

マウス結核症に関する研究

第9報 マウス体内における INAH 耐性菌の出現について

渡 辺 元 洋

北里研究所 (指導 水之江公英博士)

受付 昭和 34 年 1 月 30 日

緒 言

化学療法剤の治療効果に最初は刮目し、大いなる希望がかけられたがその裏に菌そのものには有利であるが、患者にはきわめて不利の耐性の問題がひそんでいることが分つてきた。耐性こそ現在化学療法のもつとも大きい障壁といわねばならないであろう。

一般に動物体内では人体に比して耐性が発現しにくいといわれている。これに関しての数編の報告があるが、一方菌の増殖と、接触する薬剤濃度が適当であれば動物体内でも人体と同様な結果がでるのではないかともいわれている。

今回著者は強毒人型結核菌黒野株、H₃₇Rv 株および三輪株を感染させたマウスに、毎日 INAH 200 γ を経口投与して、INAH 耐性獲得の状態を定量培養により追求するとともに非投与群で菌株と毒力の関係を観察して、各菌株の毒力と INAH 耐性獲得の状態を比較検討し、次のごとき知見を得たのでここに報告し、大方の御批判を仰ぎたい。

実験材料および実験方法

1. 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。

H₃₇Rv 株、および三輪株の10日培養。

使用培地；小川培地。

使用動物；d d N- 系雄マウスの 14 g 前後のものを使用した。

使用薬剤；INAH は蒸溜水で溶解し、1 mg/cc とし て所要量 (0.2 cc) を経口的に投与した。

2. 実験方法

H₃₇Rv 株および三輪株は 0.1 mg を、黒野株では 0.01 mg, 0.1 mg, および 0.5 mg をマウスの尾静脈に感染した。

以上の感染マウス群を、毎日 INAH 200 γ 経口投与群と非投与の対照群とに分けた。対照群で観察中に斃死したマウスは剖見して肺の結核性病変によつて結核死であることを確認し、他の原因による死亡例は本実験より除外して正確を期した。生残マウスは感染第 3 週、第 5 週に一定数屠殺剖見し、肺の重量を測定後、定量培養

を実施して肺の菌数を測定した。

INAH 200 γ 経口投与群では第 3 週、第 5 週に分けて屠殺剖見し、肺の重量を測定し同時に肺中の生菌単位と、1 γ , 10 γ , および 100 γ /cc の割合に、INAH を混入した 3% KH₂PO₄ 培地の系列を用いて、INAH 耐性菌の出現状態を観察した。観察は培養 4 週後にその集落数を数えた。

実験成績

A) INAH 非投与対照各群の肺の重量ならびに菌数
(i) 対照各群の第 3 週および第 5 週の肺の重量および肺の菌数 (表 1)

黒野株 0.5 mg 感染群の第 3 週および第 5 週と黒野株 0.1 mg 感染群の第 5 週では生残マウスなく観察できなかった。肺の重量を比較すると黒野株 0.1 mg および 0.01 mg 感染の 2 群はともに、H₃₇Rv 株および三輪株感染群に対して、3 週では約 2 倍、5 週では黒野株 0.01 mg 感染群は後 2 者の約 2 倍弱の重さを示した。肺の菌数では、黒野株 0.1 mg 感染群は第 3 週で他の 3 群より約 10² 倍くらい多く、また黒野株 0.01 mg 感染群は H₃₇Rv および三輪株の 0.1 mg 感染群よりやや多い。後 2 者間では H₃₇Rv 株が三輪株より若干多い。第 5 週においては黒野株 0.01 mg 感染群がやはり H₃₇Rv および三輪株 0.1 mg 感染群より菌数が多く、H₃₇Rv 株これにつき、三輪株がもつとも少なかった。

表 1 対照各群の肺の重量ならびに菌数

感 染 菌 株 及 び 菌 量	感 染 生 菌 単 位	感 染 後 3 週		感 染 後 5 週	
		肺の重量	肺の菌数	肺の重量	肺の菌数
黒野 0.01 mg	13×10 ⁴	0.61 0.45	17×10 ⁶ 17×10 ⁶	0.60 0.50	5×10 ⁸ 18×10 ⁶
黒野 0.1 mg	15×10 ⁶	0.51 0.56	6×10 ⁸ 18×10 ⁸		
黒野 0.5 mg	6×10 ⁶				
H ₃₇ Rv 0.1 mg	3×10 ⁵	0.29 0.22	19×10 ⁶ 3×10 ⁶	0.30 0.35	13×10 ⁶ 3×10 ⁷
三輪 0.1 mg	4×10 ⁵	0.29 0.26	4×10 ⁶ 5×10 ⁶	0.31 0.36	9×10 ⁶ 5×10 ⁶

