

マウスの実験的結核症に対する Kanamycin の効果

1. Isoniazid 単独, Isoniazid と Streptomycin, Isoniazid と Kanamycin

の併用治療したマウスの臓器内の生菌数の推移について

染 谷 四 郎 ・ 林 治

国立公衆衛生院衛生微生物学部

受 付 昭 和 35 年 10 月 18 日

1. は し が き

梅沢ら¹⁾により毒性の低い、塩基性、水溶性の新抗生物質 Kanamycin (KM) が発見され、広範囲の各種細菌に対し、強力な発育阻止作用を示すことが報告された。

ことに結核菌に対しては、Streptomycin (SM) とほぼ同等の効果を示すことが柳沢らにより *in vitro*²⁾, *in vivo*^{2)~5)} の詳細なる実験によつて明らかにされている。

とくに注目すべきことは SM, PAS, INH 等現在の結核治療の主体をなす薬剤に対して耐性となつた結核菌に対しても、きわめて著しい効果を示すこと、すなわち耐性の交叉のないことが認められた。これらの基礎実験成績を基として、今日本剤による臨床研究が広く行われている。

われわれは今回、マウスの治療実験を行うにあたり、用いるマウスの系統を結核菌に対して感受性のもの (CF #1 系) および抵抗性のもの (CFW系) との 2 種類を使用、さらに治療方法として、INH と SM, INH と KM の併用効果を INH 単独のそれと比較的長期間にわたつて主要臓器内における菌の消長状態および病理組織学的検査により比較検討した。

2. 実 験 方 法

使用マウス：結核菌に対して感受性系統として CF #1 (生後 37~47 日) ♂, 抵抗性系統として CFW (33~36 日) ♂, 各 115 匹宛 (東京大学伝染病研究所産)。

感染菌株および方法：牛型結核菌 TC50 株の Dubos 栄研培地 7 日培養菌を生理食塩水で稀釈 (O. D. 650 $\mu\mu$ 0.11), 0.25 cc (v.u. 4.0×10^5) を尾静脈に接種した。

治療方法：感染両系統マウスをおのおの 4 群に分けた。① 無処置対照群, ② INH 単独治療群, ③ INH + SM 群, ④ INH + KM 群, 治療は感染翌日よりた

だちに始め、1 週間 6 日宛 15 週間続けた。ただし 9 週後に各治療群とものおのおの 2 群に分け、1 群は従来通り治療を続け、他の 1 群は治療を中止した。INH は固型飼料にあらかじめ 0.03 % に加えたものを与えた (1 日 1 匹当たり、大体 2~3 g を採食するので INH の概略投与量は 0.6 ~ 0.9 mg となる)。SM は 500 γ KM は 1,000 γ を 0.5 cc の生理食塩水中に含ませておのおの皮下注射した。

観察：治療より 1, 3, 6, 9, 12, 15 週後に各群 3 匹宛を殺して小川の方法による肺、肝、脾の結核菌定量培養および病理組織学的検査を行った。なお 15 週後の検査時に両系統マウスの肺について直接法および脾分離菌について間接法による各薬剤に対する耐性検査を行った。培地は Kirchner 寒天 (クエン酸鉄アンモン, 0.05 % および牛血清アルブミン 10 % 加) で INH, SM, KM とも 1 γ/ml , 10 γ/ml の割合に含有したものを用いた。

