

抗結核剤の結核菌に対する影響の

マウスにおける実験的研究

名古屋大学医学部内科第一講座（主任 日比野進）

安 田 正 憲

（受付 昭和 29 年 10 月 5 日）

ま え が き

結核菌の化学療法剤に対する耐性獲得の問題は、近時目覚ましい進展を示した結核の化学療法に常に暗影をなげかけ、従つてこの耐性阻止の問題はここ数年間結核研究者にとつては焦眉の課題としていくたの研究が既に或いは現に行われているが、抗結核剤同志の併用方法が試験管内或いは臨牀実験で一応耐性菌の出現を遅延乃至阻止できることを認められている。しかしその遅延乃至阻止の程度或いは機序の追求に対して動物実験においては未だ充分には吟味されていない現状である。

一方、抗結核剤の効力判定にはマウスを使用することが有利であるとされ、この点に関して古くより内外の研究者によつて業績が発表されているが、特に Raleigh 及び Youmans¹⁾ によつて詳細にマウス結核症の様相が報告され、抗結核剤の動物実験にマウスを用いることの種々の利点を強調している。本邦においては、さきに岩崎等²⁾の報告があり、最近水之江³⁾⁴⁾が数次にわたつてマウス結核症の基礎的研究を発表し、共にマウス結核症が抗結核剤の動物実験に利用され得ることを述べている。

更に実験的結核症における、抗結核剤に対する結核菌の耐性発現については、さきに Williston と Youmans⁵⁾⁶⁾の研究があり、Streptomycin (以下 SM) を毎日 1500 r 宛 155 日間結核菌感染マウスに単独投与を行つた結果、SM 耐性株を認むるに至つたマウスが 89.4% にみられ、又 SM に p-aminosalicylic acid (以下 PAS) を併用して 183 日間治療を行つた場合に PAS は SM 耐性菌の出現を何等阻止できなかつたと報告している。又最近、Wolinsky 等⁷⁾は同じく SM, PAS で治療を行つた動物について耐性菌発現の様相をみているが、H₃₇R_v 株感染マウスの実験では SM 及び PAS を各々単独で 198 日間治療を行つていずれも耐性菌発現が認められず、又三種の人型結核菌を用いての 154 日間の SM 及び PAS による治療においても SM 耐性菌の認められたマウスは 54 匹中 3 匹にすぎず、しかも PAS を SM に併用しても SM 耐性菌発現阻止に効果的でなかつたといつている。

私は、マウス結核症において、耐性菌発現の様相とこ

れが阻止に関する検討を行つた。すなわち、SM, PAS 及び isonicotinic acid hydrazide (以下 INAH) のそれぞれの単独使用及びこれ等の併用による比較実験を、長期間同じ動物に薬剤を投与した場合と、短期間治療の後屠殺して肺から分離した菌を次のマウスに接種感染せしめ更に治療をくりかえし、次々に継代を行つた場合について観察した。以下その実験成績についてのべると共に、長期間同じ動物に薬剤を投与した場合の肺の病理組織学的所見についても併せてここに報告しておきたい。

実 験 方 法

体重約 20 g の市販の雑種のマウスを使用した。有毒人型結核菌 F 株の 3 週間培養を乳鉢内で 5% ゲラチン生理的食塩水に均等に浮遊せしめ、その 0.1 cc (菌 1.0 mg 含有) をマウスの尾静脈内に注入感染せしめた。接種翌日より毎日 1 回、SM, PAS 及び INAH の後述の各所定量を側腹部皮下に注射した。マウスは 2 群に大別し、1 群は 5 乃至 8 カ月間連日薬剤投与を行つた後屠殺し、他の一群は 1 乃至 2 カ月間治療の後屠殺し、いずれも 1 側の肺を無菌的にとり出し滅菌乳鉢内で磨滅し、約 10 倍量の 1% 苛性ソーダ溶液で稀釈しその 0.1 cc を小川氏⁸⁾の方法に従い 1% 磷酸培地に培養し 5 週後の菌発育を観察した。耐性検査は、SM, PAS 及び INAH のいずれも 1 r, 10 r, 100 r について行つた。短期間薬剤投与後菌を分離してマウスにより継代する場合は、マウスを屠殺してその肺より薬剤無含有培地を以つて分離し得た菌を初回と同じ方法によつて次のマウスに接種し翌日より前代と同様の治療を行い、各代毎に肺の定量培養によつて耐性検査を行いつつ以下同様の継代をくりかえした。以上の二大別されたマウスを更に各薬剤の組合せによつて、SM, PAS, INAH 各単独群、SM と PAS、SM と INAH, INAH と PAS の 2 種併用群及び SM, PAS, INAH の 3 種併用群の 7 群にわけ、各薬剤別及び併用方法別の耐性菌発現の状況並びに耐性発現阻止効果を観察した。薬剤投与量は、単独、併用いずれも SM 0.5 mg, PAS 5 mg, INAH 0.02 mg を 0.1 cc 溶液に含有せしめて注射した。各薬剤量はおおむね臨牀上用いられている治療量と考えられる量をマウスの体重より換算してきめた。なお、使用した結核菌の原株は各薬

