

マウス結核症に関する研究

第6報 ストレプトマイシン抵抗性菌の体内出現と

それによる感染治療実験について

北 里 研 究 所

手 塚 孝

(受付 昭和30年 8 月 18 日)

1 緒 言

結核菌の抗結核剤に対する耐性獲得は化学療法の大きな障害となつている。マウスの実験的結核症における薬剤耐性出現については多くの学者によつて報告がなされているが、実験動物では同じ生体内でも人体と異り高度の耐性菌が出現し難いといわれている。しかし諸家の成績は区々であつて未だ結論を見るに至っていない。

私はマウスを用い Streptomycin (以下 SM) 耐性菌発現の様相と、感受性菌と SM 10 γ 耐性菌との色々な Population の混合菌液を感染させた場合の SM 治療効果について検討を行つたので報告して御批判を得たいと思う。

2 実験材料

使用菌株：当研究所保存の強毒人型結核菌黒野株を使用した。この菌株は SM 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 10 γ /cc で完全に発育を阻止された。

使用動物：マウスは mice strain CFW で体重 15 g 前後の健康なものを使用した。

使用培地：抵抗性測定に用いた培地は凝固前の 3% 燐酸加里培地に 2.3 倍量の SM を 加え、後 85°C 迄加熱して凝固させたものを用いた。

3 実験方法

(1) SM 血中濃度

SM 1000 γ および 3000 γ をマウスに筋注射し、注射後 1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間目にマウス 4 匹を一群として心臓より採血し、血清中の SM 濃度を重層法によつて測定した。

(2) SM 耐性と臓器別・治療期間および SM 使用量との

関係

マウスを 8 群に分ち

第 1 群 10 匹	黒野株	0.01 mg	で感染	SM 1000 γ で 2 カ月間治療
第 2 群 10 匹	"	"	"	SM 3000 γ で "
第 3 群 5 匹	"	"	"	治療しない対照群
第 4 群 16 匹	"	0.1 mg	"	SM 1000 γ で 2 カ月間治療
第 5 群 15 匹	"	"	"	SM 3000 γ で "
第 6 群 5 匹	"	"	"	治療しない対照群
第 7 群 18 匹	"	"	"	SM 1000 γ で 4 カ月間治療
第 8 群 15 匹	"	"	"	SM 3000 γ で "

結核菌はマウスの尾静脈に注射して感染させ、翌日から SM を筋注射して治療した。第 5 群では 2 匹、第 8 群では 5 匹が治療期間中、結核ではなく他の原因で斃死したものと思われたので除外した。なお治療期間中結核によつて斃死したもの、すなわち第 4 群のものは斃死時に各臓器中の結核菌の抵抗性を測定してその群の成績に計上した。一方第 7 群では 2 カ月以内に斃死したものは除外し、2~4 カ月間に斃死したものはその群の成績に計上した。治療終了後生存マウスは屠殺し、肺・脾・肝・腎臓の各臓器に 1% 苛性曹達を加えてホモジナイザーで均等化して、抵抗性測定用培地上に培養を行つた。判定は 4 週間後に行い、部分抵抗性をも、集落の発育した最高の γ を以てその臓器中の結核菌の抵抗性とした。また同時に各群について 3 匹宛各臓器の定量培養を行つた。

(3) SM 10 γ 耐性菌各 Population における治療成績

上記の実験で得られた SM 10 γ 耐性菌を原株の感受性菌と種々の割合に混合して、すなわち 0%, 25%, 50%, 75%, 100% の混合菌液を造り、そのおのおのの菌液 0.1 mg を 1 群 20 匹のマウスに尾静脈内に感染、内

10匹は SM1000Y で、残り10匹は SM3000Y で治療、7週間治療を行った。他に対照群として、10匹は Sensitive (0%) のもの、さらに他の10匹は resistant (100%) のもので感染して治療を施さない群をもうけた。斃死マウスはその都度剖検して、肺の結核性病変による斃死であることを確めた。

