

抗結核剤による治療を行つた動物体内

結核菌の薬剤耐性について

慶応義塾大学医学部細菌学教室

牛 場 大 蔵・阿 部 逸 夫

遠 藤 武・草 間 久 子

慶応義塾大学医学部外科学教室

横 山 宗 雄

(受付 昭和 29 年 10 月 9 日)

(本論文の要旨は昭和 29 年 4 月第 29 回日本結核病学会総会において報告した)

1 緒 言

一般に結核菌がストレプトマイシン (以下 SM), イソニコチン酸ヒドラジット (以下 INH) に対して容易かつ迅速に耐性を獲得することは広く知られているが, 同じ生体内でありながら実験動物においては, 人体内と異なり高度の耐性菌が出現し難いといわれている¹⁾²⁾。われわれはこれがどの程度に認められるか, またその理由は何であるかを知ろうとして, マウス及びモルモットの実験的結核症の SM 又は INH 治療実験を行い, これら動物体内における結核菌の薬剤耐性について検討を行つた。

2 実験材料

使用菌株: 教室保存の強毒人型結核菌黒野株を使用した。モルモットによる実験には H 37 Rv 株を用いた。この両菌株共に SM 及び INH に対して感受性を示し, 本実験に用いた耐性測定法によれば, SM に対しては 1 r/cc, INH に対しては 0.1 r/cc において一部菌集落の発生を見たが, それぞれ 10 r/cc, 1 r/cc では完全に発育を阻止された。

使用動物: マウスは体重 15 g 前後, モルモットは体重 400~500 g のもので, 共に市販の健康なものを使用した。

3 実験方法

1) マウス: 全群同時に黒野株 0.1 mg (0.2 ml) を尾静脈から接種した。SM 治療は感染後 2 週たつてから第 1 群は 1 匹当たり 1 日 100 r, 第 2 群は 5 r から 1 週毎に 10, 20, 40, 100, と漸次増量して行き, 共に 1 日 1 回皮下注射によつて与えた。マウスが比較的早く死亡した為, 投与はマウスが死亡する迄継続した。死亡した時は直ちに部検諸検査を行い, 分離菌について耐性を測

定した。

2) モルモット: 黒野株 0.01 mg 腹腔内又は 0.02 mg 皮下に接種し, 感染後 2~14 週の期間において治療を開始した。SM は Pro kg 10 mg, INH は 2~4 mg を 1 日 1 回筋肉内注射によつて与えた。薬剤投与期間は 1~24 週に及んだ。薬剤投与開始後 1~6 週の間は毎週, その後は 12 週及び 24 週にそれぞれ 3~5 頭のモルモットを屠殺, マウスの場合と同様の検査を行つた。

3) 空洞類似の空隙を作る目的で充填術に使用する合成樹脂球 (径 2.5 cm) をモルモットの腹腔内に入れ, これに多数の穴を明けて球の内腔と外界とが通ずるようにし, その内腔に H 37 Rv 株 0.5 mg, (約 900 万個) を接種し, 第 1 群は感染と同時に SM 治療を開始し, 最初は Pro kg 1 mg, 以後 1 週毎に, 2, 5 mg と増量し, 1 日 1 回腹腔内又は筋肉内に注射した。治療は 6 週間継続し, 治療終了後 5 日で屠殺した。第 2 群は感染後 5 日から治療を開始し Pro kg 10 mg を腹腔内又は筋肉内に投与, 5 週後 1 mg に減量した。治療は約 2 カ月間継続し, 治療終了後 2 週間たつてから屠殺し, 第 1 群と同様諸検査を行つた。

耐性検査は小川の 1% KH₂PO₄ 卵培地を使用して主として間接法によつて行い, 接種菌量は 0.1 mg, 判定は 4 週とした。又必要に応じては直接法をも併用した。なお薬剤の稀釈法は 1, 10, 100 r/cc の 10 倍稀釈の他, 時に 1, 5, 10, 100 r/cc 又は 1, 3, 10, 30, 100 r/cc 等をも用いた。

4 実験成績

1) マウスにおける耐性実験

マウスにおいては恐らく SM 使用量が少なかつた為と治療開始がやや遅きに失したためと思われるが, SM の治療効果は殆んど見られず, 大多数が治療開始後 2~4 週で死亡した (最短 9 日, 最長 31 日, 平均 15.6 日)。