剤 0.1 r/cc に対し発育を抑制されることを予め確認した。

次に別にとり出した他側の肺は、ホルマリン固定の後病理組織学的検査に供した。

実験成績

[I]

a) 長期間同じマウスに薬剤投与を行った場合

各群とも短きは 123 日より長きは 220 日に及ぶ長期間同じ結核マウスに治療を行い、治療期間中生存に堪えたマウスについて検査した。

137 日間 SM 治療を行った第 1 群 (第 1 表) 4 匹について肺定量培養を行ったが、4 匹とも SM 1 r 含有培地に对照培地と同程度の菌を認めた。PAS 単独治療の第 2 群は、146 日間治療を行ったが薬剤無含有培地にのみ菌を認めたにすぎなかった。INAH 123 日間治療の第 3 群 (第 2 表) は、5 匹の中 4 匹が培養陽性であったが、INAH 1 r 培地には 1 匹のみが对照培地と同程度の菌を認め得られた。

第 1 表 第 1 群培養成績 (137 日 SM 連続投与)

動物番号	培地	対 照	培地中 SM 含量 /cc		
			1 r	10 r	100 r
1	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-

第 2 表 第 3 群培養成績 (123 日 INAH 連続投与)

動物番号	培地	対 照	培地中 INAH 含量 /cc		
			1 r	10 r	100 r
15	+	+	-	-	-
16	+	+	-	-	-
18	+	+	-	-	-
20	+	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-

SM+PAS (137 日), SM+INAH (145 日), INAH+PAS (128 日) の二種併用及び SM+PAS+INAH (220 日) の三種併用の各群は検査マウスのすべてが培養陽性であったが、薬剤含有培地には全く菌発育を認めなかった。

b) 短期間宛継代マウスに薬剤投与を行った場合

この実験においては、第 3 表に示す如く第 4 代までの成績を観察した。各 1 代の治療期間は 1 乃至 2 カ月間である。

まず SM 単独の第 1 群 (第 4 表) では、第 1 代 (35 日) で对照培地にのみ菌を認めたにすぎず、第 2 代 (36 日) では 4 匹中 2 匹が SM 1 r 培地に对照培地の 50%

程度の菌を認められ 1 匹は 25% 程度であった。第 3 代 (34 日) では 1 r 培地に 6 匹中 4 匹が对照培地と同程度の発育を認められた。第 4 代 (70 日) に至り 4 匹中 2 匹が 10 r 培地に对照培地の 50% 以上に、他の 2 匹が 25% 程度に菌の発育を認められた。

第 3 表 継代治療群

群	治 療	第 1 代		第 2 代		第 3 代		第 4 代	
		マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)	マウ 期間 ス数 (日)
I	SM	4	35	4	36	6	34	4	70
II	PAS	3	45	3	24	5	31	4	50
III	INAH	3	38	6	51	5	35	4	70
IV	SM+PAS	3	38	5	34	4	35	5	49
V	SM +INAH	3	30	3	40	4	34	4	49
VI	INAH +PAS	4	30	4	37	3	30	4	51
VII	SM+PAS +INAH	3	30	3	63	4	35	4	50

