg/ml までは発育に対して影響がないが、0.03~0.04 μg/ml になると急に発育が停止することが観察された。すなわち SM, PAS, Tb₁ では、濃度の増加に比例して発育遅延作用が強まるが、INH ではその作用は、いわば “Alles oder Nichts” であることがわかつた。

本報では、このような濃度と発育遅延作用の関係を、

その後に見えられた抗結核剤について観察することとした。

実験材料および方法

被検株は *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv 株を使用した。培地は 1% 小川培地を使用した。1% 小川培地は次の組成をもつ。原液 (1% KH₂PO₄ および 1% sodium glutamate 含有水溶液) 100 ml, 全卵液 200ml, glycerol 6 ml, 2% malachite green 水溶液 6 ml。この培地を 165×16.5 ml の試験管に 7 ml ずつ分注して、90°C 60 分滅菌することにより斜面培地として仕上げた。使用した薬剤は、水に溶かして滅菌前の培地に添加したが、RFP, TH, Tb₁ は水に溶けないので、いつたん propylene glycol に溶解した後、水で希釈して培地に添加した。培地に添加される propylene glycol 量は、1% を超えないようにした。1% 以下では、結核菌の発育に対して影響がないことを観察した¹⁷⁾。使用薬剤は、streptomycin sulfate 明治製菓, isoniazid 塩野義, sodium *p*-aminosalicylate 塩野義, amithiozone 塩野義, ethionamide 塩野義, cycloserine 塩野義, ethambutol 科研化学, rifampicin 第一製薬 (Lepetit, Milano), kanamycin sulfate 明治製菓, capreomycin sulfate 塩野義 (Eli Lilly, Basingstoke, England) である。

発育速度の指標としては、(1) 20~50 生菌単位/培地の接種を行なつたときに、肉眼で初発集落を発見するまでの日数¹⁸⁾, (2) Youmans and Youmans¹⁹⁾ の方法によつて測定した世代時間 (generation time) の 2 つの方法を用いた。

被検株を小川培地に接種して、37°C 4 週培養後、発育した集落をとり、ガラス玉入りコルベンで 10 分間振盪して均一化し、生食水 (0.9% NaCl 水溶液) を加えて比濁法により 10 mg/ml (湿菌量) の浮遊液を作つた。これを生食水で希釈し、10⁻¹~10⁻⁵ の菌液を作つた。以上の 6 種の菌液を種々の薬剤濃度 (使用濃度は図 1 および 2 参照) を含む小川培地に、渦巻白金耳で 0.02 ml (1 白金耳量) ずつ接種した。培地の入つた試験管に穴あきゴム栓をかぶせて 37°C に培養し、毎日集落発生の有無を

Table 1. Effect of Pre-Incubation of Medium at 37°C for 0 to 3 Weeks on Activity of Antituberculous Agents

Antituberculous agent	Resistance level (The highest concentration of antituberculous agent on which the test organism could grow) ($\mu\text{g/ml}$)			
	Pre-incubation time of medium (weeks)			
	0	1	2	3
Streptomycin sulfate	5	5	5	5
Isoniazid	0.02	0.03	0.03	0.03
Sodium <i>p</i> -aminosalicylate	0.05	0.05	0.05	0.05
Kanamycin sulfate	20	20	20	20
Capreomycin sulfate	20	20	20	20
Ethambutol	1	1	1	1
Ethionamide	10	10	20	40
Rifampicin	1.25	2.5	5	10
Cycloserine	5	5	5	5
Amithiozone	0.25	0.25	0.25	0.25

The concentration of antituberculous agents used for testing the resistance level were as follows: Streptomycin 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/ml}$, Isoniazid 0, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, and 0.2 $\mu\text{g/ml}$, *p*-Aminosalicylate 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, and 100 $\mu\text{g/ml}$, Capreomycin 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, and 100 $\mu\text{g/ml}$, Ethambutol 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, and 20 $\mu\text{g/ml}$, Ethionamide 0, 5, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{g/ml}$, Rifampicin 0, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/ml}$, Cycloserine 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{g/ml}$, Amithiozone 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{g/ml}$.

