HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗結核剤のBCG各種酵素及び増殖力に及ぼす影響
Author(s)	山本, 健一
Description	
Citation	結核の研究, 4, 53-61
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26595
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_P53-61.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

抗結核劑の BCG 各種酵素及び増殖力に及ぼす影響

山 本 健 一
（北海道大学結核研究所　予防部）

（昭和 31 年 2 月 29 日受付）

緒　　言

近時結核化学療法の進歩と共に，化学療法剤の作用機転について幾多の研究が重ねられている。殊に最近は Drug-Parasite-Host の 3 者の関係について検討されて来たが，[1)2)] 化学療法剤というからには，とにもかくにも，Drug 対 Parasite の関係を究わめる事が先決問題である。Streptomycin (SM), P-aminosalcylic acid (PAS) 及び Isoniazid (INAH) は専ら結核菌に対して直接作用するものであり，且つその作用機作は結核菌の代謝機構の破壊にあるとされ，従つてこれら薬剤の菌体諸酵素の阻害について研究が行われている。さて in vitro でこれら薬剤の結核菌の増殖力，酵素活性あるいは染色性などに対する作用を追求する場合，菌の発育条件によつて，その作用が異なる。例えばある化学療法剤が殺菌的に作用するといつてもまた静菌的に作用するといつても，その場合の実験条件が問題になることはすでに Dubos[3)] の指適している通りである。そこで化学療法剤の作用を実際に則した条件下で検討するために，これら薬剤を growing の状態にある結核菌に作用させることが行われている。この見地から Barclay[4)] ら Kochweser[5)] らおよび金井[6)] は SM あるいは INAH の結核菌増殖力，Tetrazolium 塩還元作用及び抗酸性染色性の 3 者の中の 1 つあるいは 2 つに対する夫々の影響を検討している。私もまた抗結核剤の作用の一端を明らかにしようと思い，growing の状態にある BCG に SM, PAS あるいは INAH を作用させて，これら薬剤が BCG の酸素消費，乳酸脱水素酵素，Tetrazolium 塩還元作用及びカタラーゼなどの諸酵素に対する作用と増殖に及ぼす影響との関係を追求した。

実 験 方 法

1) 使用化学療法剤：SM（ヂヒドロ硫酸塩—明治），PAS Na 塩（日新），INAH（田辺）．何れも蒸溜水で溶解し，培地あるいは菌浮游液に加えた。

2) 使用菌株：BCG（予研より分与されたもの）及びこの BCG より作つた夫々 SM, PAS, INAH の 100γ/ml 耐性株．

3) 薬剤を菌に作用させる方法：培養中の菌すなわち growing の状態の菌に作用させるには，金井の方法[6)] に従い，次の如く行つた。100 ml の三角コルベンにソートン培地を 30 ml 宛分注。このソートン表面培養に実験によつて定められた培養日数の日に薬剤稀釈水溶液を 1 ml 加え，培地内の薬剤濃度を所定の濃度となるようにした。対照には同量の蒸溜水を加えた。この際，これらの薬剤は菌膜を沈めぬように静かに加えた。そして再び 37°C のフラン器中に入れて培養を続けた。また，キルヒナー 10 % 牛血清加培地使用の際は，培地の量を 50ml として，深部培養の菌に対し同様に行つた。また，一応増殖しない状態と考えられる菌に作用させる場合は，型の如くソートン培養菌膜より水晶玉入りコルベンを用いて手振法で蒸溜水浮游菌液を作り，これを中試験管に 9 ml 宛分注。これに薬剤水溶液 1 ml 宛加えて，菌及び薬剤が所要の濃度となるようにし，約 5°C の氷室で作用させた。

4) BCG 増殖力の測定：定量培養法によつて薬剤接触後の生菌数を対照と比較した。培養中の菌に作用させた場合は，これらのソートン培養コルベンの少くとも 3 本以上を漏斗上に集めて，蒸溜水を充分加えて菌体より薬剤を洗い去り，これから型の如く水晶玉入りコルベンを用い手振法で所要濃度の蒸溜水菌浮游を調製した。その一部から蒸溜水で連続 10 倍稀釈液をつくり，適当な稀釈のものを 0.1 ml 宛小川培地に植え，4 週培養後の集落数を以つて生菌単位とした。

5) 酸素消費の測定：BCG の内呼吸，すなわち基質を加えないものについてワールブルグ検圧計で酸素の消費量を測定した。主室には生菌数の測定に用いた菌液（40 mg/ml）1 ml と燐酸緩衝液（pH 6.9）0.5ml，副室には 10 % KOH 0.5 ml を入れた。酸素消費量は 3 時間値で表わした。

