

マウス実験結核症における “Host-Parasite-Drug Relationship” について

金井 興美・中村 玲子

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 39 年 7 月 22 日

HOST-PARASITE-DRUG RELATIONSHIP IN EXPERIMENTAL MOUSE TUBERCULOSIS

Koomi KANAI and Reiko M. NAKAMURA*

(Received for publication July 22, 1964)

As first reported by McCune and Tompsett¹⁾, tubercle bacilli can persist, if not multiply, in the tissue of mice despite of prolonged treatment with antituberculous agents such as isoniazid, streptomycin and so on, but the bacilli remain sensitive to the drugs administered. On the other hand, Rees and Hart²⁾ recently presented an evidence that the persistence of tubercle bacilli in chronic mouse tuberculosis is due to “static equilibrium”, namely, the condition that the bacilli remain alive without multiplication. The above two informations suggest us a possibility that antituberculous drugs might not be effective against such non-multiplying tubercle bacilli in the tissue. Four mouse experiments were conducted by us to examine this possibility.

In the first experiment (Fig. 1), it was demonstrated concerning kanamycin that the drug could inhibit the initial multiplication of tubercle bacilli, but they persisted thereafter despite of the continuous administration of the drug as long as 9 weeks. The general pattern of the fate of the bacilli in the spleen were almost the same between the drug-treated group and the non-treated group. The combined use of cycloserine with kanamycin failed to increase the effect of the latter drug. In the second experiment (Fig. 2), kanamycin administration was started three weeks after infection expecting little effect on the course of infection from the view that the bacilli might be drawing near the multiplication-resting phase of infection, and the result was that the fate of bacilli was perfectly the same between the treated and non-treated groups in the period from 5 to 7 weeks. In the third and fourth experiments (Fig. 3, 4, 5 and 6), the mice were infected with non-multiplying but living cells of tubercle bacilli which were produced by bringing the culture of a streptomycin-dependent strain into the drug-starved condition. In this particular infection, kanamycin, isoniazid, and ethambutol were not effective, but in the control animals, where the infective agents were allowed to multiply under the supply of streptomycin, those drugs were effective.

These data appear to support an idea that antituberculous agents might be effective in vivo only against multiplying tubercle bacilli and ineffective against the non-multiplying ones which persist in the chronic phase of the disease.

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

化学療法は本来細菌学的治癒を理想とするものであるが、慢性感染症においては、多くの場合、臨床的治癒の段階にとどまるのは周知の事実である。ことに結核症に関しては、化学療法による感染菌を“eradicate”することはきわめて困難であり、その結果、死亡率は激減しながら感染者は残存し、また患者層が若年者から次第に壮・高年齢者の再発例に移動している近年の疫学的臨床的現実となつている。

私どもの研究室においては、長年、結核化学療法剤のスクリーニングテストを目的として、マウス、モルモットの実験結核症治療実験を繰り返しているが、ことにマウスにおいては対照薬剤として用いる Isoniazid, Streptomycin, Kanamycin 等によつてすら、分離培養陰性にいたるまで組織中の菌を根絶することは不可能であつた。この事実はすでに McCune と Tompsett¹⁾によつて指摘されており、長期にわたる強力な化学療法剤の投与にもかかわらず、マウス体内には感染菌が存続し、しかもこれらの菌は投与薬剤に対して耐性を獲得していない事実が強調された。他方、Rees と Hart²⁾によつて、マウスの感染慢性期における安定した菌数レベルは“Static equilibrium”によるものであり、菌が組織中において分裂増殖を停止したまま生存するものと証明された。

上述の2つの報告は、感染菌が分裂増殖を停止し単に病巣内で生残しつつある条件においては、化学療法の効果は期待できないという可能性を示唆している。この点は菌の薬剤耐性獲得とは別の面で、慢性感染症としての結核に対する化学療法の必然的な限界を意味するとも考えられ、同時に“Host-Parasite Relationship”にさらに“Drug”との関係が絡んで化学療法の総合的な結果がもたらされることを意味している。

著者らは上述の立場からこの問題の臨床的意義をも考慮し、Kanamycin を中心として化学療法剤の抗菌効果をマウスにおいて追求し、また、*in vitro*においてあらかじめ分裂増殖を停止せしめた結核菌を用いて感染し、これに対する薬剤投与効果をも検討した。これらの経験に基づき、また著者の結核感染論に関する以前の報告³⁻⁵⁾をも併慮し、“Host-Parasite-Drug Relationship”について考察を加えた。