Four series of media, each consisting of three replicates of the above media, were pre-incubated at 37°C for 0, 1, 2, and 3 weeks, respectively. After incubation, three replicates were inoculated with a 0.02 ml sample of three bacterial suspensions, respectively (10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-4} dilutions of a bacterial suspension, 1 mg (wet weight)/ml). The growth of the test organism was observed after incubation at 37°C for 3 weeks. The resistance level was read in one set of media, in which the control medium showed 20 to 100 colonies. The number of viable organisms inoculated to the set of reading was as follows: Pre-incubation time 0, 39.2 ± 5.4 ; one week, 83.9 ± 20.3 ; two weeks, 30.0 ± 9.8 ; three weeks, 43.0 ± 11.3 (mean of ten samples and standard deviation).

観察した。培地は各濃度2本とし、2本の発育日数が違う場合には、少ない方をとった。しかし実際には、このような例は極めてまれであった。

以上のように、集落初発日数を記録した後、28日後に薬剤を含ませた対照培地の集落数を数えた。その結果、 10^{-4} 菌液を接種した場合に、培地あたり集落数 33.6 ± 6.3 (20本の平均値と標準偏差)を得たので、第1の方法の初発集落発生までの日数は、 10^{-4} 菌液接種のseriesで判定した。薬剤を含ませた対照培地における初発集落発現日数は、 $x = 13.8 \pm 1.0$ 日 (10測定の平均値および標準偏差)であったので、薬剤を含む培地における初発集落発現日数 y 日を求め、 (y/x) で発育速度を表した。次に $10^0 \sim 10^{-5}$ 菌液を接種した全seriesについて初発集落発現日数をグラフに記入した。この際、縦軸に接種菌液の濃度を取り (原点が 10^0)、横軸に日数をとって、各濃度における初発集落発現までの日数を記入する。曲線が直線関係を示す部分で、最大菌液濃度を a 、最小菌液濃度を b とすれば、世代時間 G は次式で与えられる¹⁹⁾。なお t は初発集落発現日数の差。この式では、 G は日数で示されるので、これを時間になおして図に結果を示した。 $K = (\log a - \log b)/t$, $G = \log 2/K$ 。

例えば 10^{-1} 菌液接種で10日、 10^{-4} 菌液接種で15日に

初発集落が発生すれば、 $a = 10^{-1}$, $b = 10^{-4}$, $t = 15 - 10 = 5$ 日。 $K = \{(-1) - (-4)\} \div 5 = (3/5) = 0.6$, $G = \log 2/K = 0.3/0.6 = 0.5$ (日) = 12時間。

37°Cに培養した場合の、培地中における薬剤の抗菌力の推移は次の方法で測定した。種々の薬剤濃度 (表1参照) を含む小川培地を作製し、これを37°Cに、0, 1, 2, 3週に保存した後、次の菌液を渦巻白金耳で接種した。被検株を小川培地に3週培養し、これをガラス玉コルベンで均一化した後、比濁により1 mg/ml (湿菌量) の菌液を作った。この菌液を生食水で希釈して、 10^{-2} , 10^{-3} および 10^{-4} 菌液を作り、この菌液を渦巻白金耳で0.02 ml ずつ各培地に接種し、37°C 3週培養した後、対照培地 (薬剤なし) に20~100集落を生じる菌液接種の系列で、集落発生を認めた最高濃度を測定した。この濃度は、いわゆる“actual count”²⁰⁾法による耐性度に相当する。37°Cに培地を保つことにより、薬剤が分解していれば、より高度の濃度に発育が起こると考えられ、薬剤の分解がなければ、発育の起こる濃度は0時間保存の場合と同じはずである。この方法により、薬剤分解の有無を検討した。