さらに同様の実験を0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100% で行つた。この実験では1週間毎にマウスの体重測定を行つた。

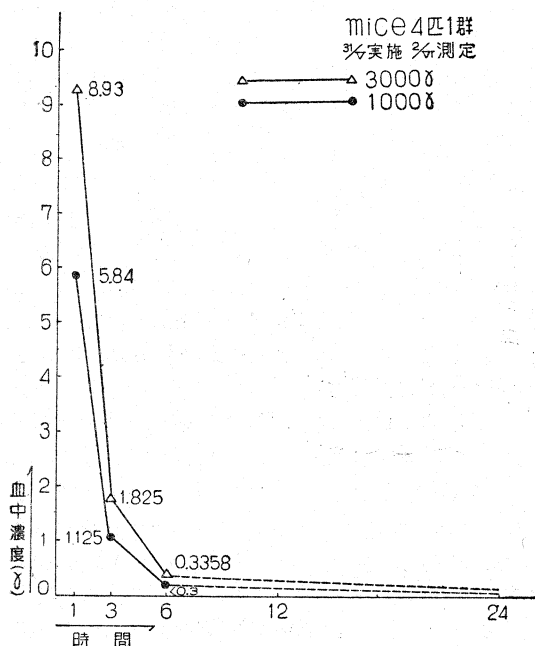
4 実験成績

(1) SM血中濃度

血中濃度の測定結果は第1図に示した。すなわち注射後1時間目が最高で血中濃度は1000Y の場合は約6Y, 3000Y の場合は約9Y であつた。3時間目では1000Y注射群は1.1Y, 3000Y注射群は1.8Y, 6時間目では3000Y群が0.3Y, 1000Y群では0.3Y以下であつて、12時間目では測定可能なSMを検出出来なかつた。

この成績によつて人のSM治療の場合、通常達せられる血中濃度である10Y/cc がマウスでは3000Y注射によつてほぼ達せられることを知つたので、本実験のマウス治療実験は該濃度が選ばれたわけである。

第1図 SM 血中濃度



(2) SM耐性と臓器別・治療期間及びSM使用量との関係

0.01mg 感染させた場合の2ヵ月治療後のSM耐性は第1表に示す如く、3000Y治療の方に耐性菌の出現なく、1000Y治療の方に10例中肺臓と脾臓に1例宛(10%)耐性菌の出現が認められたが、同じ1000Y 2

ヵ月治療でも0.1mg感染群より耐性の出現が少ない成績を得た。

第1表 2ヵ月治療後のSM抵抗性(0.01mg)

SM使用量 臓器	1000Y				3000Y			
	肺	脾	肝	腎	肺	脾	肝	腎
0Y							1	
1Y	9	9	10	10	10	10	8	7
10Y	1	1						
100Y								

0.1mg感染させた場合の2ヵ月治療後のSM耐性は第2表に示す如く、1000Y治療群の方は16例中肺臓に3例(19%),脾臓に1例(6%),耐性菌の出現が見られたが、3000Y治療の方は13例中肺臓に3例(23%),内1例(8%)は100Yの耐性菌,脾臓に2例(15%),肝臓に1例(8%)の耐性菌の出現が認められ、1000Y治療より3000Y治療の方に多くの耐性菌の出現が見られた。

第2表 2ヵ月治療後のSM抵抗性(0.1mg)

SM使用量 臓器	1000Y				3000Y			
	肺	脾	肝	腎	肺	脾	肝	腎
2	6	6	6				5	3
11	9	10	9	10	11	7	8	
3	1				2	1		

また0.1mg感染させた場合の4ヵ月治療後のSM耐性は第3表に示す如く、1000Y治療の方は15例中肺臓に7例(47%),内1例(7%)は100Y耐性菌,脾臓に2例(13%)の耐性菌の出現が見られたが、3000Y治療の方は10例中肺臓に3例(30%),脾臓に2例(20%)の耐性菌の出現が見られ、3000Y治療より1000Y治療の方に多くの耐性菌の出現が認められた。