実験材料と方法

動物：市販 dd 系マウスの雄、体重 15~18g 程度のものを使用した。

菌株：Sauton 合成液体培地上に発育中の牛型菌 Ravenel 株、小川培地発育の H₃₇Rv 株、Sauton 培地上、あるいは小川培地上発育の Streptomycin 依存株 18b を使用し、手振法で蒸溜水菌液として感染に供した。感染はすべて尾静脈内に行なつた。

感染菌数測定：脾あるいは肝を被検臓器とし、前者は全臓器、後者はその一部をとつて乳鉢に入れ、まず蒸溜水を用いて5倍乳剤とし、さらに1% NaOH を加えて10倍乳剤を調製した。これより蒸溜水を用いて10倍希釈系列を作り、これらの0.1 ml ずつを小川鶏卵培地（原液に KH₂PO₄ を1%に含有）に接種し、37°C 3週間放置後の発生集落数より臓器全体あるいはその10 mg 中の感染菌数を算出した。

使用薬剤：dihydrostreptomycin sulfate (SM), kanamycin sulfate (KM), isoniazid (INH), cycloserine (CS) および ethambutol (EB) を用いた。

実験成績

[実験 1]

この実験は KM, CS あるいはそれらの併用投与のマウス脾内感染菌数に及ぼす影響を比較的長期にわたつて観察したものである。81匹のマウスに Ravenel 株 10⁻⁸ mg ずつを静注感染し、これらを 19, 19, 19, 24 匹の4群に分けた。感染翌日、最後の群より4匹を殺して脾内分布菌数を分離培養してしらべ、この日より前3群に

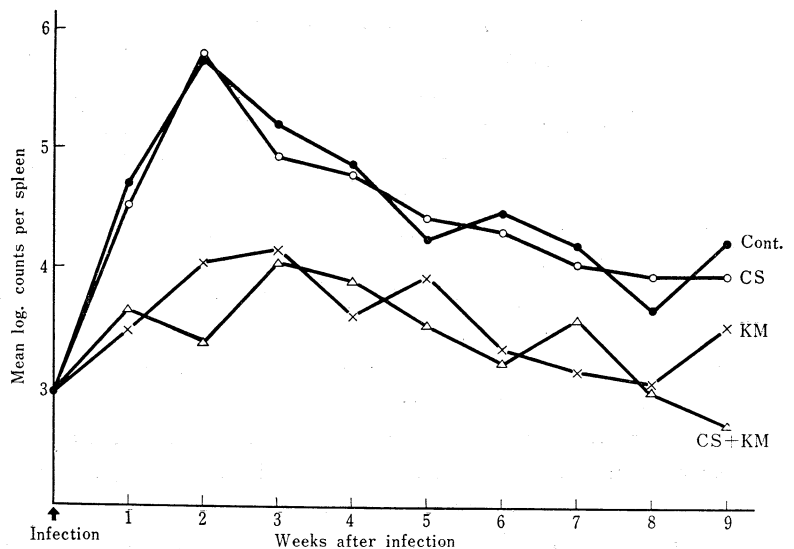


Fig. 1. The persistence of Tubercle Bacilli in the Spleen of Mice despite of Prolonged (9 weeks) Kanamycin-Treatment with or without Combined Administration of Cycloserine.