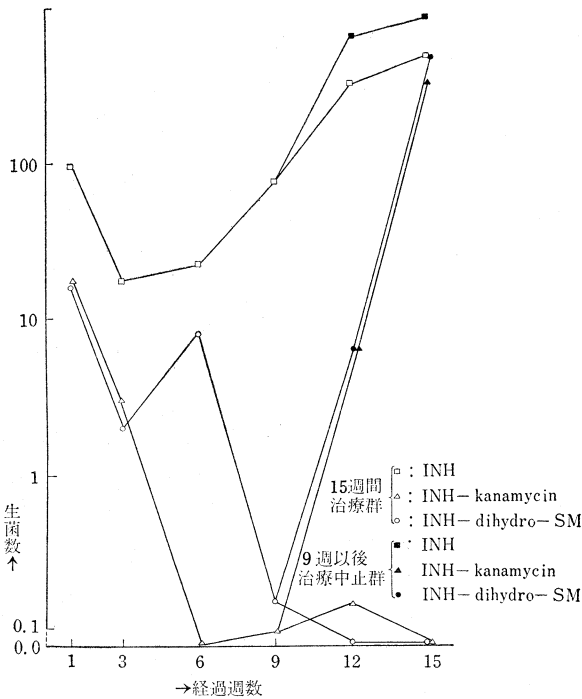
3. 実 験 成 績

体重推移：CF #1 系における各群の体重推移をみると、実験開始時の各群の平均体重は 17.6~17.9 g とほぼ均一であつた。INH 単独群と SM 併用群は終始類似の順調と思われる発育曲線を示すが KM 併用群のみはこれら 2 群に較べて、3 週以後 15 週まで、3~5 g 前後の増加を示している。9 週後に薬剤投与継続と中止の 2 群に分けたものでは、SM 群のみが投与の継続、中止両群の間に全く差がない。しかるに INH 単独群と KM 併用群の中止群においては、とくに 13 週後よりおのおの平均 3~5 g の減少をみた。CFW の体重は本系統の動作が活発敏捷、跳躍性に富んでいるため、その取扱いが困難なので測定しなかつた。

マウスの自然斃死数：結核菌感染より 15 週後までの観察期間中、自然斃死した動物数は無処置対照群の CF #1 が 14 匹 (平均生存日数 17.1 日), CFW 18 匹 (23.0 日), INH 単独群おのおの 2 匹, 12 匹 (46.6 日), SM 併用群が 1 匹, 19 匹 (38.6 日) であつて

KM 併用群では死亡したもののがなかつた。CFW 系 I NH 単独群の 12 匹は剖検の結果、内臓、とくに肺にかなりの結核性病変を示していた（無処置対照群の変化より明らかに弱い）。SM 併用群では斃死数日前より被毛逆立、瘦削、衰弱の徴を示していたので、その死因は問題なく結核症によるものと思われていた。しかるに剖検の結果は意外にも各臓器とも病変はほとんど認められない。すなわち、その死因は結核症以外の原因によるものと思われる。ただし、心血および脾を血液寒天に培養したが、死因を思わせる細菌は認められなかつた。

図 1 I NH, I NH+kanamycin および I NH+ dihydrostreptomycin によつて治療した CF #1 系マウスの肺 10 mg 中における結核生菌の推移



定量培養：a) CF#1 マウス、図 1 は肺 10 mg 中における結核菌の消長状態を示した（各群とも動物 3 匹の平均成績）。INH 単独群は 3 週後に一時やや減少するが以後は漸次増加し、9 週後の投与中止群はもとより、継続群においても 12、15 週ではきわめて多数の菌を認める。これに反し、SM および KM の両併用群は一路減少、6 週以後に培養陰性またはきわめてわずかの菌を認めるにすぎない。しかし両群とも薬剤投与を中止するときわめて急激な増加曲線を示し、INH 単独群の成績とほとんど匹敵するほどになる。なお 15 週後に行つた耐性検査で INH 単独の投与継続、中止両群とも全例が INH 10 γ に完全耐性を示し、SM, KM 両群はおのおの INH, SM, KM に対して 1 γ 感

性菌であつた。

図 2 I NH, I NH+kanamycin および I NH+ dihydrostreptomycin によつて治療した CF #1 系マウスの肝 10 mg 中における結核生菌の推移

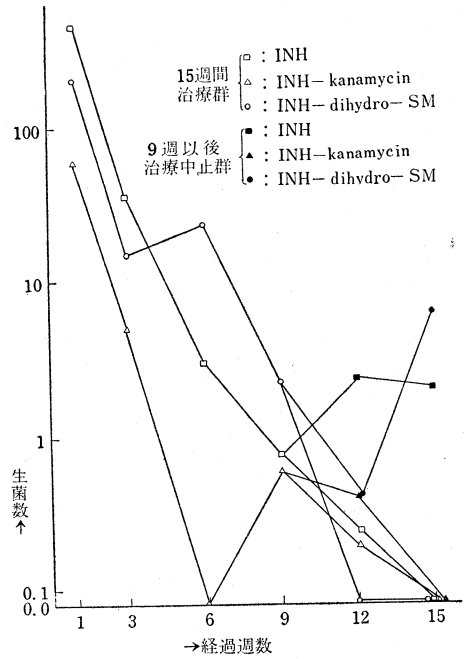


図 3 I NH, I NH+kanamycin および I NH+ dihydrostreptomycin によつて治療した CF #1 系マウスの脾 10 mg 中における結核生菌の推移