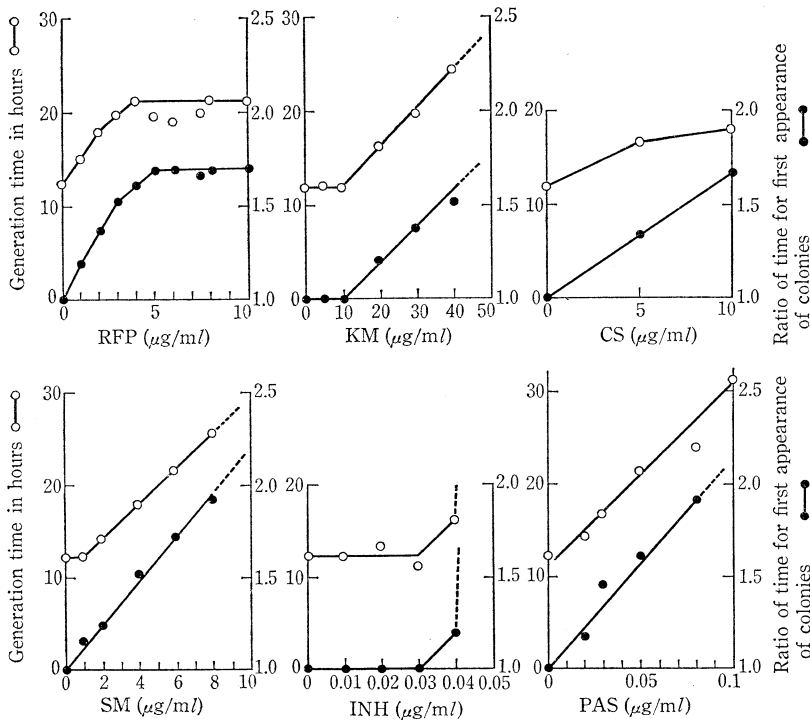


Fig. 1. Relationship between the concentration of antituberculous agents and the growth rate of *M. tuberculosis* (strain H₃₇Rv).

The growth rate was expressed as the generation time estimated by the method of Youmans and Youmans (J. Bacteriol., 58: 247, 1949) and/or the ratio of the time of first appearance of visible colonies.

実験結果

実験結果を図1, 2および表1に示す。

図1および2は、初発集落発現までの時間および世代時間を指標とする発育速度と薬剤濃度の関係を示す。当然のことながら、初発集落発現時間比と世代時間の推移は並行している。これらの指標による発育速度と薬剤濃度の関係は、薬剤により異なり、次のごとく分類できる。

- 1) 発育速度と薬剤濃度の関係を示す曲線が下向き曲線となるもの：RFP。
- 2) 同曲線が直線となるもの：SM, KM, PAS, CS, EB, Tb₁。この際、 $\tan \theta$ の θ が比較的大なるものはSM, KM, PAS, EB, 比較的小なるものはCSおよびTb₁。ただし濃度目盛のscaleが違うので、この $\tan \theta$ の θ の大小はあまり意味がない。ただし、EBは世代時間でみると直線、初発集落発現時間比でみると、次の上向き曲線にみえる。このくい違いは実験誤差によるものと思われる。
- 3) 同曲線が上向き曲線となるもの：TH, CPM。
- 4) ある一定濃度になると、突然、発育が完全停止となつて、曲線が断絶するもの：INH。

次に37°Cに培地を保存することにより薬剤の活性が低

下するものはRFPとTHで、他の薬剤は37°C 3週までの保存では活性は低下しないと考えられた(表1)。THの活性は、3週後に1/4となり、RFPの活性は、3週後に1/8(1週ごとに半減する)となつた。

考 察

図1および2の結果を解釈するに当たつては、次の問題を考慮する必要がある。

1) 培地中の抗結核剤の分解

図1および2の結果は、薬剤濃度が高くなるほど、発育速度が遅くなることを示している。発育速度が遅い場合は、初発集落発現の判定日が遅くなるので、薬剤の活性が培養日数と共に低下する場合は、それだけ影響が大きい。したがつて、もし培養日数の延長とともに活性低下が起こる場合には、それ相応の曲線の修正が必要となる。表1の結果は、使用した薬剤の抗菌力は、RFPとTH以外では起こらぬことを示している。したがつてRFPとTH以外では、上記の修正は必要ないと思われる。

培養中に起こる培地中の抗結核剤の活性低下の有無については、田村およびその共同研究者^{21)~24)}の報告がある。彼らによれば、EBおよびCSでは活性の低下は起

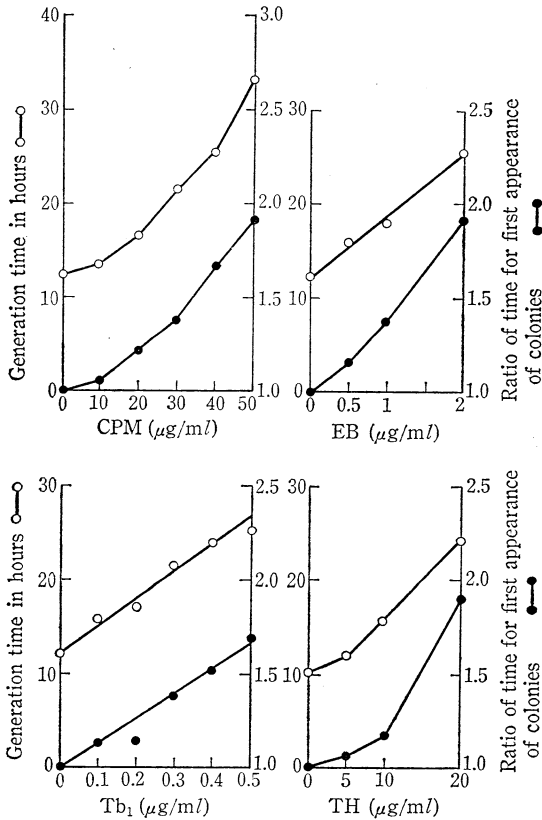


Fig. 2. Relationship between the concentration of antituberculous agents and the growth rate of *M. tuberculosis* (strain H₃₇Rv).