第3表 4ヵ月治療後のSM抵抗性(0.1mg)

SM使用量 臓器	1000Y				3000Y			
	肺	脾	肝	腎	肺	脾	肝	腎
0Y	1	1	1	1	1	4	4	
1Y	7	12	14	14	6	4	6	10
10Y	6	2			3	2		
100Y	1							

第4表は0.1mg感染させた場合の成績を経括したものであつて、臓器別にみると肺・脾・肝・腎臓の中では、肺臓に一番多く耐性出現が見られ54例中16例(29.6%),次いで脾臓に7例(13%),肝臓に1例(1.9%)の順序で腎臓には見られなかつた。

治療期間および SM 使用量との関係については、1000 Y で治療した場合、2 カ月治療群では 25% に耐性菌が見られたが、4 カ月治療群では 60% の高率に耐性菌が見られた。また 3000 Y で治療した場合は 2 カ月治療群は 46%、4 カ月治療群は 50% で両者の間に差は見られなかった。

次にそれぞれの場合の定量培養の成績は表の如くで、耐性菌出現と菌数との間に平行関係が見られ、耐性菌の最も高率であった肺において菌数も最多であり、以下脾・肝と菌数少なく、腎の菌数は肝のそれとほぼ同数を示した。

第 4 表 SM 抵抗性と臓器別、治療期間および SM 使用量との関係

臓器		肺	脾	肝	腎	計
SM 使用量	治療 期間					
1000 Y	2 力 月	3×10^6 $\frac{3}{15}$	7.8×10^4 $\frac{1}{16}$	2.2×10^4 $\frac{0}{16}$	1.8×10^4 $\frac{0}{16}$	$\frac{4}{16}$ (25%)
3000		2.2×10^6 $\frac{3}{13}$	6×10^4 $\frac{2}{13}$	2×10^3 $\frac{1}{13}$	1.8×10^3 $\frac{0}{13}$	$\frac{3}{13}$ (46%)
計		$\frac{6}{29}$	$\frac{3}{29}$	$\frac{1}{29}$	$\frac{0}{29}$	$\frac{10}{29}$ (34.5%)
1000 Y	4 力 月	2.9×10^6 $\frac{7}{15}$	1.8×10^5 $\frac{2}{15}$	1.8×10^4 $\frac{0}{15}$	3.7×10^4 $\frac{0}{15}$	$\frac{9}{15}$ (60%)
3000 Y		1×10^6 $\frac{3}{10}$	4.1×10^4 $\frac{2}{10}$	5×10^3 $\frac{0}{10}$	4.2×10^4 $\frac{0}{10}$	$\frac{5}{10}$ (50%)
計		$\frac{10}{25}$	$\frac{4}{25}$	$\frac{0}{25}$	$\frac{0}{25}$	$\frac{14}{25}$ (56%)
合	計	$\frac{16}{54}$ 29.6%	$\frac{7}{54}$ 13.0%	$\frac{1}{54}$ 1.9%	$\frac{0}{54}$ 0%	$\frac{24}{54}$ 44.0%

(3) SM 10 Y 耐性菌の各 Population における治療成績

上記のマウスで得られた SM 10 Y 耐性菌を原株の感受性菌と種々の割合に混合し、その 0.1 mg をマウスの尾静脈に注射して感染させた。この際の混合菌液の各 Population を見ると第 5 表に示す如くで、 10^{-2} では各 % 共 10 Y 完全耐性のようにみえるが、 10^{-5} では耐性菌がそれぞれ大略正しい割合に混合されていることがうかがわれる。100% では 0 Y 培地の集落数より、1 Y または 10 Y 培地の集落数が多かった。