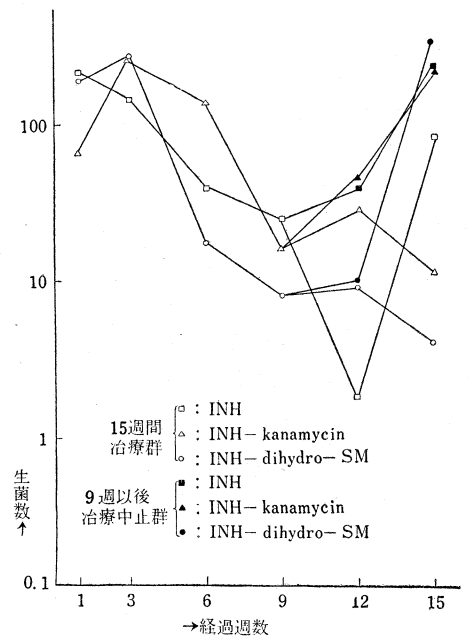
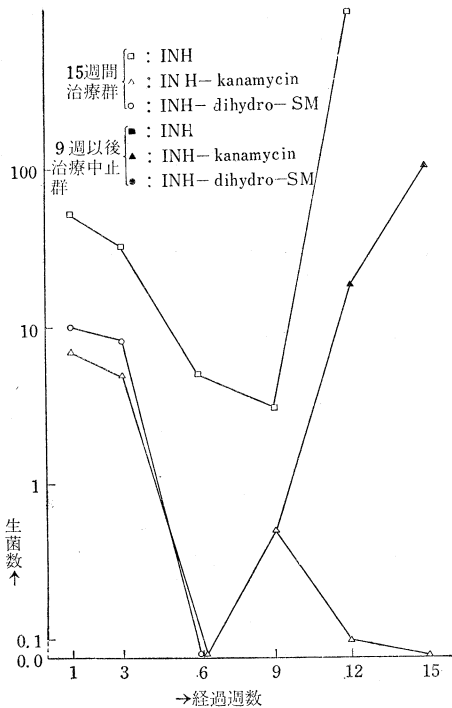


図2は肝の成績であるが、3治療群ともに菌数は一路減少、15週後には培養陰性を示す。しかし投与中止群では肺の場合ほどではないが菌数の増加は明らかである。

図3は脾の成績である。INH 単独の投与継続群は12週まで一路減少しているが、15週後に急激な増加を示した。SM および KM の両併用群は9週後までINH 単独群と同様の減少を示し、以後投与継続群はゆるやかな減少傾向を続ける。しかし3群とも投与中止群では一路増加傾向を示すことは肺と同様である。耐性検査成績は(間接法)、肺の場合と異なり、INH 単、両併用群とも各薬剤に対して感性であった(ただしINH 単独群のうち、治療継続群はINH、1ヶ不完全耐性であった)。

図4 INH, INH+kanamycin および INH+ dihydrostreptomycin によつて治療したCFW系マウスの肺10mg中における結核生菌の推移



b) CFW マウス: 図4は肺の成績である。INH 単独群は9週までゆるやかながら菌数の減少を示す。しかし以後はきわめて急激なる増加を示して、無処置対照群と同様、その10mg中の培養集落数は培地全面に密生して計算不能である。なお12週以後はマウスがすべて斃死したので観察できなかつた。12週における分離菌の耐性検査は行わなかつたので、12週における生菌数の増加がINH耐性菌の発現によるものかどうかは不明である。SM併用群は6週まで急激に減少して

図5 INH, INH+kanamycin および INH+ dihydrostreptomycin によつて治療したCFW系マウスの肝10mg中における結核生菌の推移