6) 乳酸脱水素酵素，Tetrazolium 還元作用及びカタラーゼの測定：これらは先に報告[7)] した通りの方法で行

つた。すなわち乳酸脱水素酵素測定は上記の菌液を用い 2-6-dichlorphenol-indophenol の褪色時間を Tunberg 管中で乳酸カリを基質として測定し，得られた値（分）の逆数の 100 倍値を以つて示した。Tetrazolium 塩還元作用の測定には，やはり Tunberg 管を用い，0.1 % Triphenoltetrazolium chloride（TTC）が乳酸カリを基質として，菌量 40mg によつて 37°C 恒温槽中 1 時間に還元されて生ずる Formazan をアセトンで抽出し，これを波長 500 mμ のフイルターを用いて比色計で吸光度を測定することによつて行つた。カタラーゼは M/50 H_2O_2 を基質として，37°C 5 分間に菌量 20 mg が分解した残りの H_2O_2 を過マンガン酸カリで滴定して求め，M/50 H_2O_2 の消費量を以つてその活性度とした。

実 験 成 績

実験 I． 増殖中の BCG に対する抗結核剤の作用。

A） ソートン培養菌膜に対する作用

以下実験はすべて培養 9 日目の発育良好な菌について行つた。

i） SM, PAS 及び INAH を夫々 1 mg/ml の割合に作用させた場合。

作用 6，24，48 時間後の BCG の収量（湿量），酸素消費量，TTC 還元能，カタラーゼ及び生菌数を検べた。

第 1 表 ソートン培地培養 9 日目の発育中の BCG に抗結核剤を作用せしめた場合の諸酵素及び生菌数に及ぼす影響

薬剤		薬剤作用 6 時間	24 時間	48 時間
對照（蒸溜水添加）	BCG 収量	240mg	350	345
	O_2-upatke*	58.9qmm	371	51.8
	TTC 還元能	0.53	0.42	0.43
	カタラーゼ	8.5cc	7.5	6.8
	生菌数	30×10^6	12×10^6	22×10^6
INAH 1mg/cc	収量	225	270	250
	O_2-uptake	73.3	59.2	6.5
	TTC 還元能	0.70	0.32	0.11
	カタラーゼ	6.2	3.3	2.2
	生菌数	25×10^6	97×10^5	5×10^5
SM 1mg/cc	収量	210	205	190
	O_2-uptake	55.4	61.8	46.1
	TTC 還元能	0.62	0.40	0.34
	カタラーゼ	5.9	5.9	5.5
	生菌数	23×10^5	7×10^3	6×10
PAS 1mg/cc	収量	355	245	270
	O_2-uptake	67.1	55.2	41.4
	TTC 還元能	0.62	0.53	0.43
	カタラーゼ	8.5	8.7	6.8
	生菌数	38×10^6	26×10^6	17×10^6

* O_2-uptake は 2 時間値.

成績は第 1 表に示してある通り各薬剤とも菌の増殖を阻止した。すなわち菌の収量の増加は見られなかつた。一方，SM は菌の増殖力を著しく低下せしめた。すなわち 48 時間では対照の $\frac{1}{100,000}$ 以下の生菌数となつた。またＴＴＣ還元能をも低下せしめた。INAH では 48 後間後では酸素消費は抑制され，カタラーゼ及びＴＴＣ還元能が低下した。しかし生菌数の減少は 1/50 程度に止つた。また，PAS は 48 時間の作用では，酸素及び増殖力に見るべき低下を来たさなかつた。

ii） SM の濃度を 1，10，100 γ/ml として作用させた場合。

第 2 表 ソートン培養中（9 日目）の BCG に及ぼす SM の作用：その増殖力と諸酵素に及ぼす影響

濃度		SM 作用時間 6	24	48
對照（蒸溜水添加）	O_2-uptake	56.9qmm	42.6	41.7
	TTC 還元能	0.62	0.34	0.42
	乳酸脱水素酵素	25	33	15
	カタラーゼ	4.6cc	4.2	4.4
	生菌数	22×10^6	11×10^6	12×10^6
SM 1γ/cc	O_2-uptake	50.4	32.5	44.5
	TTC 還元能	0.68	0.23	0.42
	乳酸脱水素酵素	25	17	20
	カタラーゼ	4.4	3.1	4.1
	生菌数	5×10^6	73×10^4	23×10^5
SM 1γ/cc	O_2-uptake	50.4	45.6	55.2
	TTC 還元能	0.68	0.26	0.33
	乳酸脱水素酵素	25	18	13
	カタラーゼ	4.4	4.8	4.0
	生菌数	9×10^6	28×10^4	23×10^4
SM 100γ/cc	O_2-uptake	42.8	38.2	47.5
	TTC 還元能	0.75	0.23	0.26
	乳酸脱水素酵素	25	14	11
	カタラーゼ	5.5	4.6	2.7
	生菌数	8×10^6	44×10^3	49×10^5