これらの混合菌液で感染したマウスを感染した翌日から毎日 SM 1000 Y と 3000 Y で治療した結果は第 6 表の如くである。

すなわち治療しない対照群では耐性菌で感染させたものは悉く第 4 週に斃死し、感受性菌で感染させたものは若干第 5 週に死んだものもあるが、ほとんど第 4 週に斃死した。100%、75%、および 50% は 1000 Y 治療のものも、3000 Y 治療のものも対照群と同様大半は第 4 週

に、数匹が第 5 週に斃死した。25% に至つてやや生き延びた感があるが、悉く第 5 週末迄に斃死した。0% すなわち感受性菌のみの場合は 1000 Y 治療群に斃死したものが出たが、第 7 週末迄 1000 Y 治療群では 10 匹中 6 匹、3000 Y 治療群では 10 匹中全部が生き延びた。

第 5 表 SM 10 Y 抵抗性菌混合菌液の各 POPULATION

菌液	10^{-2}					10^{-5}				
SM 抵抗性菌の含有量	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100
0 Y	—	—	—	—	—	190	104	92	110	60
1 Y	—	—	—	—	—	129	33	84	120	98
10 Y	—	—	—	—	—	—	26	55	100	89
100 Y	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—

第 6 表 SM 10 Y 抵抗性菌の各 POPULATION における治療成績 (その 1)

週	SM の治療量	4	5	6	7	生存マウス	TDM
0%	1000 Y					6/10	249B
	3000 Y					10/10	249B
25%	1000 Y					9/10	28B
	3000 Y					9/10	31B
50%	1000 Y					9/10	27B
	3000 Y					9/10	27B
75%	1000 Y					9/10	25B
	3000 Y					9/10	255B
100%	1000 Y					9/10	26B
	3000 Y					9/10	26B
CONTROL	SENSITIVE					9/10	27B
	RESISTANT					9/10	24B

そこでさらに 25% と 0% との間を詳細に検討した。この場合各群の体重曲線を見ると、各群共感染後 2 週間は体重が増加しているが、各 % の非治療群たる対照群においては、2 週目が過ぎると急激に体重の減少が見られ、全マウスが斃死している。また 25% および 50% 群の 1000 Y および 3000 Y 治療群においても、2 週目より急激に体重が減少斃死している。10% 群に至つて 3000 Y 治療群は 2 週後も余り体重の減少が見られない、また 1000 Y 治療群では 2 週目よりやや減少している。5% 群では 3000 Y 治療群は 2 週後もやや増加が見られ、1000 Y 治療群では 0% 群の 1000 Y 治療群と同様、2 週後も体重の減少が見られなかった。

斃死の状態は第7表の如く、対照群では10%以上 100%迄は悉く第3週に斃死した。5%と0% (Sensitive) はやや生き延びたが、しかし悉く斃死した。100% (resistant) で感染したものは 1000Y 治療群, 3000Y 治療群共対照群と同様に第3週で斃死した。50%, 25%で感染したものは 1000Y 治療群, 3000Y 治療群共対照に比較してやや生き延びてはいるが第5週の終り迄に全部斃死して生存マウスは得られなかつた。10%感染群に至つて始めて第7週末に生存マウスが得られた。生存マウスは 1000Y 治療群では5匹中1匹, 3000Y 治療群では5匹中4匹であつた。5%感染群は 1000Y 治療群, 3000Y 治療群共生存した。

第7表 SM 10Y 抵抗性菌の各 POPULATION に
おける治療成績 (その2)

感染 成績%	週	SMの 治療量	2	3	4	5	6	7	生存 マウス	TDM
0%	1000Y								6/10	>49日
	3000Y								5/5	>49日
5%	1000Y								5/5	>49日
	3000Y								5/5	>49日
10%	1000Y								1/5	28日
	3000Y								4/5	>49日
25%	1000Y								0/5	32日
	3000Y								0/5	24日
50%	1000Y								0/5	18日
	3000Y								0/5	33日
100%	1000Y								0/5	18日
	3000Y								0/5	18日
CONTROL	0%								0/5	19日
	5%								0/5	20日
	10%								0/5	15日
	25%								0/5	16日
	50%								0/5	16日
	100%								0/5	18日