Cont.: Not treated, CS: Cycloserine-treated,

KM: Kanamycin-treated

対して KM, CS 単独, あるいは KM-CS 併用によつて 1 週 6 回, 9 週間連続投与を行なつた。1 日量はそれぞれ 2 mg で, 腹腔内に注射した。以後, 各群より毎週 2 匹ずつ無差別に選んで殺し, 脾内生菌数を定量培養により測定した。成績は Fig. 1 に示した。対照群においては, 感染菌は 2 週間に 1,000 倍ほどの増殖を示しており, それ以後菌数減少を示すが, その程度は次第にゆるやかとなり, 9 週にいたるも感染時の 10 倍以上の感染菌数を保っている。CS 治療群においては, その菌数消長は全く対照群と同じであるといえよう。すなわち, この実験条件においては, CS による治療効果は検出されなかつた。また KM 治療群と KM-CS 併用投与群においては, ほとんど同じ傾向の菌数消長を示し, 前 2 群と比べて明瞭であるが, 初期の感染菌増殖が抑制されており, 2 週後に 10 倍前後の増殖を来たしたにすぎない。そして 3 週においてピークを示して, 以後その菌数消長は前 2 群と全く平行関係を保ち, 薬剤投与を中止しても, 同じような菌数消長をたどつて, 感染が慢性化すると考えられ, その意味では治療の意味が存在しない。また CS の KM に対する併用効果も検出されなかつた。3 週以後における KM 投与の効果の有無に関してさらに次の実験を行なつた。

〔実験 2〕

24 匹のマウスを H₃₇Rv 株 0.01 mg を用いて静注感染し, 感染直後, 1, 2, 3 週目に 2 匹ずつ殺して型のごとく脾より菌分離培養を行なつた。3 週の培養終了後に, 残余動物を 8 匹ずつの 2 群に分け, その 1 群に対して KM 1 日量 2 mg を用いて 1 週 6 日連続腹腔内投与を行なつた。かくしてさらに感染後 4, 5, 6, 7 週目に両群より 2 匹ずつ殺し, 脾よりの分離培養を行なつた。成績は Fig. 2 に示した。KM の効果は 3~4 週においては表現されているが, 対照動物において感染菌数が減

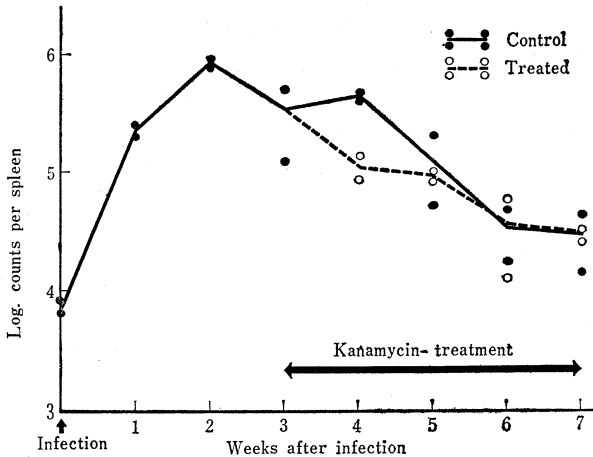


Fig. 2. Lack of Effectiveness of the Kanamycin-Treatment against the Decline Phase of Experimental Mouse Tuberculosis

少しはじめた 4 週以後においては全く証明されない。すなわち, 感染自体が自然的に減退期に向かう時期において, KM 投与はすでに無意味であるといえる。

〔実験 3〕

実験 1 と実験 2 の成績は緒言で述べたような仮説, すなわち, 生体内での投与薬剤の抗菌効果は, それが殺菌的であるにせよ静菌的であるにせよ, 分裂増殖中の結核菌にのみ有効であるとする立場より説明が可能であるが, この点を検討するため次の実験を行なつた。60 匹のマウスを 10 匹ずつの 6 群とし, そのうち 3 群は SM 100 r/ml 含有小川培地上に継代の SM 依存株 18 b の 0.2 mg を静注し, 他の 3 群はこの株を一度 SM 50 r/ml 含有の Sauton 培地上に移したのちさらに SM を含まぬ Sauton 培地に継代し, 残余増殖後発育の停止⁶⁾した菌膜より調製した菌の 0.4 mg で静注感染した。前 3 群に対しては 1 日量 10 mg の SM を 1 週 6 日連続投与して感染菌増殖を促し, 後 3 群に対しては SM 投与を行なわず生体内での分裂増殖を停止させた。また, いずれの 3 群とも, 対照群, INH 投与群 (1 日量 0.5 mg), KM 投与群 (1 日量 5 mg) とし, 感染翌日より腹腔内投与を 1 週 6 日連続して行なつた。感染後 3 時間, 以後は 1, 2, 3, 4 週にそれぞれ 2 匹ずつを殺して脾内生菌数を定量的に培養測定した。分離用培地には SM 100 r/ml 含有小川培地を使用した。成績は Fig. 3 と Fig. 4 に示した。Fig. 3 は SM 投与によつて感染菌を増殖せしめた場合であるが, 対照群においてみられるように 2 週後に 100 倍以上の菌数増加を示し, それ以後は徐々に減少