前実験と同様に 6，24，48 時間後に夫々の作用を検べた。成績を第2表に示した。1γ/ml の作用には殆んど見るべきものはないが，24 時間以後に生菌数はやや減少した。100γ/ml の作用では，特に作用時間 24 時間以後において TTC 還元能及び生菌数がかなり減少した。100γ/ml の場合にも同様に TTC 還元能及び生菌数の減少が見られた。すなわち以上の成績から，SM はその濃度に平行して BCG の TTC 還元能と増殖力を減弱せしめることが分つた。

iii) PAS 濃度を 10，100，1000γ/ml として，作用時間を1，3，5日とした場合。

第3表：Sauton 培養（8日目）中の BCG の諸酵素及び増殖力に對する PAS の作用

濃度		PAS 作用時間 1日	3日	5日
對照（蒸溜水添加）	O_2-uptake	43.7qmm	69.1	33.5
	TTC 還元能	0.50	0.62	0.40
	乳酸脱水素酵素	29	22	25
	カタラーゼ	4.5	4.8	3.8
	生菌数	13×10^6	39×10^6	63×10^5
PAS 10γ/cc	O_2-uptake	56.8	39.4	15.1
	TTC 還元能	0.60	0.58	0.23
	乳酸脱水素酵素	50	20	18
	カタラーゼ	7.0	6.3	5.6
	生菌数	10×10^6	13×10^6	45×10^5
PAS 100γ/cc	O_2-uptake	38.5	47.0	7.7
	TTC 還元能	0.44	0.62	0.22
	乳酸脱水素酵素	40	22	20
	カタラーゼ	4.6	7.7	4.6
	生菌数	9×10^6	11×10^6	17×10^5
PAS 1,000γ/cc	O_2-uptake	63.4	53.0	22.3
	TTC 還元能	0.54	0.40	0.25
	乳酸脱水素酵素	33	18	29
	カタラーゼ	7.0	6.0	5.2
	生菌数	12×10^6	10×10^6	14×10^5

表3に示したのがその成績である。これによると，3日目までは著しい作用は見られず，5日目で酸素消費及び TTC 還元能は各濃度の作用において減弱した。但し SM あるいは INAH の場合と異なつて生菌数の減少は僅かに見られたに過ぎなかつた。

iv) INAH の濃度を1，10，100γ/ml とし作用時間を1，3，5日間とした場合。

成績は第4表に示した。全濃度において酸素消費は1日目では対照に比してやや昂進するが，3日以後かなり減弱し5日では殆んど抑制された。TTC 還元能は1γ/ml 作用の場合を除き1日目から低下し3日目以後各濃度とも甚だ減弱した。カタラーゼは 100γ/ml の作用では1日目から減弱した。5日目では各濃度の作用とも減弱し，100γ/ml 作用によつて殆んどその活性を失つた。乳酸脱水素酵素の活性も INAH の全濃度において一様に3日目より低下して，5日目では全く減弱するのが見られた。増殖力は作用時間1日では 100γ/ml の濃度ですら殆んど作用を受けなかつたのは第1回目の実験成績と同じで，3日目より低下し，5日目では生菌数は INAH の作用濃度によつて著しい差異はなく，約 $\frac{1}{1,000}$ に減少した。

第4表：Sauton 培養（9日目）中の BCG の諸酵素及び増殖力に対する INAH の作用

濃度		INAH 作用時間 1日	3日	5日
對照（蒸溜水添加）	O_2-uptake	70.9qmm	54.2	54.2
	TTC 還元能	0.72	0.52	0.28
	乳酸脱水素酵素	17	20	17
	カタラーゼ	5.2cc	3.0	2.5
	生菌数	34×10^6	23×10^6	81×10^5
INAH 1γ/cc	O_2-uptake	100.6		6.8
	TTC 還元能	0.74	0.08	0.02
	乳酸脱水素酵素	22	2.5	0.7
	カタラーゼ	6.0	3.7	1.5
	生菌数	36×10^6	37×10^4	23×10^2
INAH 10γ/cc	O_2-uptake	89.0	10.2	2.5
	TTC 還元能	0.53	0.18	0.05
	乳酸脱水素酵素	20	5.5	0.8
	カタラーゼ	4.0	3.8	0.5
	生菌数	21×10^6	43×10^5	18×10^3
INAH 100γ/cc	O_2-uptake	102.5	41.0	2.8
	TTC 還元能	0.52	0.28	0.04
	乳酸脱水素酵素	18	13	0.9
	カタラーゼ	3.3	2.1	0.1
	生菌数	22×10^6	34×10^5	89×10^2

