

短 報

抗結核剤の結核菌に対する殺菌作用（試験管内実験）

東 村 道 雄 ・ 水 野 松 司
外 山 春 雄 ・ 一 山 智

国立療養所中部病院

受付 昭和61年12月18日

IN VITRO BACTERICIDAL ACTIVITY OF ANTITUBERCULOSIS AGENTS
ON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Michio TSUKAMURA*, Shoji MIZUNO, Haruo TOYAMA
and Satoshi ICHIYAMA

(Received for publication December 18, 1986)

The bactericidal activity of antituberculosis agents was studied using *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. After exposure to antituberculosis agents in Dubos liquid medium for 24 hours, the order of the bactericidal activity of the agents was as follows: Isoniazid > Rifampicin > Kanamycin > Streptomycin > Enviomycin = Capreomycin > Ofloxacin > Cycloserine > Ethambutol = Ethionamide = p-Aminosalicylate.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*,
Tuberculocidal activity, Antituberculosis
agents

キーワード : 結核菌, 抗結核剤, 殺菌作用

本報では、次の略号を使用した。

Rifampicin: RFP, Isoniazid: INH, Streptomycin: SM, Kanamycin: KM, Enviomycin: EVM, Capreomycin: CPM, Ethambutol: EB, p-Aminosalicylate: PAS, Cycloserine: CS, Ethionamide: TH, Ofloxacin: OX.

結核の治療にたずさわる臨床家が知りたいことは、抗結核剤の治療効果の強さである。これを知るための一つの目安として、試験管内の発育阻止作用と殺菌作用が参考となる。前者の測定は、比較的容易であり、「1%小川培地」で発育阻止濃度の小さい方から示せば次の順序となる¹⁾。INH $\geq$ PAS, > EB > RFP, SM > KM, EVM, CPM, TH, CS。この順序が、臨床効果と必ずしも一致しないことは、一見して明らかである。例えば、

PASは血中濃度が100 μ g/mlに達するのに²⁾、その臨床効果は試験管内発育阻止力に比して明らかに弱い。そこで、我々は試験管内殺菌作用を比較してみるために、本報の実験を行った。

抗結核剤の殺菌作用に関する報告は、まずSMについて行われた^{3)~5)}。PASについては殺菌作用がないとされた²⁾。以後、INH⁶⁾、CS⁷⁾、KM^{8)~10)}、RFP¹¹⁾の殺菌作用が報告されている。EBは、はじめ静菌作用のみと思われていたが、最近になって殺菌作用があるという報告が現われた¹²⁾。以上は試験管内殺菌作用に関する研究であるが、phagocytes中での殺菌作用も検討されている⁶⁾。また、低濃度の抗結核剤中で発育した結核菌が早く死ぬという報告もある¹³⁾。以上は、個々の薬剤の殺菌作用についての報告であるが、2剤以上の

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

強さを比較したものに次の報告がある。Mackness and Smith⁶⁾は、Dubos培地中でも macrophages 中でも、SMは25 $\mu\text{g/ml}$ でINHは0.05 $\mu\text{g/ml}$ で殺菌作用を示したと言い、Mitchison and Selkon¹⁴⁾は、SMは20 $\mu\text{g/ml}$ 、INHは2 $\mu\text{g/ml}$ で殺菌的に作用したと言う。束村・水野¹⁵⁾は、Dubos培地中での殺菌作用の強さは、INH > RFP > SM > Minocyclineの順であったと言う。最近、池田¹⁶⁾は、シリコン被覆スライド法で、Kirchner培地中での殺菌作用の強さは、RFP > INH > SM = KM = EVM > EB > PASの順であったとしている。

今回の実験で、我々は被検株として、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv株を使用し、Dubos液体培地中で抗結核剤と24時間接触させたときの殺菌作用を比較した。H37Rv株を「1%小川培地」で37°C 14日間培養して集落を取り、ガラス玉コルベン中で10分間振盪して均一化し、これをまず10 mg/ml(湿菌量)の割合に0.1% Tween 80水溶液に浮遊させた。この菌液を10分間静置して上半分をとり、Dubos液体培地に加えて2 mg/ml(湿菌量)の菌液とし、10 mlずつ165 × 16.5 mmの試験管に分注した。薬剤は、Dubos液体培地に溶解して1 mlずつ上述の10 mlの菌液に添加し、Fig.1及び2に示す濃度とした。菌液を駒込ピペットで無菌的にパンピングして、37°Cに24時間培養した後、3,000 r.p.m. 20分間遠心して菌を集め、これに0.1%