第 4 表 第 1 群 (SM 単独) 培養成績

動物番号	培地	対 照	培地中 SM 含量 /cc		
			1 r	10 r	100 r
第 1 代 (35 日)	51	+	-	-	-
	52	+	-	-	-
	53	+	-	-	-
	54	+	-	-	-
第 2 代 (36 日)	82	+	+	-	-
	83	+	+	-	-
	85	+	-	-	-
	86	+	+	-	-
第 3 代 (34 日)	119	+	+	-	-
	120	-	-	-	-
	121	+	+	-	-
	123	-	-	-	-
	125	+	+	-	-
	128	+	+	-	-
第 4 代 (70 日)	159	+	+	+	-
	161	+	+	+	-
	162	+	+	+	-
	163	+	+	+	-

PAS 単独の第 2 群は、4 代まで合計 150 日間投薬を行ったがいずれも对照培地に菌を認めたのみで PAS 含有培地には全然発育をみなかった。

第 3 群の INAH 単独の場合は第 5 表の如く、第 1 代 (38 日) では前 2 群と同様对照培地のみに菌を認めたが、第 2 代 (51 日) で 6 匹中 2 匹が INAH 1 r 及び 10 r 培地に对照培地の 50% 程度の菌を認めた。第 3 代 (95 日) でも 5 匹中 3 匹が 10 r 培地に発育を認められたが、他の 2 匹は培養陰性であった。第 4 代 (70 日) は検査した 4 匹とも 10 r 培地に对照培地の 50% 以上の菌を認められた。

次に併用の場合は、SM, PAS 併用の第 4 群 (第 6 表) が、第 1 代 (38 日) では对照培地に発育を認めた

にすぎないが、第2代(34日)では5匹中2匹がSM 1r培地に对照培地の25%程度の発育を認められた。第3代(35日)も同じくSM 1r培地に对照培地と同程度の菌を認め、第4代(49日)においては5匹全部がSM 1r培地に对照培地と同程度の菌を発見された。しかし

第5表 第3群 (INAH 単独) 培養成績

動物番号	培地	对照	培地中 (INAH 含量) /cc		
			1r	10r	100r
第1代 (38日)	61	++	-	-	-
	62	+++	-	-	-
	64	+++	-	-	-
第2代 (51日)	92	##	-	-	-
	93	+++	-	-	-
	94	+++	##	++	-
	96	+++	##	##	-
	98	+	-	-	-
第3代 (35日)	129	##	++	++	-
	131	##	##	++	-
	133	+	+	+	-
	136	-	-	-	-
	138	-	-	-	-
第4代 (70日)	169	##	##	++	-
	170	++	++	+	-
	171	++	+	+	-
	172	##	##	##	-

第6表 第4群 (SM, PAS 併用) 培養成績

動物番号	培地	对照	SM /cc			PAS /cc		
			1r	10r	100r	1r	10r	100r
第1代 (38日)	65	++	-	-	-	-	-	-
	67	##	-	-	-	-	-	-
	68	++	-	-	-	-	-	-
第2代 (34日)	100	+++	+	-	-	-	-	-
	101	+++	+	-	-	-	-	-
	102	+++	-	-	-	-	-	-
	103	-	-	-	-	-	-	-
	104	+	-	-	-	-	-	-
第3代 (35日)	139	+	+	-	-	-	-	-
	141	++	+	-	-	-	-	-
	142	-	-	-	-	-	-	-
	143	-	-	-	-	-	-	-
第4代 (49日)	174	##	++	-	-	-	-	-
	175	##	++	-	-	-	-	-
	176	++	++	-	-	-	-	-
	177	##	##	-	-	-	-	-
	178	##	##	-	-	-	-	-

PAS 含有培地には全く発育を認めなかつた。

SM, INAH 併用の第5群は第7表の如く、第1代(30日)は对照培地のみ、第2代(40日)では3匹中

第7表 第5群 (SM, INAH 併用) 養培成績

動物番号	培地	对照	SM /cc			INAH /cc		
			1r	10r	100r	1r	10r	100r
第1代 (30日)	70	##	-	-	-	-	-	-
	71	##	-	-	-	-	-	-
	73	+++	-	-	-	-	-	-
第2代 (40日)	105	+++	+	-	-	+	-	-
	107	##	+	-	-	+	-	-
	109	##	-	-	-	-	-	-
第3代 (34日)	144	++	++	-	-	+	-	-
	146	##	+	-	-	##	-	-
	147	##	+	-	-	+	-	-
	148	-	-	-	-	-	-	-
第4代 (49日)	179	##	++	-	-	##	-	-
	180	##	+	-	-	##	-	-
	182	##	##	-	-	##	-	-
	183	##	+	-	-	##	-	-