従つて長期治療の成績は得られなかつた。死亡マウスは肺に高度の病変を認め、諸臓器からは多数の結核菌が検出された。その SM 耐性検査の結果は第 1 表に示した。

すなわち全部で 39 匹のマウスから 110 株の菌株が分離されたが、その中 2 匹 (5.1%) 4 株に 100 r/cc 以上の耐性株が検出された。このものは後の検査によりすべて 1,000 r/cc 以上の耐性を有することが分つた。又 10 r/cc に部分耐性を示すもの 2 例 (5.1%) 2 株, 5 r/cc 耐性を示すもの 16 例 (41%) 26 株を認めた。原株は 5 r/cc で発育を阻止されるのであるから、約半数の 20 例 (51.2%) において耐性の上昇が認められたことになる。

薬剤投与方法と耐性との関係は 1 日 100 r を恒量的に与えた群では 10 r/cc 以上の耐性を示したものが 4 例あるのに対し、5 r から漸次増量して行つた群では大多数のマウスが死亡したときの SM 投与量が未だ 20 r と云う微量であつた為か 10 r/cc 以上の耐性を示した例がなかつた。

投与期間と耐性出現との関係は各 10 日毎に区切つた群の間に本質的な差は認められなかつた。この点に関しては更に長期治療の実験が行われなければならないが、10 日以内に 10 r/cc 部分耐性 1 例認めたことや、100 r/cc 完全耐性を示した 2 例がそれぞれ治療 12 日及び 24 日で死亡したマウスであつたことは、マウスにおいて相当早期に高度耐性菌が現れることを示したものである。

表 1 SM 投与方法と SM 耐性出現との関係

治療方法	1r 以下	1r 耐性		5r 耐性		10r 耐性		100r 耐性		計
		部分	完全	部分	完全	部分	完全	部分	完全	
100 r 恒量	0	4 (13.2)	5 (22.7)	9 (40.9)	0	2 (9.1)	0	0	2 (9.1)	22
	10	19	14	16	0	2	0	0	4	65
5 r 100 r 増量	3	3 (17.6)	4 (17.6)	5 (23.5)	2 (29.4)	0	0	0	0	17
	18	11	6	8	2	0	0	0	0	45
計	3	7 (7.7)	9 (17.9)	14 (23.1)	2 (35.9)	2 (5.1)	0	0	2 (5.1)	39
	28	80 (25.5)	20 (21.2)	24 (13.2)	2 (21.8)	2 (1.8)	0	0	4 (3.6)	110

各欄上段は例数、下段は株数、カッコ内は %

次にこれらの菌株を分離した各臓器と耐性との関係を検討してみると、第 2 表に示す如く肺では 28 例中 5 r/cc 以上が 17 例 (60.7%) で半数以上に耐性の上昇を認めた。これに反して腎では 26 例中 1 r/cc で発育を完全に阻止される感受性株が 12 例 (46.2%) で半数近くを占めており、脾ではその中間で 1 r/cc に発育するものが

過半数を占めていた。これは体内における菌増殖の程度と関係があるように思われる。又 100 r/cc 完全耐性を示した 2 例の中、1 例は肺のみを培養した例で他の臓器における耐性は不明であるが、他の 1 例では培養を行つた肺、脾、腎共にすべて 100 r/cc 完全耐性を示した。

表 2 菌を分離した臓器と SM 耐性出現との関係

臓器名	<1r	1r		5r		10r		100r		計
		部分	完全	部分	完全	部分	完全	部分	完全	
肺	1 (3.6)	6 (21.4)	4 (14.3)	13 (46.5)	2 (7.1)				2 (9.1)	28
脾	4 (14.3)	10 (35.7)	8 (23.6)	5 (17.8)					1 (3.6)	28
腎	12 (46.2)	4 (15.4)	5 (19.2)	3 (11.5)		1 (3.9)			1 (3.9)	26
淋巴腺	11 (40.7)	10 (37.1)	2 (7.4)	3 (11.1)		1 (3.7)				27
胃			1							1
計	28 (25.5)	30 (27.3)	20 (18.2)	24 (21.8)	2 (1.8)	2 (1.8)			4 (3.6)	110