5 総括および考案

Wolinsky 等¹⁾ は H₃₇Rv 株感染マウスの実験で SM と PAS をそれぞれ単独で 198 日間治療を行つて、いずれも耐性菌出現が認められず、また3種の人型結核菌を用いて 160 日間 SM 単独および PAS 併用による治療を行つたが、治療マウス 54 匹中僅か3匹のみが中等度ないし高度の SM 耐性を示し、32匹は感受性の軽度の Loss を示したと述べている。

わが国でも最近安田²⁾ がマウスを用い、SM・PAS・INAH で 150 日前後治療を行つたが耐性菌の出現は見られなかつた。しかし約1カ月毎にマウスの体内を継代しながら治療を行うと、SM・PAS・INAH の併用では4代に至るも耐性菌は現われなかつたが、INAH 単独では2代目に、SM 単独では4代目に、10Y の耐性菌を認めたと報告している。

北本等³⁾ は同様マウスで SM あるいは INAH で 2～4 カ月治療を行い、幾らか耐性獲得の傾向は認めたが完全耐性菌を認めなかつたと述べている。

しかし一方 Williston⁴⁾ & Youmans⁵⁾ は同じく結核菌感染マウスで SM を毎日 1500Y 宛 155 日間単独投与して 89.4% の高率に SM 耐性菌の出現を見ている。

またわが国でも最近牛場等⁶⁾ は黒野株の 0.1mg で感染したマウスを1日 100Y の少量の SM で治療し、治療12日および24日という極めて短期間で 1000Y 以上の SM 高度耐性菌の出現があり、かつ肺臓で最も高率に耐性菌を認めたと報告している。

私の実験では黒野株を用い、0.01 mg 感染では耐性菌の出現は少なかつたが、0.1 mg 感染の場合は 3000Y 2 カ月治療では肺臓に 13 例中 3 例 (23%), 内 1 例は 100Y の耐性菌を見、1000Y 4 カ月治療では肺臓に 15 例中 7 例 (47%), 内 1 例は 100Y の耐性菌の出現を見た。

以上の如く実験的結核症において、同一動物に長期間薬剤を投与した場合の諸家の成績は区々である。

Wolinsky 等¹⁾ は Youmans 等の結果⁴⁾⁵⁾ との相違を明かにすることは困難であるが、感染の重さということ considering している。また人間の結核と比較して、動物の実験的結核症においては、薬物治療期間高度の耐性菌出現を抑制するある factor があるものであらうと述べている。

細菌が薬物に対して耐性を獲得することについて牛場等⁶⁾ は、耐性菌が現われるため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く、また一方選択作用を受ける為には適当な濃度の薬剤との接触が必要であると考察している。そして菌増殖の最も著しい肺で最も高率に耐性菌を認めたことから、菌の増殖と耐性獲得との間に密接な関係があることが窺知されると述べている。

私の実験においても、0.1 mg 感染マウスの定量培養の結果、最も菌数の多い肺に耐性菌も最も高率に認められた。次いで菌数は脾臓に多く、耐性菌も肺臓に次いで多く認められた。

しかし各臓器における出現耐性菌数の SM 使用量との関係は一定の成績が得られていない。菌数は 3000Y 治療によつてやや少数となつている傾向はあるが、特に肺、脾においては 1000Y, 3000Y の両濃度の治療によつて共に相当多数の菌数を示しているために、そのような僅かな菌数の差は耐性菌出現に影響しなかつたものとも思われる。

これに反し、SM 治療期間との関係は一般に4カ月治療群に2カ月治療群よりも多くの耐性菌を認め、SM と接触する期間の差が耐性菌出現に影響することを暗示しているといえよう。

また 0.01 mg 感染群では僅か 2 例にのみ耐性菌を証明し、0.1 mg 感染群に比べて少なかったことも、体内増殖菌数と耐性菌出現との関係を示唆するものの如くである。