B) キルヒナー培地に増殖中の菌に各抗結核剤を作用させた場合。

ソートン培養の代りにキルヒナー培地を用いて深部培養の菌に対する各薬剤の作用を上述と同様な方法によつて検した。使用した菌は培養日数17日目のものである。

i) SM, INAH 及び PAS の濃度夫々 1 mg/ml[-1]，作用時間各々6，24，48時間における各酵素作用と増殖力。

第5表：Kirchner 培養（17日目）中の BCG の諸酵素及び増殖力に対する SM. INAH 及び PAS の作用

薬剤		作用時間 6	24	48
對照（蒸溜水添加）	O_2-uptake	57.9qmm	49.8	72.1
	TTC 還元能	0.65	0.52	0.70
	乳酸	25	14	20
	脱水素酵素	7.4	6.2	6.0
	カタラーゼ	35×10⁶	31×10⁶	49×10⁶
	生菌数			
SM 1 mg/cc	O_2-uptake	42.8	32.3	37.1
	TTC 還元能	0.61	0.43	0.34
	乳酸	22	15	16
	脱水素酵素	6.1	3.8	4.0
	カタラーゼ	45×10⁵	30×10⁴	9×10⁴
	生菌数			
INAH 1 mg/cc	O_2-uptake	46.1	51.6	47.9
	TTC 還元能	0.43	0.45	0.16
	乳酸	18	20	25
	脱水素酵素	3.1	2.7	3.1
	カタラーゼ	24×10⁶	20×10⁶	10×10⁵
	生菌数			
PAS 1 mg/cc	O_2-uptake	44.9	43.2	48.2
	TTC 還元能	0.56	0.57	0.53
	乳酸	20	16	13
	脱水素酵素	6.8	6.4	6.2
	カタラーゼ	48×10⁶	31×10⁶	51×10⁶
	生菌数			

成績は第5表に示した。前の実験でソートン培養の菌に対するこれら薬剤の諸作用に同様なことが見られ，すなわち，TTC 還元能及びカタラーゼ作用は SM と INAH の作用時間が長くなると共に低下し，特に INAH はすでに6時間目よりカタラーゼを減弱させた。また，PAS には何ら認むべき作用は見られない事もわかつた。ところがキルヒナー培地培養菌においてはソートン培地の場合と異つて SM の増殖力に対する作用がやや異つていた。すなわちキルヒナー培地培養に作用させた場合，生菌数は 48 時間作用で $\frac{1}{100}$ 程度低下したに過ぎない。

ii） SM の濃度各々 10，100，1000 γ/ml，作用時間各々6，24，48 時間の場合。

成績は第6表に示した。SM の作用濃度による差異は余り認められず，すなわち TTC 還元能，カタラーゼ活性及び増殖力は一様に低下した。

第6表：Kivchner 培地（17日目）中の BCG の諸酵素及び増殖力に對する種々の濃度の SM の作用

SM 濃度		作用時間 6	24	48
對照（蒸溜水添加）	O_2-uptake	54.9gmm	46.5	46.7
	TTC 還元能	0.63	0.61	0.60
	乳酸	25	22	25
	脱水素酵素	8.3 cc	8.6	7.1
	カタラーゼ	50×10⁶	40×10⁶	45×10⁶
	生菌数			
SM 10 γ/cc	O_2-uptake	53.3	32.0	22.9
	TTC 還元能	0.53	0.28	0.16
	乳酸	18	17	14
	脱水素酵素	8.0	4.9	4.2
	カタラーゼ	25×10⁶	15×10⁵	34×10⁴
	生菌数			
SM 100 γ/cc	O_2-uptake	42.1	42.1	27.2
	TTC 還元能	0.46	0.37	0.22
	乳酸	13	20	17
	脱水素酵素	7.5	5.0	3.8
	カタラーゼ	14×10⁶	42×10⁴	23×10⁴
	生菌数			
SM 1000γ/cc	O_2-uptake	43.8	46.2	32.4
	TTC 還元能	0.41	0.39	0.27
	乳酸	11	18	20
	脱水素酵素	7.1	2.4	4.1
	カタラーゼ	28×10⁵	20×10⁴	17×10⁴
	生菌数			

iii） INAH 濃度1，10，100 γ/ml，作用時間 24，時間の場合。

成績は第7表に示した。この場合はソートン培地培養菌の場合と顕著な差異は見られず，すなわち TTC 還元能，カタラーゼ作用は 72 時間目に各濃度において低下した。しかし，作用 72 時間でも殆んど生菌数の減少は見ら

第7表：Kirchner 培地（16日目）中の BCG の諸酵素及び増殖力に對する種々な濃度の INAH の作用

INAH 濃度		作用時間 24	48	72
對照（蒸溜水添加）	O_2-uptake	48.8qmm	29.5	32.5
	TTC 還元能	0.60	0.34	0.38
	乳酸	22	18	20
	脱水素酵素	7.3 cc	7.9	7.4
	カタラーゼ	52×10⁶	20×10⁵	23×10⁶
	生菌数			
INAH 1 γ/cc	O_2-uptake	43.6	32.5	11.1
	TTC 還元能	0.56	0.27	0.15
	乳酸	20	20	8
	脱水素酵素	7.0	7.2	
	カタラーゼ	50×10⁶	21×10⁵	10×10⁶
	生菌数			

INAH 10 γ/cc	O_2-uptake	41.3	24.6	23.7
	TTC 還元能	0.36	0.20	0.24
	乳酸脱水素酵素	17	18	14
	カタラーゼ	6.2	7.1	5.7
	生菌数	39×10^6	20×10^6	17×10^6
INAH 100γ/cc	O_2-uptake	56.9	39.1	28.9
	TTC 還元能	0.72	0.31	0.27
	乳酸脱水素酵素	60	25	20
	カタラーゼ	7.1	5.3	4.0
	生菌数	67×10^6	37×10^6	13×10^6