カッコ内は %

なお同一個体内での臓器別による耐性の差を検討したが総 39 例中 1 臓器のみしか培養しなかつた 8 例を除いた 31 例について見ると、ほぼ不変と見なし得るものが約半数の 16 例あつたが、5~10 倍の差を見たもの 6 例、10 倍以上の差を見たもの 9 例を認め、Medler³⁾、小酒井⁴⁾の人体における成績程著しい差は認められなかつたが同一個体でも臓器が異ると菌の耐性が異なるものであることが知られた。これは部分耐性をつつた場合であるが、完全耐性について見ると 24 例 (77.4%) がほぼ一致した値を示し、5 倍以上の差のあるものは 7 例であつた。この場合肺において最高値を示すものが最も多かつたが、他臓器における方が高いものもあつた。」

2) モルモットにおける耐性実験

モルモットにおいては治療効果が著明に認められ、治療期間が長くなるに従つて結核菌陰性となるものも多く、陽性例も集落の少ないものが多かつた。この菌の陰性化は感染後治療開始までの期間の短い群に特に著明であつた。

第 3 表は SM 治療モルモットについての成績を総括したものであるが、総数 68 例中培養陽性例が 21 例 32 株で、この中耐性検査を行い得たものが 19 例 30 株であつた。SM 耐性検査の結果は大多数が 1 r/cc で完全に発育を阻止され、治療 1 週及び 3 週で屠殺した群にそれぞれ 1 例及び 4 例の 1 r/cc 部分耐性株を認めたに過ぎなかつた。

表 3 SM 治療モルモットより分離された結核の SM 耐性

治療期間	モルモット数	菌培養陽性例	耐性				
			<1r	1r	10r	100r	計
1週	9	4(9)*	3(8)	1(1)			4(9)
2週	8	5(11)	5(11)				5(11)
3週	8	5(5)		4(4)			4(4)
4週	8	3(3)	3(3)				3(3)
5週	7	2(2)	2(2)				2(2)
6週	14	1(1)					0
12週	10	1(1)	1(1)				1(1)
24週	4	0					0
計	68	21(32)	14(25)	5(5)			19(30)

* カツコ内は菌株数

第4表は INH 治療の場合であるが、総数 77 例中菌陽性例が 40 例 61 株、その中耐性検査を行い得たものが 37 例 46 株で、この中 1r/cc 以下の感受性菌が大部分を占め、僅かに治療3週及び6週で屠殺した群にそれぞれ1例宛 1r/cc 部分耐性を示すものが認められたのみで、SM の場合と同じく治療期間の長短に拘らず耐性上昇の傾向は全く認められなかった。

表 4 INH 治療モルモットより分離された結核菌の INH 耐性

治療期間	モルモット数	菌培養陽性例	耐性				
			<1r	1r	10r	100r	計
1週	8	7(11)*	7(11)				7(11)
2週	7	5(6)	5(5)				5(5)
3週	16	12(18)	11(13)	1(1)			12(14)
4週	8	3(3)	3(3)				3(3)
5週	12	8(16)	6(9)				6(9)
6週	12	3(4)	2(2)	1(1)			3(3)
12週	10	2(3)	1(1)				1(1)
24週	4	0					0
計	77	40(61)	35(44)	2(2)			37(46)

* カツコ内は菌株数

8) 合成樹脂球を入れたモルモットについての実験

SM 治療開始後2週間毎に計3回球の内容を穿刺によって採り、直接法によって耐性検査を行った。その結果は第5表に示す如く 1r/cc に発育を示したものがあのみで耐性の上昇は認められなかった。

治療終了後屠殺したモルモットの諸臓器からの結核菌の耐性を直接法及び間接法で測定した結果も第5表に示した。すなわち Pro kg 1mg から漸増、治療を6週行つた第1群の中筋肉内投与を行つた群においてのみ間接法で 10r/cc 部分耐性菌が検出された。

表 5 合成樹脂球入結核モルモットに SM 治療を行つた場合の SM 耐性

治療法	モルモット番号	菌培養時期及び材料						
		2週	4週	6週	屠殺時	屠殺時	屠殺時	屠殺時
漸増	腹腔内	102	<1*	<1	(1)	(3)	<1	(3)
		104	(1)	(-)	<1	(1)	(1)	(1)
	筋肉内	110	<1	<1	<1	(10)	<1	(10)
増	肉内	111	<1	<1	<1	(10)	1	(10)
		113	(1)			(10)	(3)	(3)
恒量	腹腔内	114	(-)	<1	(-)	(3)		
		115	<1	<1	<1		(3)	<1
	筋肉内	117	<1	<1	<1	(1)	(1)	1
		118	<1	<1	<1		(1)	(1)