2匹においてSM及びINAHの1r培地にいずれも对照培地の25%程度の菌を認めた。第3代(34日)は4匹中3匹、第4代(49日)は4匹全部が両薬剤とも1r培地に对照培地の25乃至50%程度の菌を認められた。

PAS, INAH 併用の第6群においては4代合計148日間治療を行つたがすべて对照培地に発育をみたのみで薬剤含有培地には両薬剤とも菌を認め得なかつた。

SM, PAS, INAH 併用の第7群においても第6群同様4代まで178日間の治療を行つてもすべて对照培地に菌を認めたにすぎなかつた。

【II】 肺の病理組織学的所見

長期間治療のマウスについて観察したが、まず对照として治療群とほぼ同期間生存した薬剤無投与の同一菌株感染マウスの肺病変をみると、肺胞内に大単核円形細胞がみられ滲出性肺炎の像を呈しているが乾酪化は認められない。肺胞壁に細胞浸潤があり変化のない肺胞は代償性肺気腫を示し出血像も認められる。気管支、血管周囲に強い細胞浸潤がみられる。これに対してSM群は、上述の滲出性肺炎や肺胞内の円形細胞が少なくなつては、肺胞壁炎様の傾向が強い。気管支、血管周囲の細胞浸潤は少ない。PAS群は、对照の非治療群より病変がやや軽いが滲出性肺炎像や肺胞壁の細胞浸潤が相当強く、気管支、血管周囲にも強度の細胞浸潤が認められる。INAH群は肺胞内変化が少なく、肺胞壁炎様の像はSM同様であるが気管支、血管周囲の病変はSM群より強

く認められる。SM, PAS 併用群は肺胞内炎症像少なく肺胞壁変化も弱い。気管支、血管周囲の変化も少なく病変は全般に軽度である。SM, INAH 併用群は肺胞内及び壁に小病巣があり、気管支、血管周囲にも軽度の細胞浸潤がみられる。INAH, PAS 併用群は肺胞内に遊走細胞があり呼吸上皮細胞も認められ又肺胞壁には線維素様物の析出があり、気管支、血管周囲の細胞浸潤が高度である。3 種併用群では肺胞内及び壁の変化がわずかに認められ気管支、血管周囲の細胞浸潤も軽度である。

総括及び考按

耐性菌判定の基準については、現在種々議論のあるところであるが、私はその諸論議とはなれて当実験に現れた成績により考按してゆきたいと思う。

長時間同じマウスに薬剤投与を行つた実験としては、まず SM を単独に用いた Youmans 等の報告があるが、彼等は人型結核菌感染マウスを 4 群にわけ毎日 SM を 55 日間注射した所、SM 1500 r 群では 89.4%、750 r 群では 65%、375 r 群では 22.5%、187.5 r 群では 5.5% に耐性菌 (SM 12.5 r 含有培地に発育した場合) を肺の培養で発見している。又、Williston 等は、PAS 併用による SM 耐性菌発現への影響を同じくマウス結核症で観察しているが、この実験では 183 日の治療で SM 耐性菌 (SM 6.25 r 含有培地に発育した場合) の発現率は、第 1 群 (1 日 1.5 mg の SM を 2 回分割注射) 57.9%、第 2 群 (同量の SM と 1 日の食餌に 0.25% の割合に PAS を加えたもの) 44%、第 3 群 (同量の SM と PAS を 0.5% 加えたもの) 80%、第 4 群 (同量の SM と、PAS を 1% 加えたもの) 57.9% であつて、各群の間には有意の差を認めず、PAS によつて SM 耐性菌の発現を阻止できなかつたといつている。更に最近 Wolinsky 等の発表では、同じくマウス結核症において SM 或いは PAS 単独治療を 198 日間行つたが、いずれも耐性菌を肺より分離できず、又 3 種の異株の結核菌で感染せしめたマウスの各群に SM 単独或いは SM と PAS の併用で 160 日間治療を行つたが、3 群を通じて 54 匹中単独で 2 匹、併用で 1 匹から SM 耐性菌 (SM 5 r 含有培地に発育した場合) を発見したのみであつたと報告している。