れなかつた。

II. 蒸溜水菌浮游液に抗結核剤を作用させた場合。

増殖していないと考えられる BCG に対して SM, PAS, INAH を夫々 1 mg/ml の割合で作用させた場合の諸酵素及び増殖力に及ぼす影響を検討した。作用させる温度は氷室内の 5°C 前後とし，24，48 時間目にとり出し，対照及び夫々 3 つの薬剤を作用させた菌液を同一条件で蒸

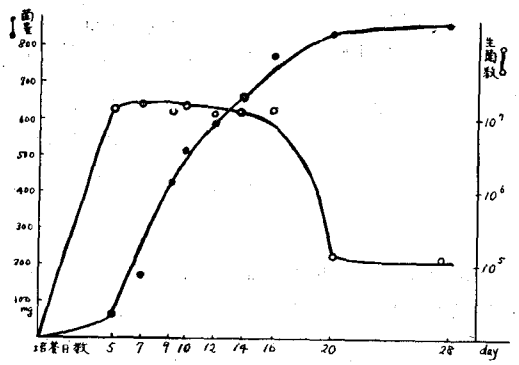
第8表：BCG 蒸溜水浮游液に SM, PAS INAH を氷室で作用させた場合の諸酵素及び増殖力に及ぼす影響

薬剤		作用時間 24	48
對照	O_2-uptake	40.0qmm	48.2
	TTC 還元能	0.36	0.33
	乳酸脱水素酵素	12	10
	カタラーゼ	2.0 cc	2.3
	生菌数	32×10^6	15×10^6
SM 1 mg/cc	O_2-uptake	36.6	42.7
	TTC 還元能	0.23	0.47
	乳酸脱水素酵素	18	17
	カタラーゼ	2.0	1.9
	生菌数	68×10^5	61×10^5
PAS 1 mg/cc	O_2-uptake	34.8	34.8
	TTC 還元能	0.24	0.25
	乳酸脱水素酵素	10	8
	カタラーゼ	2.0	1.5
	生菌数	43×10^6	20×10^6
INAH 1 mg/cc	O_2-uptake	37.6	39.3
	TTC 還元能	0.20	0.23
	乳酸脱水素酵素	10	9
	カタラーゼ	2.0	2.0
	生菌数	34×10^6	17×10^1

溜水を用い 3 回遠沈洗滌して薬剤を洗い去つた。洗滌後，蒸溜水に再浮游させて略々 20 mg/ml の菌液として実験に供した。成績は第 8 表に示した。growing の状態にある菌に作用させた場合と全く異なつて，SM の作用によつて生菌数はさほど減少しなかつた。また，SM 及び INAH の作用によつて TTC 還元能及びカタラーゼ活性は低下もなかつた。すなわち薬剤作用は条件によつて著しく異ることが明らかとなつた。

III. ソートン培地及びキルヒナー培地上の発育日数と SM, PAS 及び INAH の作用との関係。

ソートンあるいはキルヒナー培地培養の BCG に一応発育曲線を考えて，対数期あるいは定常期のある点で各薬剤を作用させ，その効果が培養の時期によつてどのように異なるかを検べた。先ず 30 ml 宛のソートン培地を分注した容量 100 ml の三角コルベンに BCG を一白金耳宛植え，培養 5 日目から日を追つて，少くとも 5 本以上のコルベンから菌膜をとつて菌収量（半湿菌量）と半湿菌量 1 mg 当りの生菌数をしらべた。これを第 1 図に示した。この図に示されているように生菌数の最も多い対数期のはじめと



第1図 Sauton 培地における BCG の菌収量と生菌数の関係

中ごろ及び生菌数の減少し始める終りころに当る夫々 5，9，19 日目と定常期で生菌数の低下した 28 日目の BCG 培養に夫々 SM を 1 mg/ml の割合に作用させ 48 時間後に判定した。実験成績は第 9 表に示した如く，対数期の初めころの 5 日目の菌に SM を作用させた場合，各酵素作用と増殖力の減弱が最も大きかつた。また，9 日目の菌においても同様な傾向が見られた事から，生菌数の最も多い時期，すなわち菌の分裂の旺盛な時期に SM が強く作用することがわかつた。

次に予備実験として，先ずキルヒナー培養の BCG について培養日数を追つてその生菌数を求めた（第 10 表）。そこで生菌数の多い発育旺盛な時期として 17，24 日目，次いでやや生生菌数の低下し始める 38，59 日目において

第 9 表 ： Sauton 培養 BCG の培養日数と SM の諸酵素及び増殖力に對する作用との関係 （作用時間は 48 時間）

実験＼培養日数	5 日		9 日		19 日		28 日	
	SM 1 mg/cc	對照	SM 1 mg/cc	對照	SM 1 mg/cc	對照	SM 1 mg/cc	對照
乳酸脱水素酵素	8	10	9	10	10	9	8	6
TTC 還元能	0.16	0.35	0.25	0.35	0.07	0.09	0.07	0.08
カタラーゼ	3.5 cc	6.3	4.4	4.9	0.2	0.2	0	0
生菌数	3×10	11×10^6	11×10	10×10^6	40×10	20×10^3	20×10	12×10^3