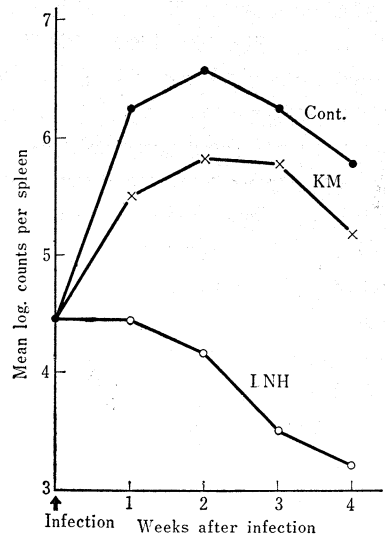


Fig. 3. Chemotherapy of Mice Infected with Streptomycin-Dependent Tubercle Bacilli Using Isoniazid or Kanamycin under the Supply of Streptomycin. Cont.: Not treated, KM: kanamycin-treated, INH: isoniazid-treated

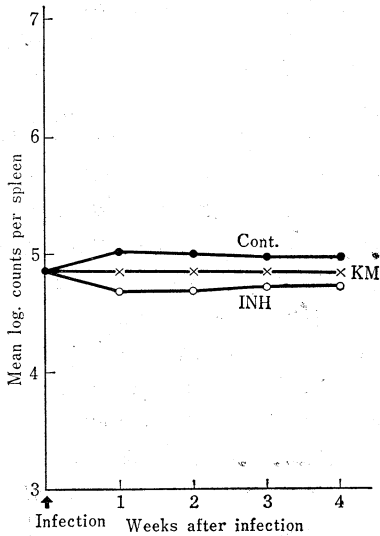


Fig. 4. Chemotherapy of Mice Infected with the Starved Streptomycin-Dependent Tubercle Bacilli Using Isoniazid or Kanamycin in the Absence of Streptomycin-Administration

する定型的な消長過程を示している。KM 投与群においては、対照群とほぼ同一傾向で消長しているが、菌数においては常に下まわり、格差のもつとも大きい感染 2 週目においては 1/10 ほどである。他方 INH 投与群においては、1 週後はやくも菌数の減少を示し、4 週後においては感染時の 1/10 以下になつていたので、上の 2 群との差は図の示すごとくきわめて顕著である。少なくともこの実験条件においては、KM は静菌的、INH は殺菌的に働くといえる。Fig. 4 は分裂休止菌感染による KM, INH の効果を見たことになるが、対照群の水平な菌数消長曲線の示すように、感染菌は感染時の分裂休止状態のまま生体内に残存したと考えられる。これに対する KM, INH の効果は図の示すごとくほとんど認められない。一つの模型実験ではあるが、生体内での分裂休止菌に対する化学療法の無効性を示している。

〔実験 4〕

実験 3 と同種類の試みを繰り返した。128 匹のマウスを 64 匹ずつの 2 群に大別し、一方には SM 50 γ /ml 含有 Sauton 合成培地上の SM 依存株 18 b の 0.1 mg を静注し、実験期間中 SM 10 mg を毎日投与した。他方には同株を SM を含まない Sauton 培地上に移し、2 週後、残余発育の完全に停止した培養の 0.1 mg を静注し、SM 投与を行なわなかつた。感染翌日、各群それぞれ 4 匹ずつを殺して、その肝の一定量を切除し、これらを集めて乳剤とし、SM 100 γ /ml 含有小川培地を用いて型のごとく感染菌の定量分離を行なつた。各

