

原 著

ガス曝露下における結核化学療法剤の効果に関する実験的研究

第1編 結核菌発育阻止効果について

山 鳥 英 世

京都大学結核胸部疾患研究所内科 I (主任教授: 前川暢夫)

国立療養所南京都病院 (院長: 磯部喜博博士)

受付 昭和 56 年 5 月 2 日

IN VITRO EFFECTS OF SEVERAL KINDS OF GAS EXPOSURE ON THE
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ANTITUBERCULOUS AGENTS

Chapter I. Bacteriostatic Effects

Hideyo YAMADORI*

(Received for publication May 2, 1981)

It was found in general that the activities of antituberculous agents on the growth of tubercle bacilli was attenuated when they were cultured under unfavourable conditions for the growth of bacilli. In this experiment, the air in environment of culture media of tubercle bacilli was replaced by either of N_2 , CO_2 or O_2 , and the antimicrobial activities of antituberculous agents were examined.

The experiments were performed by using the silicone-coated slide culture method with Kirchner's medium. *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV was used as the test strain.

The minimal inhibitory concentration (MIC) of streptomycin (SM),¹⁾ kanamycin (KM), para-aminosalicylic acid (PAS), isoniazid (INH) and rifampicin (RFP) was determined.

There was no growth of tubercle bacilli in any sample, regardless of the kind of drugs used, the length of the cultivation time, and the kind of gas.

In conclusion, it was proved by this experiment that conditions used in this study was quite inadequate for the growth of tubercle bacilli.

緒 言

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言えよう。しかし、今日の化学療法では、薬剤数の増加、投薬期間の延長等を行なつても生体内の結核菌を完全に死滅させることは困難である。

馬淵¹⁾ はマウスの実験結核症における、肺および脾内結核生菌数の経過を短期間(2ヵ月)、および長期間(8ヵ月)、それぞれ単独あるいは多剤併用による化学療法を行なうことにより、その経過を追求し、抗結核剤

streptomycin (SM), para-aminosalicylic acid (PAS), isoniazid (INH), ethionamide (TH), ethambutol (EB) の使用による2ヵ月間の化学療法では、終了後肺および脾内生菌の再増殖をみたが、8ヵ月間の治療では、3者および5者の多剤併用化学療法を行なつた群では肺内生菌の再増殖をみなかつたと報告している。ただし、この実験には rifampicin (RFP), pyrazinamide (PZA) は含まれていない。

生体内の結核菌とマウスおよび試験管内の結核菌との間には、それぞれに種々の面から相違点は多いとしても、

* From the First Department of Medicine Chest Disease Research Institute Kyoto University, 53-Kawaramachi Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

結核を根絶するためには、まず実験的にいかなる環境の結核菌をも死滅させるような化学療法に一步でも近づかなければならないと考える。

そこで我々の教室では結核菌の発育に不適当と思われる種々の環境を作り、これらをモデルとして実験が行なわれてきた^{2)~5)}。これは growing cell には抗結核剤はよく作用するが resting cell には作用がほとんどみられないという事実を背景としている。あるいは、また Mc Dermott⁶⁾ らのいわゆる persister の存在が eradicated chemotherapy を成立し難くしているとも言えよう。

元来結核菌は好気性菌であり、菌の発育に酸素が必要であることは明らかな事実であるが、海老名⁷⁾ はガスの出入に役立つ2つの管を有する約2 l のガラスビン中に一定量の菌をロックマン氏培養液に浮遊させた三角コルベン数個を入れた後、ガラスビンの空気を窒素、炭酸ガスおよび酸素から成る各種混合ガスに置き換え38°C 恒温室に放置し、4週間培養後細菌を秤量し、人型結核菌には肺胞内ガスに近いガス組成が最も発育に適していると報告している。

今回著者は、我々の研究室で継続的に検討されてきている結核菌の発育に不適当な条件を、窒素、炭酸ガスおよび酸素などのガスで液体培地上の空気を置換することにより作り出し、これらに曝露状態で結核菌に抗結核剤を作用させ、結核菌発育阻止効果を検討する試験管内実験を行なった。