第 10 表

Kirchner 培養 BCG の培養日数と増殖力との関係

培養日数	生菌数
15	59×10^6
20	65×10^6
25	24×10^6
31	30×10^6
36	24×10^5
41	13×10^5
60	3×10^5

ソートン培地培養菌の場合と同様にしてSMの作用を検べて得られた成績が第11表である。この場合もやはり，生菌数の多い分裂の旺な時期すなわち，17，24 日目，特に 17 日目で酸素消費，各酵素作用及び生菌数の減少が著しかつた。培養が古くなるとSMによる酵素作用の低下は殆んど見られなくなつた。なおSMを作用させた菌についてSM耐性を検べたが，耐性を得たものは全く存在しなかつた。

Ⅳ. 抗結核剤を夫々の耐性菌に作用させた場合。

上記の実験で見られた SM あるいは INAH の酵素作用の阻害が特異的であるかどうかを一応確めるため，夫々の耐性菌について検べた。BCG R-SM のソートン培養9日目の菌膜に SM を 100 γ/1m ℓ の割合に作用させ，24，48 時間後に得た成績が第 12 表である。この表に見られるように，TTC 還元能，カタラーゼ及び生菌数の減少は当然の事ながら見られなかつた。しかし，酸素消費は SM によつて抑制された。

第 11 表 Krchner 培養 BCG の培養日数と SM の諸酵素及び増殖力に對する作用 （SM 1 mg/cc 作用時間 48 時間）

培養日数	17 日		24 日		38 日		59 日	
	對照	SM	對照	SM	對照	SM	對照	SM
O_2-uptake	34:3qmm	20.3	52.4	45.7	11.5	12.8	2.6	2.5
乳酸脱水素酵素	17	8	17	14	12	17	5	3
TTC 還元能	0.52	0.27	0.53	0.4	0.29	0.37	0.11	0.09
カタラーゼ	7.4 cc	4.3	5.7	3.8	6.0	4.7	0.5	0.2
生菌数	38×10^6	62×10^3	52×10^6	23×10^4	42×10^5	39×10^3	11×10^5	10×10^2

第 12 表：Sauton 培養中（9日目）の BCG SM-R に SM を作用させた場合の諸酵素と増殖力の影響

作用時間	24 時間		48 時間	
	對照 qmm	SM 100γ/cc	對照	SM 100γ/cc
O_2-uptake	75.9	64.3	73.3	48.5
乳酸脱水素酵素	40	40	40	40
TTC 還元能	0.50	0.48	0.50	0.45
カタラーゼ	6.8 cc	6.8	5.2	4.7
生菌数	30×10^6	27×10^6	15×10^6	15×10^6

第 13 表：Sauton 培養中（9日目）の BCG PAS-R に PAS を作用させた場合

作用時間	24 時間		72 時間	
	對照	PAS 100γ/cc	對照	PAS 100γ/cc
O_2-uptake	50.9	36.4	43.1	23.3
乳酸脱水素酵素	33	40	50	50
TTC 還元能	0.48	0.45		
カタラーゼ	7.0	6.0	5.5	4.2
生菌数	49×10^6	27×10^6	15×10^6	9×10^6

第 14 表：Kirchner 培養中（21 日目）の BCG INAH-R に INAH を作用させた場合

作用日数	3 日		7 日	
	對照	INAH 100γ/cc	對照	INAH 100 γ/cc
O_2-uptake	59.0	63.1	49.1	32.5
乳酸脱水素酵素	13	13	8	7
TTC 還元能	0.36	0.36	0.31	0.19
カタラーゼ	0	0	0	0
生菌数	7×10^6	9×10^6	33×10^5	20×10^5

同様にして，BCG R-PAS のソートン培養 9 日目のものに PAS 100γ/ml の割合に作用させた結果は第 13 表に示す如く，72 時間で酸素消費の低下が見られた他は対照との間に著しい差はなかつた。

更に，BCG R-INAH はソートン培地では発育が良好でないので，キルヒナー培地に培養し，培養 21 日目に INAH を 100γ/m の割合に作用させ，3，7 日後に得られた成績を第 14 表に示した。7 日目では酸素消費，TTC 還元能及び生菌数の減少が僅かに見られるが，BCG の INAH 感受性菌に作用させた場合に比較して減弱の程度は遙かに小さかつた。

総括並に考按

SM, PAS, INAH の BCG の酸素消費，TTC 還元能，乳酸脱水素酵素，カタラーゼ及び増殖力に及ぼす作用を追究して，それら抗結核剤の結核菌に対する作用機作の一部を明らかにしようと試みた。