表3 INAH 投与各群の3週における
INAH 耐性菌の出現状況

感染菌株	マウス番号	肺の重量	培養成績							
			10 ⁻³				10 ⁻⁵			
			0	1	10	100	0	1	10	100
γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ			
黒野 0.01 mg	1	0.14	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.16	3	0	0	0	0	0	0	0
	3	0.58	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0.17	2	0	0	0	0	0	0	0
黒野 0.1 mg	1	0.17	18	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.17	33	11	11	0	0	0	0	0
	3	0.18	37	0	0	0	0	0	0	0
	4	0.13	48	20	30	0	0	0	0	0
黒野 0.5 mg	1	0.13	81	90	61	0	5	2	3	0
	2	0.14	195	73	61	0	5	0	0	0
	3	0.17	166	87	118	0	6	2	3	0
	4	0.12	195	18	12	0	8	0	0	0
H ₃₇ Rv 0.1 mg	1	0.22	5	1	0	0	0	0	0	0
	2	0.32	9	0	0	0	0	0	0	0
	3	0.26	2	0	0	0	0	0	0	0
	4	0.18	3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0.15	4	0	0	0	0	0	0	0
三輪 0.1 mg	1	0.22	126	0	0	0	2	0	0	0
	2	0.17	90	0	0	0	4	0	0	0

この意味からいえば H₃₇Rv および三輪株よりも黒野株は毒力の強いことを、また H₃₇Rv は三輪株より若干毒力の強いことを示しているといえよう。マウスの斃死状態をみると、黒野株 0.5 mg, 0.1 mg, 0.01 mg 感染群は全マウス斃死, H₃₇Rv 0.1 mg 感染群は 5 匹中 2 匹, 三輪 0.1 mg 感染群は 6 匹中 1 匹斃死, H₃₇Rv および三輪株 0.1 mg より黒野株 0.01 mg の強いことを示している。黒野株 0.5 mg, 0.1 mg, 0.01 mg の間では菌数においても、マウスの斃死状態においても菌量の多い方が肺の菌数も多く、マウスの斃死も早かった。

毒力と INAH 耐性との関係については安田⁵⁾ は人型結核菌 F 株感染マウスの 150 日間の治療実験において、INAH を同一動物に継続的に与えた場合耐性菌を認めなかつたが、1 カ月ごとにマウス体内を継代しながら、INAH を単独に与えたときは 2 代目に INAH 10 γ 耐性を認めたと報告、動物実験では臨床実験のごとく高度耐性菌の発現は困難であると述べている。北本⁴⁾ はマウスを使用して、INAH 耐性菌は、2 ~ 4 カ月では完全耐性は認められなかつたが、部分的には幾らかの耐性獲得の傾向を認めたと、一方、小田⁵⁾、及川⁶⁾、前田⁷⁾ は比較的早期に耐性菌は現われると述べている。

表4 INAH 投与各群の5週における
INAH 耐性菌の出現状況

感染菌株	マウス番号	肺の重量	培養成績							
			10 ⁻³				10 ⁻⁵			
			0	1	10	100	0	1	10	100
γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ			
黒野 0.01 mg	1	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.18	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	0.20	1	0	0	0	0	0	0	0
	4	0.17	卅	卅	卅	0	39	39	34	0
	5	0.23	1	0	0	0	0	0	0	0
黒野 0.1 mg	1	0.18	8	6	7	0	0	0	0	0
	2	0.21	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0.24	1	0	0	0	0	0	0	0
	4	0.18	91	96	91	0	5	2	2	0
黒野 0.5 mg	1	0.22	卅	卅	卅	104	10	9	7	0
	2	0.18	317	191	300	0	1	3	15	0
	3	0.21	131	142	90	0	4	2	2	0
	4	0.25	+	+	+	0	5	8	11	0
	5	0.17	卅	卅	卅	12	22	32	20	0
H ₃₇ Rv 0.1 mg	1	0.29	23	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.18	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0.19	4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0.96	6	0	0	0	0	0	0	0
	5	0.19	2	0	0	0	0	0	0	0
三輪 0.1 mg	1	0.21	19	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.15	11	0	0	0	0	0	0	0