The growth rate was expressed as the generation time estimated according to the method of Youmans and Youmans (J. Bacteriol., 58: 247, 1949) and/or the ratio of the time of first appearance of visible colonies.

こらず²¹⁾²²⁾, RFP および TH では、これが起こつたという²³⁾²⁴⁾。この結果は、今回の我々の実験結果とよく一致している。ただ、田村などによれば、RFP の活性低下は1週で1/4²³⁾, TH のそれは1週で1/2となつているから²⁴⁾, 我々の測定値よりも大きくでている。

このような培養中の活性低下を修正すると、RFP および TH の曲線は、実際には、もつと立ち上つた形になるべきであると思われる。特に分解の著しい RFP の場合は、図1の曲線は直線に近づくとと思われる。

2) 発育速度測定法の問題

本報では、発育速度の指標として、次の2つをとつた。第1は単個菌またはそれに近い菌から可視集落に発育するまでの時間¹⁸⁾, 第2は Youmans and Youmans¹⁹⁾ の方法によつて測定した世代時間である。なお第1の場合の単個菌は、本当の単個菌でなくてもよい。3~4個の菌の集合 (clump) であつても、viable bacterium が、その中の1つであればよい²⁵⁾。更に言えば、この方法自

体おおまかな指標であるから再現性があればよいであろう。問題は、第2の世代時間の測定値が妥当かどうかにある。測定の方法自体には、特に問題はないと思われる。対照培地 (薬剤なし) での、10回の測定の平均値は、13.2±0.8 時間で、測定誤差は小さく、再現性に富んでいるからである。しかし、この測定値は、実際の世代時間より小さい (短い) 値になっていると思われる。なぜなら、初発集落発現までの時間は14日であるから、世代時間が13.2時間であると、14日間に25回分裂が起こつたことになる。1個の菌から出発したとなると、菌数は3×10⁷になつていることになり、これは約1mgの菌に相当する。しかし、実際の初発集落はずつと小さい (未発表成績)。この点から考えても、本当の世代時間はもつと長いはずである。仮に初発集落の菌量が0.1mgであると考えると、これは約3×10⁶の菌に相当し、14日間で、この大きさになつたとすると、世代時間は約15時間と推定される。この「くい違い」の原因は不明であるが、一つの可能性としては、Youmans and Youmans の方法が、単個菌も clump の菌も同じ速度で増殖するという仮定にたつていることが関係しているように思われる。

また菌の発育曲線は通常 sigmoid であるが、本報のように初発集落出現時間に基づく発育速度の観察では、おそらく「Lag phase」(誘導期) の発育に対する薬剤の作用ということになる。しかし耐性検査においても、このことは同様であり、薬剤の有効性の推定は、もつぱら「Lag phase」に対する作用によつてなされている。また「Log phase」(対数期) の菌に対する作用をみなければ、生体の実際の参考にはならないという根拠もない。したがつて一応、以上の点を考慮しはするが、本報によつて得た結果からする化学療法への考察を以下に行なつてみる。

(注. *In vitro* の実験は、菌と薬剤との関係に限られた観察であることは言うまでもない。*in vitro* での結核菌の発育速度は、世代時間12~15時間で、空洞内結核菌の世代時間推定値54時間²⁶⁾より遙かに速い。したがつて、たとえ対数期の菌に薬剤を添加しても、生体内のモデルとは言い難い。また *in vitro* で速やかに増殖している菌で観察される殺菌作用が、菌の増殖速度がはなはだ遅い生体内で同じように起こるかどうかは、著しく疑わしい²⁶⁾。一方、通常、殺菌的ではないと思われている低濃度 (発育遅延濃度) の薬剤中で一旦発育しても、発育した菌が速やかに viability を失う現象も観察されている¹⁵⁾。)