従来，抗結核剤の抗菌力を検べる場合，薬剤含有培地に菌浮游液を接種して，その発育阻止を観察している。かかる場合の菌は一応発育停止の状態で薬剤に接触せしめられるので，結核感染動物に化学療法を行う場合のように，体内で増殖しつつある菌に薬剤を作用させる場合とは異なるわけである。実際的問題として，in vitro あるいは in vivo において抗結核剤の作用を比較する場合は菌対薬剤の関係に充分考慮をはらうべきである。そこで，我々の in vitro の実験でも，増殖の状態にある菌は薬剤を作用させたところ，従来一般に行われている謂わば静止菌を以つてする方法とは異つた成績が得られた。この辺にある 1 つの抗結核剤が殺菌的だとか，あるいは静菌的だとかの議論が分れる一因があるように思われる。事実，我々の実験において，増殖の状態にある BCG に SM，PAS および INAH を各々作用させた場合は SM の菌増殖力阻止作用は他の 2 者に比して極めて顕著に見られたが，これら薬剤を静止菌に作用させた場合は，SM のこの菌増殖力阻止作用はみられず，他の 2 者と同様殆んど阻止作用を示さなかつた。増殖中の菌に対する SM の顕著な増殖力阻止作用の機作として，Linz[8] の指適せる如く，この場合菌体に固着した SM が洗滌により全部が洗い去られずに，定量培養操作中，培地に移されるとも考えられるが，我々の実験成績では高い稀釈度と低い稀釈の培養において，SM の濃度に比例するようなコロニー数の出現が見られなかつたので，そのような考え方は一応否定されると思う。否，逆に SM が他の抗結核剤に比べて増殖中の菌体に固着する力が強いため抗菌作用が大きいとも考えられる。

さて，各薬剤の作用濃度を 1，10，100あるいは 1,000 γ/ml とした場合，作用後の生菌数は SM の場合濃度と略々平行して現われたが，PAS 及び INAH では作用後 5 日まで観察したが平行的な関係は見られなかつた。但し，INAH の場合各濃度を通じて一様にかなりの生菌数の減少が見られたが，PAS では影響が余り見られなかつた。以上は静止菌を以つてする通常の薬剤抗菌試験によつて得られる結果からは考えられないことで，薬剤の抗菌作用を云々する場合一考を要する点であろう。

増殖菌に対する SM の増殖力阻止作用は，その菌の増殖の程度に左右されることは，金井[9] によつてすでに示されているが，我々の実験成績もこの知見に一致した。すなわち培養日数を追つて求めた菌増殖の程度（菌の収量）とその生菌数との曲線（第 1 図）に基いて，生菌数の多い対数期の初めころの培養 5 日目と中ころの 9 日目，更に生菌数の減少した終りころの19 日目，定常期で生菌数の少い 28 日目について夫々 SM の作用を見たが，やはり分裂の旺盛な培養 5 日及び 9 日目の菌が SM の作用を強く受けることがわかつた。INAH も鳥型菌に対して同様の傾向の殺菌作用を有することを鈴木[10] らは報告している。

以上はソートン培地培養菌についての実験であるが，キルヒナー培地培養菌でも同様な傾向が見られたが，その程度は弱かつた。この差異は深部培養菌と表面培養菌に対する薬剤の作用様式が異なるためか，あるいはキルヒナー培地成分中に存在する血清に基くことも考えられるが，我々の実験においては第 1 図及び第 10 表に示してある通り，キルヒナー培地にでは，BCG の増殖はソートン培地より緩慢であること，すなわちキルヒナー培地にでは菌の分裂回数が少いことが SM 作用を低下させる主因と考えられる。

抗結核剤の作用機作の研究の焦点は菌の酵素に対する薬剤の阻害攪乱である。本実験も一応この線に沿つて行つたが，SM は菌の TTC 還元能及びカタラーゼ活性を低下し，INAH は乳酸脱水素酵素，カタラーゼ，TTC 還元能及び酸素消費を著しく抑制し，PAS は長時間の作用ではじめて TTC 還元能及び酸素消費を低下する事が分つた。

次にこの点に関し先人の業績を見ると，Corper[1]はSMはTTC還元能を抑制せずといい，金井[5]，Koch-Weser[5]は抑制を認めている。またAronson[12]によればINAHは菌のNeo-tetrazolium還元能に作用しないという。酸素消費については，鈴木[13]，辻[14]，笹谷[15]，Aronson[12]，緒方[16]らはSM及びINAHに阻害作用のあることを認めている。カタラーゼについては，酒井[17]，Aronson[12]らはINAHに阻害作用のある事を報告し，乳酸脱水素酵素については，北本ら[18]，北村[19]によるとSMに阻害作用があるといい，また，山本[20]はINAHにも阻害作用のある事を認めている。

このように先人の実験成績は我々の実病成績と異なる点があるが，これは実験条件の差異によると思われるが，いづれにせよSMあるいはINAHがこれら結核菌のエネルギー代謝に関与する酵素系にかなりの影響を及ぼすことは確かである。