かくの如く、マウスの実験的結核症においては同一動物に長期間投薬を行つた場合の耐性菌発現に関する報告は種々であつて、未だその結論は出ていないが、私の実験では、同じ方法ではほぼ同じ期間実験した場合に SM, PAS 及び INAH のいずれに対しても単独、併用ともに薬剤 10 r 含有培地に菌を認めることはできなかつた。しかし、1 r 培地において SM 単独群で検査マウス 4 匹共菌発育を認め、INAH 単独群で 5 匹中 1 匹が菌発育をみたのに対し、各併用群ではいずれも 1 r で発育を

阻止されており、このことは SM 及び INAH は他種抗結核剤を併用することにより耐性発現を阻止或いは遅延させ得る傾向をもつことを示している。いずれにせよ、同一マウスに長期間薬剤を与えても耐性菌の発現は非常に困難であり、Wolinsky 等はマウスの他にモルモット及び兎でも同様の実験を行つて耐性菌発現の稀であつたことを報告し、動物実験では臨牀実験の如くに高度耐性菌の発現がみとめにくいことの理由として宿主たる生体における或る因子が大きな役割を演ずるのであろうと結論している。私は同一生体の長期間治療における上述の事実にかんがみ、短期間治療後菌を分離し次の生体に接種、再び治療をくりかえす方法によつて耐性菌の発現を認め得ないであろうかと考え、ひきつづき実験をこころみた。このような方法を用いた結核菌以外の菌による実験として山川¹⁰⁾の報告がある。

各薬剤単独使用の結核菌に対する影響の状況は、上述の如く SM は第 4 代で 10 r 含有培地に発育を示す場合を発見し、INAH は第 2 代で既に 10 r 含有培地で発育を示す場合を発見している。PAS は各代を通じて全例とも 1 r 感性を示し耐性菌発現が困難であることを推測させる。SM, INAH の単独使用においてさきの同一マウス長期治療実験において 10 r 含有培地に発育する菌の発現が困難であつたのに対し、この継代による実験では総治療日数が 4 代まで合計して大体前実験と同じ期間であるが、宿主をかえて行くことによつて SM 及び INAH に対し 10 r 含有培地に発育する菌の発現をみたことは興味深いことである。勿論宿主をかえると同時にその都度、培地上で菌を分離するという試験管内過程が加わることも考慮する必要があるが、とにかく Wolinsky 等のいわゆる certain host factors を首肯せしむるに足るものと思われる。

次に併用による耐性獲得阻止の問題であるが、小酒井¹¹⁾の述べる如く耐性獲得形式には Demerec の云う SM 型 (SM 及び INAH) と Penicillin 型 (PAS) があり、耐性獲得阻止には SM 型薬剤間の併用よりも SM 型と PAS との併用が有利であるとされている。

私の実験成績を検討するため、各薬剤毎に単独使用と他薬剤との併用による場合を比較してみた。まず SM についてみると、第 8 表の如く単独は 4 代で 10 r 含有培地で発育を示す場合を発見しているが、PAS 或いは INAH との併用においては 1 r 含有培地で発育を示すにとどまり、3 種併用ではすべて 1 r 感性であつた。PAS については全例 1 r 感性を示している。次に第 9 表に INAH に対する実験成績を示したが、単独は 2 代で 10 r 含有培地に発育を示したのに対し、SM との併用では 1 r 含有培地に発育を示すにすぎず、PAS との併用では 3 種併用とともに全例 1 r 感性であり、併用による耐性獲得阻止の傾向を看取できる。又前述の SM 型同志の