A. 薬剤濃度と発育速度の関係が直線関係を示す薬剤: SM, KM, EB, PAS, RFP, CS, Tb₁ (RFPは培地中の分解を修正して一応直線関係を示すものとみなした)。

これらの7剤は、濃度を増せば、それに比例して発育遅延作用(抗菌力)も増加すると思われる。したがって副作用の点で許される限り、大量に投与することが望ましいと思われる。

B. 薬剤濃度と発育速度の関係を示す曲線が横軸(濃度軸)に対して凸形を示す薬剤: CPM, TH。

これら2剤は、投与量の増加(病巣中濃度の増大)が著しい抗菌力の増加をもたらすと期待される。したがって副作用を考慮しつつ、可及的投与量を増す努力が払われてよい。逆に、投与量を減らすと著しく効果が減るとも言える。

C. 薬剤濃度と発育速度の関係を示す曲線が断絶を示す薬剤(ある濃度まで無影響だが、一定濃度に達すると強力な発育阻止作用が起こるもの): INH。

INHの作用様式は、他の抗結核剤とは異なっている。あまりの少量投与は無効であるが、一定の濃度に達すれば、それ以上濃度をあげても意味がないことが考えられる。この結果からすると、INHの大量投与は、あまり意味がないことが示唆される。ただ、あるとすれば、有効血中濃度を長く保つという意味でしかないと考えられる。

以上の事項が、本報の結果から考えられるが、考察のはじめに述べたように、*in vitro*の実験の結果が、そのまま臨床につながるかどうかは、向後の臨床観察の結果を待たねばならぬであろう。

結 論

10種の抗結核剤の濃度と結核菌の発育速度との関係を観察し、次の結果を得た。この関係を示す曲線型によつて、抗結核剤を次の3種に分類できた。

A. 濃度の増加と発育速度遅延が直線関係を示すもの: SM, KM, PAS, EB, RFP, CS, Tb₁。

B. 濃度の増加が、直線関係以上に発育遅延を起こすもの: CPM, TH。

C. 一定濃度までは発育に無影響であるが、ある濃度に達すると急に著明な発育阻止を起こすもの: INH。

第2のCPMおよびTHでは、病巣中濃度の増加に

よつて、著明な有効性が期待できる。第3のINHでは、発育阻止を起こす濃度に達すれば、それで充分で、それ以上の大量投与は、あまり意味がないことが示唆される。

文 献

- 1) Smith, D. G. and Waksman, S. A.: J. Bacteriol., 54: 253, 1947.
- 2) Garrod, L. P.: Amer. Rev. Tuberc., 62: 582, 1950.
- 3) 東村道雄: 医学と生物学, 22: 41, 1952.
- 4) Schaefer, W. B.: Amer. Rev. Tuberc., 69: 125, 1954.
- 5) 鈴木鏝三郎・東村道雄: 結核, 30: 567, 1955.
- 6) Mitchison, D. A. and Selkon, J. B.: Amer. Rev. Tuberc., 74: 109, 1956.
- 7) 野田 用他: 医学と生物学, 49: 207, 1958.
- 8) 金井興美他: 日細, 13: 1101, 1958.
- 9) Curci, G. and Guidi, V.: Arch. Tisiol., 13: 533, 1958.
- 10) Steenken, W., Jr. et al.: Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis., 79: 66, 1959.
- 11) Tsukamura, M. et al.: J. Antibiotics, A, 13: 406, 1960.
- 12) Stark, W. M. et al.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1962: 596, 1962.
- 13) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: J. Antibiotics, A, 15: 216, 1962.
- 14) Pallanza, R. et al.: Arzneimittelforschung, 17: 529, 1967.
- 15) Tsukamura, M. and Noda, Y.: J. Antibiotics, A, 11: 156, 1958.
- 16) 東村道雄: 結核研究の進歩, 27: 185, 1959.
- 17) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Am Rev Respir Dis, 98: 505, 1968.
- 18) 東村道雄・野田 用: 医学と生物学, 45: 150, 1957.
- 19) Youmans, G. P. and Youmans, A. S.: J. Bacteriol., 58: 247, 1949.
- 20) 東村道雄: 医学と生物学, 49: 87, 1958.
- 21) 田村昌敏・高野 了: 結核, 44: 41, 1969.
- 22) 田村昌敏・高野 了: 医療, 20: 53, 1966.
- 23) 田村昌敏他: 結核, 48: 463, 1973.
- 24) 田村昌敏・山崎 彰: 結核, 42: 165, 1967.
- 25) 東村道雄・野田 用: 結核, 32: 639, 1957.
- 26) 東村道雄: 結核, 53: 495, 1978.