材料中穿刺液は直接法による。他は全部間接法。

() は部分耐性を示す。(-) は培養陰性。

* 数字は分離菌の SM 耐性 (r/cc)

5 総括及び考按

Steenken¹⁾ は結核モルモットに 125 日間の SM 治療を行つたが、1 例も耐性を獲得しなかったといひ、Wolinsky²⁾ らはマウス・モルモット・ウサギを用いて 1/2-1 年以上にわたる長期間の SM 治療を行つても中等度乃至高度の耐性菌は稀にしか見られなかったという。又安田³⁾ らはマウスにおいて SM あるいは INH で 15⁰ 日前後の間治療を行つても耐性菌の出現を見なかつたが、約 1 カ月毎にマウス体内を継代しながら治療を行うと、SM・PAS では 3 代に至るも耐性菌は現れなかつたが、INH においてのみ 2 代目に 10r/cc の耐性菌を認めたと報告した。さらに北本⁴⁾ らは同様マウスにおいて SM あるいは INH で 2-4 カ月治療を行い、完全耐性菌は認めなかつたが、部分的には幾らか耐性獲得の傾向を認めた。しかしながら一方において、Feldmann⁷⁾ らはモルモットによる SM 治療実験で、206-215 日の長期治療では菌陽性の 5 例ともすべて 2000-8000 r/cc の高度耐性菌の出現を見ており、マウスにおいては Youmans⁸⁾ ら及び Williston⁹⁾ らは、150 日前後の SM 治療により高率に SM 耐性菌の出現を見ている。われわれの実験でもマウスにおいては短期間の治療実験ではあるが約半数に耐性上昇の傾向が認められ、しかも治療 12 日及び 24 日という早期に 2 例において 1000 r/cc の高度耐性菌を認めたが、モルモットにおいては 24 週にわたる治療実験を行つたにも拘らず耐性上昇の傾向は全く認められなかつた。

細菌が薬物に対して耐性となるのは一般に突然変異及び選択によるのが主因と考えられているが、この説に従

えば耐性菌が現れる為には耐性を有する突然変異菌が出るだけの菌数に達することが必要で、菌の増殖が旺盛な程その機会は多いわけである。又一方選択作用をうける為には適当な濃度の薬剤との接触が必要である。いま、菌の増殖という点からわれわれの実験を検討してみると、マウスにおいては治療群においても感染後1ヵ月～1ヵ月半で殆んど死亡し、その体内には非常に多くの菌が増殖していることを認めたが、モルモットにおいては菌陰性の例が多く、又陽性であつても菌集落数が数個乃至十数個に過ぎないものが多く体内での菌増殖が微々たるものであつたことを物語つていた。これがマウスでは早期に高度耐性菌を認めたのに反し、モルモットでは長期間治療したにも拘らず、その間に耐性菌が現れなかつた大きな原因であると考えられる。又マウスにおいても菌増殖の最も著しい肺¹¹⁾で最も高率に耐性菌を認めたことから、菌の耐性獲得との間に密接な関係があることが窺知される。もちろん、さきに述べた諸家の成績の不一致をすべてこの菌の増殖の点のみに帰することは出来ないが、菌の増殖が関係していることは想像され、Wolinsky²⁾らもマウスにおける Youmans らの成績⁸⁾⁹⁾との不一致について感染の重さということを考えている。又小児においては耐性が出現し難いと云われているが、これも菌の増殖と関係があるものの如く、Wilking¹²⁾らは菌分離病巣に菌数が少ない為であろうと論じている。一方においてこれら実験動物や小児に比して高率に耐性菌が出現するといわれる成人でも、空洞を有する重症者に耐性が現れ易く³⁾⁴⁾¹³⁾¹⁴⁾、又同一人でも部位により耐性が異り空洞においては特に高率に耐性菌が認められる³⁾⁴⁾という。空洞が薬剤耐性獲得に対して持つ意義については、空洞における旺盛な菌の増殖の他に薬剤の選択作用を受けるのに適当な環境を提供しているであろうことも考えられ、例えば Howard¹⁵⁾らは菌増殖の盛んなことの他、空洞壁が血管に乏しい為に高濃度の SM が空洞内に達しないこと、空洞内容が液状又は半液状であること等を挙げ、Schmiedel¹⁶⁾は拡散により薬剤濃度の差を生ずることも重要な因子であると考えている。