以上の点より考えて、耐性菌の体内出現には増殖に関係ある使用菌株の毒力、感染菌量およびその増殖時に作用する薬剤の作用期間あるいは濃度が最も重要な影響を与えるものであろう。もちろん薬剤の作用する濃度は同一量注射でも病変によつて異なるのは想像に難くない。人間の結核症において空洞のあるものに耐性出現の多いことは、空洞壁において菌の増殖が盛なことおよび薬剤が結合織あるいは細胞性肉芽などで出来ている被膜によつて耐性獲得に適当な濃度となつて mild に作用する結果と思われる。

また Youmans⁷⁾ は SM 耐性結核菌で感染させたマウスには SM 治療が無効であると報告している。Feldman, Hinshaw & Karlson⁸⁾ と Steenken & Wolinsky⁹⁾ 等はモルモットでこれを確認し、耐性菌で感染した動物は SM 治療で良変しないのみならず、かえつて悪結果を示すと述べている。

殊に Steenken & Wolinsky⁹⁾ は種々の程度の SM 耐性株を用いて実験し、15 Y 以上のものには無効であるが、2.5 Y 以下のものには有効であつて、これ等の中間のものは成績が不定であると述べている。

また Hinshaw¹⁰⁾ は SM 10 Y 耐性菌が、その Population において 25 % 以上を占める時には SM は無効であろうといっている。

私は本実験使用の黒野株 0.1 mg 感染した場合、その大半を 7 週間以上生存させる SM の量、すなわち 1000 Y と、SM を注射した場合血中濃度の最高が人間の SM 治療の場合と同様 10 Y 前後になる SM の量 3000 Y とで、10 Y 耐性菌を種々の Population に混合させた菌液をもつて感染させたマウスを治療してみると、1000 Y でも 3000 Y でも耐性菌が 25 % 以上に混入している場合無効であることを知つた。SM の作用が比較的よく効くといわれている病変をもつマウスにおいて、10 Y 耐性菌 25%以上混入の場合 SM の無効である事実からして、完全耐性を基準とする現行の耐性判定基準には一考を要

するものと考えられる。

6 結 論

1) 強毒結核菌をマウス尾静脈内に感染させて SM 治療を施した場合、接種菌量の多い程、また SM 治療期間の長いほど SM 10 Y 以上耐性菌は多く出現する傾向が見られた。

2) 臓器内での耐性菌の出現は菌数と平行して、肺臓、脾臓、肝臓の順序で少なく、腎臓には耐性菌を検出することが出来なかつた。

3) SM 10 Y 耐性菌が 25 % 以上混合した菌液を以て感染した場合、血中濃度が最高 10 Y になる SM の量を注射しても無効であつた。

終りに臨み御校閲を賜つた牛場教授および種々御指導を戴いた水之江博士に深く感謝する。

本論文の要旨は昭和 30 年 4 月第 30 回日本結核病学会総会において報告した。

文 献

- 1) Wolinsky, E., & Steenken, W.: J. Bact., 66, 229, 1953.
- 2) 安田正憲他: 結核, 30, 89, 1955.
- 3) 北本 治他: 結核, 29 (増刊), 133, 1954.
- 4) Williston, E. H., & Youmans, G. P.: Am. Rev. Tbc., 62, 156, 1950.
- 5) Youmans, G. P., Williston, E. H., & Osborne, R. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 70, 36, 1949.
- 6) 牛場大蔵他: 結核, 30, 114, 1955.
- 7) Youmans, G. P., & Williston, E. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 63, 131, 1946.
- 8) Feldman, W. H., Karlson, A. G., & Hinshaw, H. C.: Am. Rev. Tbc., 57, 162, 1948.
- 9) Steenken, W., JR., & Wolinsky, E.: Am. Rev. Tbc., 58, 353, 1948.
- 10) Hinshaw, H. C.: 講演要旨, 1953.