さて，次にかかる酵素系の阻害と増殖力の低下とをどの様に関連ずけるかが問題であろう。この点に関し金井[6]はTTC還元能と増殖力の間には直接的な関連性はないとしている。Koch-Weser[5]はSM及びINAHの結核菌の増殖及びTTC還元能に対する作用を研究し，両薬剤はいずれもTTC還元能を低下させるが，増殖力については，SMは菌をdormantの状態にし，INAHは殺菌的に働くとして，菌増殖力とTTC還元能の間に直接的な関係をつけていない。Dubos[21]もまたTTC還元能その他の色素還元能，酸素消費などの代謝能を菌の増殖力の指標とすることは不可能であると述べ，またこの事は増殖し得ない菌の中にも還元力を有するものもあれば，逆にその必須代謝物を使い尽して殆んど還元能を欠如して休止状態にある菌も再び適当な環境条件に置かれると増殖が可能となるような例は細菌の領域では，ごく普通であることからも肯首されようといつている。これらを考え合せ，また本実験で示されたようにSM，INAHの酵素不活性化の程度と菌増殖力の低下とは必ずしも平行しない事実から考えると，両者の間に直接的関連性があると考えるわけには行かないであろう。

さて，すでに述べた抗結核剤の感受性菌の酵素活性及び増殖力に対する作用は，耐性菌に対しては当然のことながら認められなかつた。しかし作用時間が長くなると，耐性菌に対しても若干の作用があらわれた。Lenore[22]らの実験でINAHの高濃度に含まれる培地で生えたコロニーを形成する個々の菌の多くは部分耐性かまたは感受性を再び獲得して不完全なINAH耐性となる可能性が示唆されているが，やはり本実験に使用した耐性菌も耐性が均一でなかつたため，このような成績が得られたものと考えられる。しかし結核菌のTTC還元能，カタラーゼあるいは増殖力などがSMあるいはINAHによつて受ける影響は感受性菌と耐性菌によつて明らかに差異が認められる。この事は山村[23]のいう抗結核剤の作用機作を説明するに必要な条件の1つを充すものであろう。

結　論

BCGの酸素消費，カタラーゼ，乳酸脱水素酵素，TTC還元能及び増殖力に対するSM，PAS，INAHの作用を菌の増殖している状態と休止の状態で観察し次の結果を得た。

1) ソートン培地に増殖中のBCGに対し，SMはINAHよりはるかにすぐれた増殖力阻止作用を表わす。しかし両薬剤はいずれもTTC還元能，カタラーゼ活性を減弱させる。また，INAHは酸素消費及び乳酸脱水素酵素をも阻害する。PAS'には殆んどそのような作用は見られない。

2) 薬剤濃度による作用の差はSMにおいてのみ見られ，INAHにおいては余り見られない。

3) キルヒナー培養でもソートン培養におけると同様な傾向が見られるが，各薬剤とも菌増殖力に対する作用が小さい。

4) SMのBCGに対する作用は菌の分裂の旺な状態において強い。

5) 酵素阻害と増殖力の低下とは直接的な関連が認められない。

6) 各薬剤耐性菌に対する夫々の薬剤の作用は殆んどないことから，上述の作用は特異的であると考えられる。

稿を終るに当り，高橋教授の御指導，御校閲に深謝する。また，種々御助言を戴いた有馬助教授に深謝する。

文　献

1) Hart, P. D: Brit. Med. J. 2, 4891, 1954.
3) 伊藤政一，他：日本医事新誌，1516, 6, 昭29.
3) Dubos, R. J.: The Bacterial cell, Harvard University Press, 289, 1949.
4) Barclay, W. R et al.: Amer. Rev. Tuberc., 67, 490, 1953.
5) Koch-Weser, D. et al: Amer. Rev. Tuberc., 71, 556, 1955.
6) 金井興美：日本細菌学雑誌，9, 181, 昭29.
7) 有馬　純，他：結核の研究，第2集，51, 昭30.
8) Linz, R: Ann. de l'institut Pasteur, 85, 295, 1953.
9) 金井興美：日本細菌学雑誌，10, 177, 昭30.

10) 鈴木鎌三郎，東村道雄：結核，30，567，昭30.
11) Corper, H. J & Tawe, V.D.,: Amer. Rev. Tuberc 65, 722, 1952.
12) Arcnson, J. D. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 80, 259, 1952.
13) 鈴木尚夫：抗研誌., 9, 213, 昭28.
14) 辻　光二：金大結研年報，12一上，41，昭29.
15) 笹谷繁男：同上誌，11一下，31，昭28.
16) 緒方正忠：医学研究，25，1493，昭30.
17) 酒井　望：結核，29，237，昭29.
18) 北本　治，他：結核，24，242，昭24.
19) 北村正夫：抗研誌., 6，191，昭25.
20) 山本　実：結核，29，195，昭25.
21) Dubos, R. J: Amer. Rev. Tuberc., 67, 874, 1953.
22) Lenore, R. et al.: Amer. Rev. Tuberc., 69, 1022, 1954.
23) 山村雄一：結核菌の生化学，共立出版社，(東京)，昭 30.