群の残り 60 匹はそれぞれさらに 15 匹ずつの 4 小群とし、それらを対照群（非治療群）、KM 投与群（1 日量 5 mg）、EB 投与群（1 日量 5 mg）、INH 投与群（1 日量 1 mg）とした。薬剤投与は 1 週 6 日、連続して行なつた。かくして感染後 2, 3, 4, 5, 7 週目に、各群より 3 匹ずつを殺して菌分離を行なつた。この間の感染菌数消長は Fig. 5 と Fig. 6 に示した。前者は実験期間中 SM の投与を受けたもの、後者は SM 投与を受けなかつたものである。Fig. 5 に示した対照動物の肝での菌数消長曲線は、著者のマウス脾に関する以前の経験⁷⁾と異なつて、SM 依存株は一定度の分裂増殖後、急激な菌数減少を示し、その傾向は少なくともこの実験期間中（感染後 7 週まで）は続いている。同系統のマウスの脾と肝とでこのように顕著な差がみられるのは注目すべきであるが、2 週までの菌数増加期に関して、KM は静菌的に、EB, INH は殺菌的に働いていることが分かる。しかし 2 週以後は対照群においても菌数減少が著明であるので、この間の投与薬剤の効果は認めることはできない。Fig. 6 では、対照動物での菌数消長は 7 週後まで終始徐々に下向しているが、7 週時においても感染直後の菌数の 1/10 程度までであり、この間における KM, EB, INH の抗菌効果にはみるべきものがない。

考 察

マウス実験結核症において感染菌が長期にわたつて残存する現象は、ヒトの慢性肺結核症の成立機序を研究する一つの好材料であるが、これは同時に、生菌免疫、あるいは感染免疫の内容を検討するに不可欠の素材でもあ

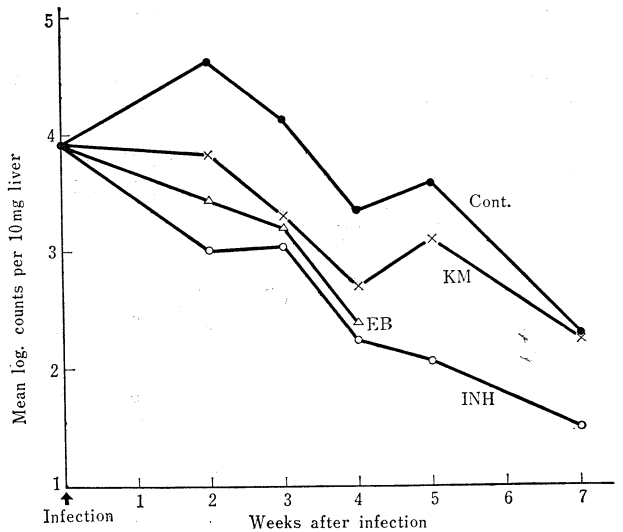


Fig. 5. Chemotherapy of Mice Infected with Streptomycin-Dependent Tubercle Bacilli Using Kanamycin, Isoniazid, or Ethambutol under the Supply of Streptomycin. Cont.: Not treated, KM: kanamycin-treated, INH: isoniazid-treated, EB: ethambutol-treated

る。著者はすでに SM 依存株を SM 飢餓状態として得た分裂休止菌を用いてこの面を研究し、生菌免疫の本態はあくまでも二次感染菌に対する静菌効果（分裂増殖阻止）であり、またその結果、分裂増殖を停止した感染菌はそのまま生菌免疫力と平衡関係を保つて生残のみを続ける可能性を指摘した³⁻⁵⁾。ここに、感染は慢性化し、Host と Parasite との関係がある意味で不関性となることが認められる。すなわち、感染菌が初期に増殖しても、それに伴って抗菌免疫力が発生してくれば、菌の増殖は阻止され、ある一定の時期には免疫力と菌力との釣合のとれた状態が招来される。結核化学療法は長期にわたる薬剤投与を必要とするので、当然のことではあるが、上述のような菌と宿主との相互関係によって生ずる感染菌の分裂、あるいは分裂休止状態を考慮する必要がある。感染菌が生体内で分裂中においてのみ、投与薬剤は有効であり、感染免疫力によって菌の分裂が休止する時期にはその投与効果は期待できないことを示している。もちろん、マウスでの人工的な感染と異なり、ヒトの結核症においては、各病巣での菌の生理的条件が異なり困難であろう。近年、強力ないくつかの抗結核剤の出現によつて、初感染がそのまま成人結核に移行する例は激減している。しかし、薬剤投与によつて初感染時に増殖阻止された感染菌が、時を得て分裂増殖を再開する可能性もあるわけで、この問題は難治結核症にみられる薬剤耐性菌とは別の意味で将来の研究課題であろう。