Tween 80水溶液4 mlを加えて、ピペットでパンピングして菌を洗浄、これを2回繰返した後、菌を4.0 mlの0.1% Tween 80水溶液に浮遊させた。この菌液を同じく0.1% Tween 80水溶液で希釈して10倍希釈列を作り、 10^{-5} に至った。これら $10^0 - 10^{-5}$ の6種の菌液から、渦巻白金耳で0.02 mlのサンプルをとって「1%小川培地」に塗抹接種し、37°C 3週培養後に集落数を数えた。小川培地は1濃度2本を使った。Dubos液体培地は、Difco Bacto Dubos Broth Base (Difco Lab., Detroit, Michigan) 1.3 gを180 mlの蒸留水に溶解し、120°C 20分間滅菌した後、栄研牛血清20 mlを無菌的に添加して作製した。

Dubos液体培地で薬剤と24時間接触させたときの殺菌作用の強さは、大概、次の順序と思われた。INH > RFP > KM > SM > EVM = CPM $\geq$ OX > CS > TH = EB = PAS (Fig.1及び2)。INHは、0.2 $\mu\text{g/ml}$ で作用が認められ、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上では更に強くなった。RFPは5 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、KM, SMは10 $\mu\text{g/ml}$ 以上で比較的強い作用を示した。

殺菌作用は、培地、薬剤との接触時間などにより変化するものと思われる。少し条件は違うが、Dubos液体培地で行った我々の前の実験の順序は、INH > RFP > SMであったから¹⁵⁾、この順序は今回も同じであった。池田¹⁶⁾の成績とは少し違うが、池田の場合は、Kirchner液体培地での長時間作用であるから、実験条

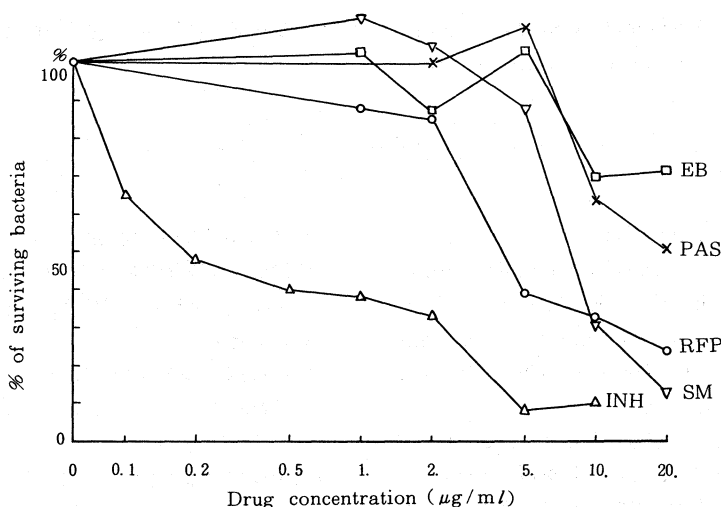


Fig. 1. Bactericidal action of antituberculosis agents. *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (05001) was suspended in Dubos liquid medium (10 ml) containing various concentrations of antituberculosis agents at a concentration of 2 mg wet weight per ml and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, the bacteria were washed twice in a 0.1% Tween 80 solution and counted for their colony-forming bacterial units in Ogawa egg medium.