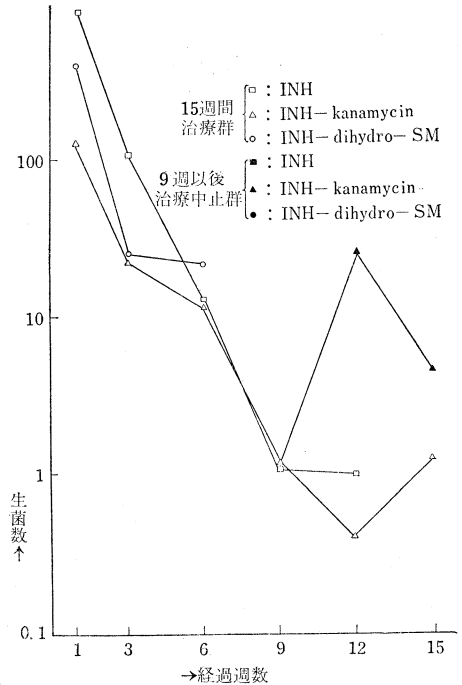
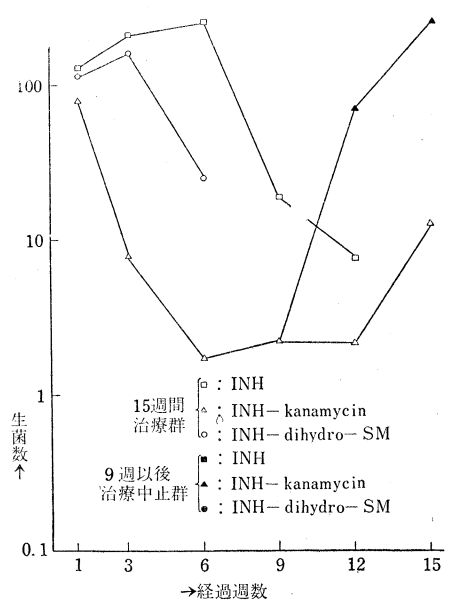


図6 INH, INH+kanamycin および INH+ dihydrostreptomycin によつて治療したCFW系マウスの脾10mg中における結核生菌の推移



培養陰性を示したが、この場合もマウスが早期に斃死したので以後は観察できなかつた。KM併用群はSM併

用群と同様、急激なる減少を示し、15週までは培養陰性、またはきわめてわずかの菌数を認めたにすぎない。ただしこの場合も投与中止群においては急激な菌数増加を示すのはCF#1と同様である。なおKM併用群の直接法による耐性検査成績は、INH、KMに対していずれも1γ感性であった。

・図5は肝の成績である。INH単独は12週、SM併用は6週まで一応減少しているが、以後はマウスが斃死したので観察できない。KM併用群はINH単独群とほぼ類似の減少曲線を示すが、15週でわずかながら増加傾向を示す。この点CF#1の成績が6週ですでに培養陰性、あるいはきわめてわずかの菌数しかみられないのに較べて、マウス系統による差が若干にみられるようでもある。

図6は脾の成績である。この場合にやや特異とみられることはINH単独群が6週、SM併用群が3週まできわめてわずかではあるが、菌数の増加がみられ、以後減少する。これに対し、KM併用群は、6週まで一路減少、以後はきわめて徐々ながら15週まで増加する。このようにKM群の投与継続群で比較的早期の6週以後に菌数の減少が止まり、以後わずかながらも増加傾向を示したのはきわめて特徴的である。

以上マウスの種類および臓器に関係なく、無処置対照群の菌数はいずれも培地全面に集落が密発融合して計算不能なほど多数を示した。

4. 総括と考案

マウスの実験的結核症に対するKanamycin (KM)の単独治療効果については、すでに柳沢ら²⁾によつて報告された。すなわちKMの2mgはSMの1mg投与に匹敵し、KM 4mg投与は明らかに優れている。

われわれはKMの併用効果、すなわちKMとINHの併用効果をSMとINH、およびINH単独効果と比較し、同時に使用するマウス系統も結核菌に対して感受性の強いCF#1および抵抗性であるCFWの2種類を用い、感受性の強弱が結核菌感染によつて起る獲得免疫度に差が生じ、これが薬剤の治療効果にいかん影響されるか、また薬剤を一定期間投与し、ついで投与を中止して、以後のマウス体内における生菌の消長状態がいかに変動するか、さらに長期間の治療により各薬剤に対する耐性菌の発現状態を知るために比較検討した。

実験の結果、まず第一に体内生菌数の消長状態からみた各治療群の効果を比較すると、CF#1の肺ではINH単独群が結核菌感染3週後にやや減少するのみで、以後は一路菌数の増加がみられる。一方SMおよびKMの両併用群は菌数の減少が著明でINH単独群に比し、明らかに有効であることが認められた。ただしこ

の差は肝および脾ではほとんどない。しからば肺および肝における菌数の減少がやや早期にみられるので、KM併用の方がSM併用より効果が優れているが、KMはSMの2倍量の薬剤投与(1mg)を行つているのでこの点を考慮すれば両者の間にはまず差がないといふべきであろう。