以下にその成績を報告する。

第1章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

薬剤: SM, KM, PAS, INH および RFP について検討した。

ガス: 窒素、炭酸ガスおよび酸素を使用した。

菌株: 教室保存の H₃₇Rv 株で1%小川培地に4週間培養したものを使用した。

培地: おおよそ pH 6.5 の10%牛血清加キルヒナー培地を使用した。

容器および装置: 200 ml の枝つきコルベン、およびコルベン連結装置(図1参照)を利用した。

シリコン被覆スライド: 東の方法⁸⁾によつて作製した。シリコン被覆スライド(Silicone-coated Slide, SS と略す)とはスライドガラスに所定の処理を加えてその表面を silicone の薄膜で被覆したもので、スライドガラスは普通のスライドガラスを縦に3切したもの(ca. 9×75 mm)を使用した。すなわち、上記のスライドガラスをクロム硫酸中に24時間浸漬後、流水中で洗浄したものを、室温で乾燥させ、次いでこれを粘度350~500 centistokes の Dimethyl Silicone (Dow Corning 社製“DC 200 Fluid”)の2%(v/v)クロロホルム溶液に約1分間浸漬後、室温で1ないし2時間風乾し、300°C、1時間熱処理を加えたものである。

第2節 実験条件および実験方法

1) 菌液および菌接種方法: 上述の1%小川培地上に発育した H₃₇Rv 株に約7 ml の石油ベンジンを加え、よく振盪して菌液とし、これを別の試験管に移し、2~3分間静置して粗大菌塊を沈殿せしめた後、上清を他の試験管に移し、硫酸バリウム標準液と比色することによつて約0.1 mg/ml の石油ベンジン菌液を作製した。そして池田の方法⁹⁾、すなわち実験に必要な数の SS を縦に並列させることのできる金属製の網セット(写真1。1つのセットに50枚の SS を並列できる、つまり50枚の SS を同時に同じ深さで浸漬できるセット)を使用することによつて、上記のベンジン菌液中に SS を可及的同時に数秒間浸漬して結核菌を付着させた。

2) 薬剤: 薬剤においては SM, KM は蒸留水で10 mg/

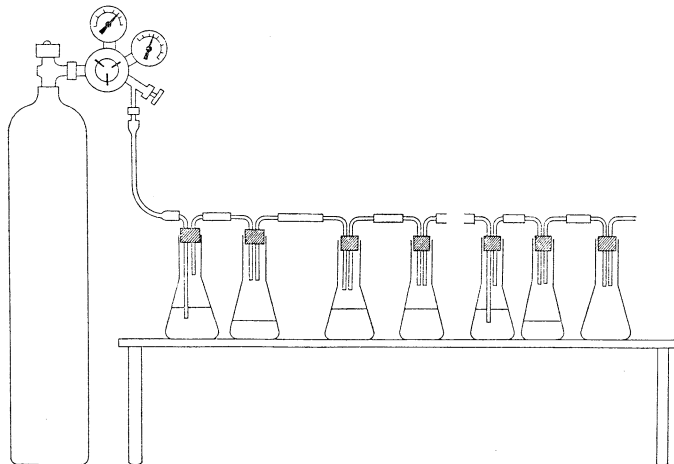


図1「実験装置」略図

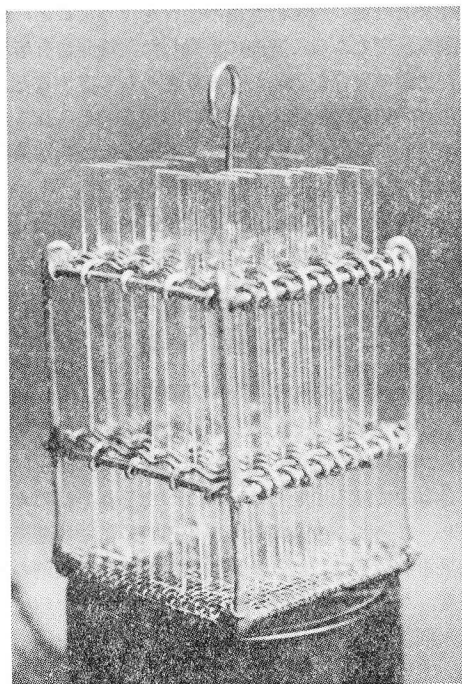


写真 1

表 1 薬 剤 濃 度

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		
SM	1	10	100
KM	1	10	100
PAS	1	10	100
INH	0.1	1	10
RFP	0.1	1	10

ml まで希釈して、その後は培地を用いて希釈した。PAS は70%アルコールを用いて溶解希釈して 1 mg/ml 液とし、その後は培地を用いて希釈した。RFP の溶解希釈には dimethyl formamide(DFA) を用い、 1 mg/ml 液とし以後培地を用いて希釈した。