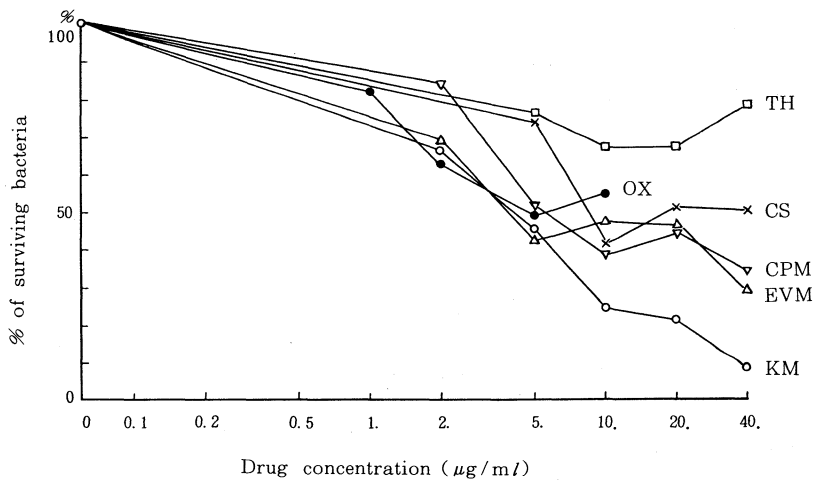


Fig. 2. Bactericidal action of antituberculosis agents. *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (05001) was suspended in Dubos liquid medium (10 ml) containing various concentrations of antituberculosis agents at a concentration of 2 mg wet weight per ml and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, the bacteria were washed twice in a 0.1% Tween 80 solution and counted for their colony-forming bacterial units in Ogawa egg medium.

件が違い、多少違った結果がでて不思議ではない。

文 献

- 1) 東村道雄：肺結核の治療，薬理と治療，12：1515，1984.
- 2) Bogen, E., Loomis, R. N. et al. : Para-aminosalicylic acid treatment of tuberculosis, Am Rev Tuberc, 61 : 226, 1950.
- 3) Smith, D. G. and Waksman, S. A. : Tuberculostatic and tuberculocidal properties of Streptomycin, J Bacteriol, 54 : 253, 1947.
- 4) Garrod, L. P. : The nature of the action of Streptomycin on tubercle bacilli, Am Rev Tuberc, 62 : 582, 1950.
- 5) 東村道雄：結核菌発育環とstreptomycinの殺菌作用との関係について，医学と生物学，22：41，1952.
- 6) Mackaness, G. B. and Smith, N. : The bactericidal action of Isoniazid, Streptomycin, and Terramycin on extracellular and intracellular tubercle bacilli, Am Rev Tuberc 67 : 322, 1953.
- 7) Nitti, V. and Tanzi, P. L. : Sull'attività battericida della cicloserine *in vitro*, Arch Tisiol Mal App Respir, 12 : 42, 1957.
- 8) 金井興美他：Kanamycinの結核菌に対する殺菌効果，殊に Streptomycin, Acriflavine, 8-azaguanine, Na-azide との比較において，日本細菌学雑誌，13：1101，1958.
- 9) 野田 用，東村道雄他：Kanamycinの抗結核菌作用形式について，医学と生物学，49：207，1958.
- 10) Curci, G. and Guidi, V. : Ricerche sperimentali sull'attività antitbc. *in vitro* della Kanamicina, Arch Tisiol Mal App Respir, 13 : 533, 1958.
- 11) Pallanza, R., Arioli, V. et al. : Rifampicin : a new Rifamycin. II. Laboratory studies on the antituberculous activity and preliminary clinical observations, Arzneimittel-Forschung, 17 : 529, 1967.
- 12) Liss, R. H. : Bactericidal activity of Ethambutol against extracellular *Mycobacterium tuberculosis* and bacilli phagocytized by human alveolar macrophages, SA Medical Journal, 62 : 15, 1982.
- 13) Tsukamura, M. and Noda, Y. : Reduction of viability duration of *Mycobacterium tuberculosis* produced by subinhibitory concentrations of antituberculous drugs, J Antibiotics Ser A, 11 : 156, 1958.
- 14) Mitchison, D. A. and Selkon, J. B. : The bactericidal activities of antituberculous

drugs, Am Rev Respir Dis, 74 : 109, 1956.

- 15) 東村道雄他 : Minocycline の抗結核菌作用 (試験管内実験), 結核, 58 : 379, 1983.

- 16) 池田宣昭 : 主要抗結核薬の性能比較に関する試験管内実験的検討, 結核, 61 : 285, 1986.