なおINH単独群15週後の肺について行つた耐性検査の結果、治療中止、継続両群ともにINH、10γ完全耐性を示し、これに対してSMおよびKMの両併用群はINH、SM、KMの3剤に対していずれも1γ感性であった。このようにマウスの実験的結核症における治療実験で、INH単独治療では耐性菌の出現を示し、他薬剤との併用によつてこれが出現を阻止したという報告はわが国ではあまりないようである。したがつてこの面からみても、SMおよびKMの併用治療はINH単独より優れている。

次にCF#1の肺、肝、CFWの肺において、SMおよびKMの両併用群が一時的もしくは続けて培養陰性を示した。しかし脾では一時的にでも陰性を示した時期はない。すなわち、肺、肝の菌に対しては、これらの併用効果は比較的に著しいようであるが、脾内の菌に対してはその効果が弱いということがいえる。この点、McCuneら⁶⁾のマウス実験でSM・INH・PAS3者併用で肺内菌の陰性化はみられるが、脾内菌の陰性化はこれら3剤のいかなる組合せによつても困難であるという事実がみられ、また柳沢ら²⁾もKMの単独では肺内菌よりも脾内菌への効果が弱いことを認めており、われわれの今回の実験もKMはINHとの併用によつても脾内菌を消滅せしめることは一時的にもできなかったわけである。

次にCFWマウスの成績は意外なる事実遭遇した。すなわちINH単独群が感染36日より58日までの間に12匹、SM併用群は33日より50日までの間に19匹といずれもが全滅したことである。しかも剖検の結果は前者はかなりの結核性変化(主に肺)がみられ、その死因が結核症によるものであろうことは一応肯かれるわけであるが、SM併用群は軽度の脾腫のほかは、結核性変化はいずれの臓器にもほとんどみられていない。これら自然斃死例は心血および脾を血液寒天に培養しているが、死因になると思われる菌は1例も検出されてない。すなわちこの事実は結核症による死ではなく、他の原因、おそらくはSMの毒性による死ではなからうかと推察される。このことは肺、肝、脾いずれにおいても菌数の消長状態からみて、明らかにINH単独群より有効であることからみて妥当と思われる。なおこの点は第2報として報告する病理組織学的検査成績によつてこれを裏書きするような事実が見出されるかもしれない。もしもCFWマウスの自然死が、SMに

よる中毒死であるとするならば KM の毒性は SM のそれより弱く、CFW マウスはこれら抗生物質剤に対し、より著しい毒性を示すことが予想せられ、この点は今後さらに検討を要するところであろう。

5. む す び

結核菌に対して感受性および抵抗性マウスの実験的結核症に対して、INH 単独、INH+SM、INH+KM の併用治療効果を生存日数、主要臓器における生菌の消長状態から比較した。

1) INH と SM、あるいは KM との併用効果は INH 単独より明らかに優れており、SM および KM の併用は INH 耐性菌の発現を阻止した。

2) INH と SM、あるいは KM との併用効果の差は KM が SM の 2 倍量の薬剤を投与している点を考慮すると両者の有効性はほとんど同程度であると考えられる。

3) CFW 系マウスに対し、SM は毒性作用を示すようであるが、KM にはない。

4) 治療の経過中に臓器内生菌数を証明しえなかつた

場合があつたが、この後治療を中止すると再び生菌数が増加してくるところから、化学療法剤が殺菌的に作用したかどうかを確証するには薬剤投与を中止し、一定期間を経て臓器内の結核菌の培養検査により、生菌増殖の有無を調べることがぜひとも必要である。

本研究に対しては文部省科学研究費の補助がなされたこと、および本研究を実施するにあたり、種々御援助を戴いた東京大学伝染病研究所田嶋嘉雄教授および鈴木潔博士に対し謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) Umezawa, H., et al. : J. Antibiotics, 10 (A) : 181, 1957.
- 2) 柳沢謙 他 : 日本細菌学雑誌, 12 : 857, 昭32.
- 3) 同 上 : " , 12 : 919, 昭32.
- 4) 同 上 : " , 13 : 1, 昭33.
- 5) 同 上 : " , 13 : 95, 昭33.
- 6) McCune, R.M., et al. : J. Exp. Med., 104 : 737, 1956.