3) 薬剤作用温度: 37°C とした。

4) 実験操作: 10 ml ピペットで 200 ml の枝つきコルベンに培地を 99 ml 注入し、先に作製しておいた各薬剤を作用濃度がおのおの3段階(表1)になるように各薬剤を 1 ml ずつ注入し全体で 100 ml とした。次に菌付着 SS を耳鼻科用ピンセットで各コルベンに3枚ずつ投入した。これらのコルベンを各薬剤別に分け薬剤濃度の低濃度から高濃度の順に配列した。薬剤の逆流を防止する目的で異なる薬剤間には、それぞれ空のコルベンを配列した。これらの枝つきコルベンを内径 5 mm 長さ 15 cm のゴム管で連結した。ガスボンベより接続した最初のコルベンと最後のコルベンには、おのおの水を入れ枝つきの一方は水中に達し、他の一方は達しないように

表 2 結核菌発育阻止効果

(各週間ともにすべてのガスに共通)

薬 剤 ($\mu\text{g/ml}$)		期 間		
		2 週 間	3 週 間	4 週 間
SM	1	— — —	— — —	— — —
	10	— — —	— — —	— — —
	100	— — —	— — —	— — —
KM	1	— — —	— — —	— — —
	10	— — —	— — —	— — —
	100	— — —	— — —	— — —
PAS	1	— — —	— — —	— — —
	10	— — —	— — —	— — —
	100	— — —	— — —	— — —
INH	0.1	— — —	— — —	— — —
	1	— — —	— — —	— — —
	10	— — —	— — —	— — —
RFP	0.1	— — —	— — —	— — —
	1	— — —	— — —	— — —
	10	— — —	— — —	— — —
K_1		— — —	— — —	— — —
K_2		卅 卅 卅	卅 卅 卅	卅 卅 卅

K_1 : 薬剤非含有培地でガスを流入。

K_2 : 薬剤非含有培地でガスを流入せずふらん室に放置。

して、これによりガス流入を確認した。薬剤含有培地においてはコルベンの枝つきは培地に達しないようにして、培地上の空気をガスで置換するようにした。このようなコルベン連結装置を作りガスボンベより、窒素、炭酸ガスおよび酸素をそれぞれ単独で、2週間、3週間および4週間流入させた。これらの装置全体をふらん室に置き 37°C で培養した。対照として薬剤非含有培地に SS を入れガスを流入させたものと、薬剤非含有培地に SS を入れ、ガスを流入せずふらん室に放置したものとの2つの対照を作製した。

5) 判定方法: 肉眼的に観察して SS 上に発育した結核菌の集落が SS 表面積 (SS のベンジン菌液付着部分) の $2/3$ 以上を被うとき(卅), $2/3 \sim 1/3$ のとき(卍), $1/3$ 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時期はそれぞれのガス流入終了時、すなわち実験開始後2週間、3週間および4週間目に行なつた。

第2章 実験成績

発育阻止効果についての実験成績を表2に示した。いずれの薬剤濃度でも、いずれのガス流入においても肉眼的に結核菌の発育は認められなかつた。ガスを流入させた薬剤非含有培地でも同様に2週間、3週間および4週

間後ともに菌の肉眼的発育は認められなかつた。薬剤非含有培地でガスを流入せずに、ふらん室に放置した対照では、いずれの場合においても約2週間後より菌の発育が認められた。

第3章 考 案

空気中には体積百分率で約窒素78.10%, 酸素20.93%, アルゴン0.93%, 炭酸ガス0.03%を含有するといわれる。裏辻¹⁰⁾は液体培地上の空気を、ガスボンベにつめた大気で4週間通気することで実験を行ない、著者の実験と同様の薬剤および薬剤作用濃度において、PAS 1 μ g/mlの薬剤作用濃度と薬剤非含有培地の対照にのみ菌の発育を認めたと報告している。

窒素に関しては、著者の実験で約100%の窒素で液体培地上の空気を置換することにより発育阻止効果が認められた。通常の大気の場合、窒素含有量を約78%とすれば窒素濃度が上昇し、ほとんど100%に近い状態では発育阻止効果がみられることになる。海老名⁷⁾はガスの出入に役立つ2つの管を有する約2lのガラスビン中に一定量の菌をロッケマン氏培養液に浮遊させた三角コルベン数個を入れた後、ガラスビンの空気を窒素、炭酸ガスおよび酸素から成る混合ガスで置換することで実験を行ない、人型結核菌には肺胞内ガス組成に近い値が最も発育に適していると報告している。すなわち、空気中に含まれる約78%の窒素は酸素、炭酸ガスが存在する条件下では発育に適していることになる。著者の実験では酸素、炭酸ガスを含まないほとんど100%の窒素を連続的に流入することにより結核菌発育阻止効果を認めた。