并用よりも SM 型と PAS との併用が耐性獲得阻止に
よという説に従った成績も得られた。

第 8 表 SM 感受性に対する影響

治 療	継代	治療 日数	実験 マウス 数	菌陽 マウス 数	S M 感 受 性			
					1 γ 感性	1 γ 耐性	10 γ 耐性	100 γ 耐性
SM	I	35	4	4	4			
	II	36	4	4	2	2		
	III	34	6	4		4		
	IV	70	4	4		2	2	
SM+PAS	I	38	3	3	3			
	II	34	5	4	4			
	III	35	4	2		2		
	IV	49	5	5		5		
SM+INAH	I	30	3	3	3			
	II	40	3	3	3			
	III	34	4	3	2	1		
	IV	49	4	4	2	2		
SM+PAS +INAH	I	30	3	3	3			
	II	63	3	3	3			
	III	35	4	4	4			
	IV	50	4	4	4			

第 9 表 INAH 感受性に対する影響

治 療	継代	治療 日数	実験 マウス 数	菌陽 マウス 数	I N A H 感 受 性			
					1 γ 感性	1 γ 耐性	10 γ 耐性	100 γ 耐性
INAH	I	38	3	3	3			
	II	51	6	6	4		2	
	III	35	5	3			3	
	IV	70	4	4			4	
SM+INAH	I	30	3	3	3			
	II	40	3	3	3			
	III	24	4	3	1	2		
	IV	49	4	4		4		
INAH+PAS	I	30	4	4	4			
	II	37	4	4	4			
	III	30	3	2	2			
	IV	51	4	4	4			
SM+PAS +INAH	I	30	3	3	3			
	II	63	3	3	3			
	III	35	4	4	4			
	IV	50	4	4	4			

病理組織像においては、各薬剤の治療効果を云々する
に足るほど著明な差異は認めなかつたが、PAS 単独群
が最も病変強く、INAH 群、SM 群と病変は次第に軽

度であつた。併用群では、大体単独群より病変が軽かつ
たが、INAH、PAS 併用群が相当病変強く、この併用
方法が INAH 耐性獲得阻止によいと推測せられる結果
を得た事実と考えあわせるとき、臨牀上一考を要するも
のと考えられる。

む す び

私は静脈内感染結核マウスにおいて、SM、PAS 及び
INAH の 3 種抗結核剤による治療を、長期間同一動物
に行つた場合と、短期間ずつ継代接種した動物に行つた
場合とにわけて実験を行い、各薬剤の結核菌に対する態
度を検討して耐性菌発現の様相或いは併用療法による耐
性菌発現阻止効果を検討する資料の一つにせんとした。
長期間同一マウスに治療を行つた場合には、SM (137
日) 及び INAH (123 日) の単独使用において、いず
れも対照に比して若干の耐性獲得の傾向を示した。短期
間 (30 日乃至 70 日) ずつの治療を継代マウスに行つ
た場合は、SM 単独使用の第 4 代において、INAH 単
独使用の第 2 代以後において、それぞれ SM 及び INAH
に対し対照に比すれば前述の長期間同一マウス治療の実
験よりもやや強い耐性獲得傾向を示すように考えられ
た。これは宿主をかえることによつて耐性獲得が容易に
なる性質があることを考えさせる。併用による場合は、
3 種併用が各薬剤に対して最も効果よく、2 種併用では
SM 或いは INAH に PAS を併用する方法がよい結果
を得た。

病理組織学的検査に関しては名古屋大学医学部第一病
理宮川教授の御指導をうけた。厚く謝意を表する。

文 献

- 1) Raleigh, G. W., & Youmans, G. P.: J. Inf. Dis., 82, 3, 1948.
- 2) 岩崎竜郎・小川辰次: 結核, 24, 6, 1949.
- 3) 水之江公英: 日本細菌学雑誌, 7, 195, 1952.
- 4) 水之江公英: 日本細菌学雑誌, 7, 293, 1952.
- 5) 水之江公英: 日本細菌学雑誌, 8, 825, 1953.
- 6) Youmans, G. P., Williston, E. H., & Osborne, R. R.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 70, 36, 1949.
- 7) Williston, E. H., & Youmans, G. P.: Am. Rev. Tuberc., 62, 156, 1950.
- 8) Wolinsky, E., & Steenken, W.: J. Bact., 66, 229, 1953.
- 9) 小川辰次: 結核, 24, 2, 1949.
- 10) 山川沈: J. Antibio., 5, 117, 1952.
- 11) 小酒井望: 最新医学, 9, 158, 1954.