したがって現実的な問題として、結核化学療法剤としては静菌的なものよりも殺菌的な効果を持つものが望ましく、また、分裂中、休止中のいずれの菌細胞にも有効な薬剤が理想である。マウス実験結核症において示された INH, pyrazinamide 併用の“eradicative”な効果^{2,8)}はその意味で重要な所見であろう。われわれも、CS が細胞壁合成阻害剤という見地から KM との併用を試みたが、“eradicative”な結果は得られなかつた。しかし、この方面の努力は今後も折にふれて繰り返していくことが必要であろう。またここでの実験的経験から、臨床上の抗結核剤投与を考慮すれば、菌の分裂増殖がさかんで病勢の急進している場合に、できるだけ集中的に、そして許される範囲の多量を用い、しかも殺菌的な薬剤を選ぶことが望ましいといえる。感染菌の分裂増殖が停止し、病勢が安定した場合には、その後の薬剤投与は、再発阻止というむしろ消極的な意味をもつものと考えられる。もちろん、成人結核症における疾病自体の複雑性からむ薬剤投与の問題は、条件の単純化されたマウス実験結核症での所見のみからは説明されにくいかもしれない。ただ、われわれは、今日臨床的に使用されて

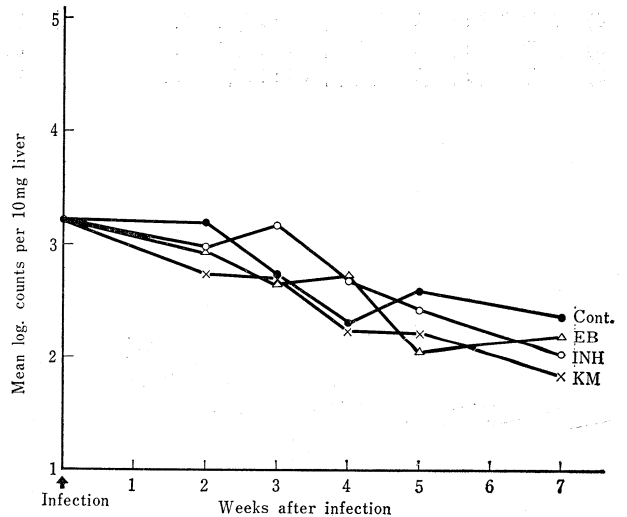


Fig. 6. Chemotherapy of Mice Infected with the Drug-Starved Streptomycin-Dependent Tubercle Bacilli Using Kanamycin, Isoniazid, or Ethambutol in the Absence of Streptomycin-Administration.

いる多くの抗結核剤も、すべて、はじめはマウス、モルモットでの知見でその価値を認められたものであるという事実に自信をもち、実験的に示されるように、生体内での感染菌の分裂増殖停止という菌の生理的条件が、宿主の免疫力の影響下に招来されうるといふこと、そしてそのことが、抗結核剤の効果と必然的なつながりをもつという点を、臨床的にも常に考慮に入れるべきであると主張したい。

結 論

マウス実験結核症においては、抗結核剤の殺菌作用、静菌作用は、分裂増殖中の感染菌に対してのみ有効であることが認められた。したがって、感染菌が宿主の免疫力の影響下にすでに分裂増殖を停止し、単に生残している慢性結核症においては、化学療法の効果はあまり期待できない。すなわち、結核化学療法の総合的な姿は“Host-Parasite-Drug Relationship”として把握すべきであり、その臨床的意義についても推論を行なつた。

室橋部長の御校閲、ならびに実験における田村恵子氏の御協力に感謝する。なお、本研究所抗生剤部長海沢博士より、種々ご意見をいただいたことに対しても、あわせて謝意を表明する。

文 献

- 1) McCune, R. M. Jr. and Tompsett, R.: J. Exp. Med., 104: 737, 1956.
- 2) Rees, R. J. W. and Hart, P. D'Arcy: Brit. J. Exp. Path., 42: 83, 1961.
- 3) 金井興美: 医学と生物学, 65: 18, 1962.

- 4) 金井興美：医学と生物学, 65: 56, 1962.
- 5) 金井興美：医学と生物学, 65: 70, 1962.
- 6) 金井興美：医学と生物学, 64: 147, 1962.
- 7) 金井興美：医学と生物学, 65: 93, 1962.
- 8) Mc Cune, R. M. Jr., Tompsett, R. and McDermott, W.: J. Exp. Med., 104: 763, 1956.