人において空洞を有するものに耐性菌が出易く、一般に空洞を作らない小児や実験動物では耐性菌が出にくいと云うことは、薬剤耐性と空洞との間に密接な関係があることを思わせる。しかし空洞を有しないマウスにおいても高度耐性菌の出ていることは、in vivo において菌が耐性を得る為に空洞が絶対に必要であるとは考え難い。Wilinsky²⁾らは感作モルモットに膿瘍様病巣を作らしめ、そこに多数の菌を認めたに拘らず耐性菌を全く認めなかつたが、結核菌吸入によつてウサギに空洞を作らしめ1年にわたつて SM 治療を行つた所、空洞を有する3羽中1羽にややみるべき耐性菌を認めたといひ、鈴木¹⁰⁾らは感作家兎の肺内に10%ゼラチン液浮游液を

注射することにより空洞を形成せしめ、INH 治療によつて 10 r/cc 耐性株を証明し、特に空洞の部分に高率に認めたと報告している。われわれは合成樹脂球をモルモットの腹腔内へ入れて動物体内に空隙を生ぜしめ、空洞類似のものを作つて SM 治療実験を行い、著明な耐性獲得は認めることができなかったが、第2実験のモルモットより幾らか耐性が上り易い傾向を認めた。しかしこの両者間では SM 投与量・方法等も異なるので、耐性の差が単にこの球の存在の有無かは不明である。

要するに動物体内では人体に比して概して耐性が発現し難いことは事実であるが、マウスにおいて早期に高度耐性菌が出ていることは動物体内でも人体と本質的に異つた因子が働いているとは考え難く、菌の増殖とこれに接触する薬剤濃度とが適当であれば人体における如く高率に耐性菌が出現し得るのではないかと考えられる。しかし今迄の諸家の成績が区々であり、人体における如く常に高率に耐性菌を認めていないことは、なおそこに不明の因子があると思われ、これが解明は菌の薬剤耐性獲得の本質を知る上に必要なことといえよう。

6 結 論

1) 結核マウスを少量の SM で治療したところ、早期(治療 12 日及び 24 日)に 1000 r/cc 以上の SM 高度耐性菌が出現した。

2) モルモットにおいては体内結核菌の増殖が薬剤投与により著明におさえられ、SM・INH 共に耐性の上昇は全く認められなかつた。

3) モルモットに合成樹脂球を入れ空隙を作つて SM 治療実験を行つたが、著明な耐性の上昇は認められなかつた。

(本研究は文部省科学研究費によつた。ここに謝意を表する。)

文 献

- 1) Steenken, W. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 56: 382, 1947.
- 2) Wolinsky, E. et al.: J. Bact., 66: 229, 1953.
- 3) Medler, E. M.: Am. Rev. Tuberc., 63: 449, 1951.
- 4) 小酒井望: 結核, 26: 279, 昭 26.
- 5) 安田正憲他: 結核, 29 (増刊): 131, 昭 29.
- 6) 北本治他: 結核 29, (増刊): 133, 昭 29.
- 7) Feldman, W. H. et al.: Am. Rev. Tuberc., 56: 346, 1947.
- 8) Youmans, G. P. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 70: 36, 1949.
- 9) Williston, E. H. et al.: Am. Rev. Tuberc., 62: 156, 1950.

- 10) 牛場大蔵他: 日本細菌学雑誌, 9: 349, 昭 29. 391, 1949.
11) 阿部逸夫: 結核, 28: 423, 昭 28. 14) 金沢 謙: 慶応医学, 29: 35, 昭 27.
12) Wilking, V. N., et al.: Am. Rev. Tuberc., 66: 63, 1952. 15) Schmiedel, A: Z. f. Tbk., 102: 184, 1953.
13) Howard, W. L. et al.: Am. Rev. Tuberc., 59: 16) 鈴木 修他: 結核, 29 (増刊): 270, 昭 29.
-