Tompsett⁸⁾ は 0.1 γ 耐性菌は一般に早期に現われ、1 γ 耐性菌は 2 ~ 3 カ月で 30 % (各濃度ごとの耐性菌百分率) あるいはそれ以上に出現するといっている。

INAH 200 γ 経口投与群では 3 週後にすでに INAH 耐性菌を認めた。耐性菌の出現状態では黒野株感染群の 12 例中 6 例に INAH 10 γ 耐性菌を認めた。うち 2 例が 0.1 mg 感染群、残りの 4 例が 0.5 mg 感染群であつて、しかも前群の 2 例および後群の 4 例中 2 例は INAH 10 γ 完全耐性であつた。0.01 mg 感染群には耐性菌は認められなかつた。

H₃₇Rv および三輪株感染群では 7 例中 1 例に INAH 1 γ 耐性菌が見出された。このことは感染菌の毒力の強いほど、すなわち生物体内で増殖の強いほど耐性菌の出現の可能性を示している。またマウス個体において肺の菌数が多いほど耐性菌の存在することを岩下⁹⁾ は、黒野株を使用したマウス結核症の実験において述べている。しかし同一株(黒野株)の感染の場合肺の菌数の多いほど耐性菌の出現がみられるといえようが、黒野株と H₃₇Rv および三輪株感染群との比較では単に肺菌数の多いものほど耐性菌出現の可能性があるとはいえない。(表3,

4)。

すなわち三輪 0.1 mg 感染群の 3 週の肺の菌数は黒野 0.1 mg 感染群のそれよりも多いにもかかわらず耐性菌の出現のないのは、黒野株と三輪株とは INAH に対する態度の異なること、すなわち三輪株の方が INAH の抗菌力に対して強いためであろうと考えられる。

5 週後の観察では H₃₇Rv および三輪株感染群に耐性菌は認められないが、黒野株感染群では 0.5 mg に 5 例、0.1 mg に 2 例、0.01 mg の 1 例に耐性菌がみられ、0.01 mg の 1 例および 0.1 mg は 2 例とも完全 10 γ 耐性、0.5 mg では不完全 100 γ 耐性の 2 例と完全 10 γ 耐性の 3 例を認めた。すなわち 3 週に比して耐性菌出現の頻度が高くなっていること、高耐性獲得の傾向および完全耐性への移行を示していると思われる。

牛場¹⁰⁾ は結核菌の薬剤耐性について、細菌が薬物に耐性になる主因は一般に突然変異および選択によると考えられ、そのためには耐性を有する突然変異菌がでるだけの菌数に達することの必要と適当な濃度の薬剤との接触が必要と述べている。本実験においても同一菌株の場合は感染菌量の大きなほど、いろいろの菌株間では動物体内で増殖力の旺盛なほど、すなわち毒力の強い菌株ほど耐性菌が出現しやすくまた INAH と菌との接触期間の長いほど、耐性菌は出現しやすかつ耐性度も上昇し、不完全耐性が完全耐性へと移行する傾向を示している。

結 論

1) マウス体内における INAH 耐性菌の出現は、マウス体内での増殖力のもつとも強い黒野株において認められ、増殖力の弱い H₃₇Rv および三輪株ではほとんど認めることができなかつた。

2) 黒野株感染の場合感染菌量の多いほど耐性菌の出現の頻度は高かつた。

3) INAH 投与は期間の長いほどすなわち薬剤と菌との接触の長いほど、耐性菌の出現の頻度も高く、耐性度も上昇、不完全耐性が完全耐性へ移行する傾向を示した。

稿を終るに臨み、御校閲を賜つた牛場教授および御指導を戴いた水之江博士に深く感謝する。

文 献

- 1) 染谷四郎他：結核，26：28，昭26.
- 2) 金谷敏：日本細菌学雑誌，13：15，昭33.
- 3) 安田正憲：結核，30：89，昭30.
- 4) 北本治他：結核，29（増刊）：133，昭29.
- 5) 小田稔他：長崎医学会雑誌，29：570，昭29.
- 6) 及川芳雄他：抗酸菌病研究雑誌，9：235，昭28.
- 7) 前田甲子郎：結核，29：531，昭29.
- 8) R. Tompsett：Am. Rev. Tuberc., 70：91, 1954.
- 9) 岩下一郎：結核，32：489，昭32.
- 10) 牛場大蔵他：結核，30：114，昭30.