炭酸ガスに関しては、戸田¹¹⁾によれば、炭酸ガスは一般に増殖速度に影響し、また少量ではあるがすべての細菌の発育にとって必須であり、特に増殖開始のため必要となると報告している。Corper¹²⁾は14%の炭酸ガス濃度では、空気中よりも結核菌の発育がややよいと報告している。また54%の炭酸ガス濃度までは結核菌の発育を抑制しないと報告している。Guy¹³⁾は0.3%の炭酸ガス濃度より7.5%の炭酸ガス濃度の方が結核菌の発育に適しており、空気中では2.5~7.5%の炭酸ガス濃度は結核菌増殖を促進すると報告している。海老名⁷⁾によれば、人型結核菌で炭酸ガスを含まない場合と含む場合とでは、ほとんど同じ程度に発育するが、5%で最も発育がよく、10%以上では軽度には阻止され、100%では発育しないと報告している。著者の実験ではほとんど100%炭酸ガスを流入することにより結核菌発育阻止効果が認められた。

酸素に関しては、Novy¹⁴⁾によれば、人型結核菌に対する酸素至適濃度は40~50%であると報告している。一方海老名⁷⁾は人型結核菌でその発育に好適な酸素濃度は20%と報告している。裏辻¹⁰⁾の通常の大気通気実験では、

薬剤非含有培地の対照群で菌の発育を認めたこと、約20%の酸素濃度のふらん室内に放置した薬剤非含有培地の対照群で菌の発育を認めたことなどから考慮すると、大気中のガス組成は結核菌の発育に好適と考えられるが、著者の実験ではほとんど100%の酸素流入で結核菌発育阻止効果を認めた。

以上の成績から著者は、使用した実験系が結核菌の発育にとって不利な環境下で化学療法効果を検討する目的に応用しうるものと考えている。

第4章 結 語

抗結核化学療法剤のうち SM, KM, PAS, INH および RFP を、試験管内において、種々の薬剤濃度で作用させながら、液体培地上の空気を窒素、炭酸ガスおよび酸素の、各単独で流入させることによってそれぞれのガスに置換し、2週間、3週間および4週間後に結核菌発育阻止効果を判定し、これらを比較検討した。各薬剤の種類と濃度、ならびに作用期間、各ガスの種類、ならびにガス流入期間のいずれにおいても結核菌の発育を認めなかつた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜つた池田宣昭講師に深甚なる謝意を表する。また終始御協力頂いた研究室の西尾貞子、本間トキエ、細木春世の各氏に心から感謝する。

なお、本論文の要旨は第46回日本結核病学会近畿支部学会で発表した。

文 献

- 1) 馬淵尚克: 慢性結核症に対する化学療法強化の限界に関する実験的研究, 京大結研紀要, 13: 25, 1980.
- 2) 前川暢夫他: 結核菌の発育に不適当な条件と化学療法—I. 培養温度と化学療法剤の効果, 結核, 46: 235, 1971.
- 3) 前川暢夫他: 結核菌の発育に不適当な条件と化学療法—II. INH および SM の抗結核性に及ぼす PAS 前処理の影響, 結核, 46: 293, 1971.
- 4) 前川暢夫他: 結核菌の発育に不適当な条件と化学療法—III. PAS 前処理と INH・PAS 併用効果, 結核, 46: 491, 1971.
- 5) 前川暢夫他: 結核菌の発育に不適当な条件と化学療法—IV. INH と PAS の併用効果, 結核, 47: 1, 1972.
- 6) McDermott, W.: Microbial persistence, Yale J. Biol. and Med., 30: 257, 1958.
- 7) 海老名敏明: 抗酸性菌ノ発育ニ及ボス瓦斯組成ノ影響に就テ, 結核, 15: 514, 1937.
- 8) 東向一郎: 結核菌の Silicone-coated Slide Culture Method (SSC), 京大結研紀要, 7: 増刊1号, 461, 1959.
- 9) 池田宣昭: 結核化学療法剤の毎日投与法と間歇投与法との効果比較に関する試験管内実験的研究, 京大結研紀要, 12: 21, 1963.

- 10) 裏辻康秀: 結核菌の発育に不適當な条件と化学療法, ガス曝露と化学療法剤の効果, 日結研報告, 1974.
- 11) 戸田忠雄: 細菌の生理, 細菌の増殖, 戸田新細菌学, 南山堂, 1979.
- 12) Corper, H. J.: The variability of localization of tuberculosis in the organs of different animals, Am. Rev. Tuberc., 15: 65, 1927.
- 13) Guy, R.: Virulence of the tubercle bacillus, J. Infect. Dis., 94: 99, 1953.
- 14) Novy, F. G.: Microbic respiration, J. Infect. Dis., 36: 168, 1952.