

# INH 耐性結核菌に対する 1314 Th と INH 併用効果 についての実験的研究

## 第2報 マウス実験結核症に対する併用効果

野 崎 昭 雄

東京医科歯科大学第二内科 (指導 大淵重敬教授)

受付 昭和 39 年 3 月 13 日

### EXPERIMENTAL STUDIES ON EFFECT OF COMBINED USE OF 1314Th AND INH TO INH-RESISTANT TUBERCLE BACILLI

#### 2. Combination effect in the experimental tuberculosis of mice

Teruo NOZAKI\*

(Received for publication March 13, 1964)

Using CF #1 male mice infected with 50  $\gamma$ /ml-INH-resistant H<sub>37</sub>Rv, the author examined the effect of combined use of 1314 Th and INH to INH-resistant tubercle bacilli.

Mice were divided in the following five groups.

Group 1: No treatment.

Group 2: Treated with 500 $\gamma$  of INH every day.

Group 3: Treated with 500 $\gamma$  of 1314Th every day.

Group 4: Treated with 500 $\gamma$  of 1314Th and 100 $\gamma$  of INH every day.

Group 5: Treated with 500 $\gamma$  of 1314Th and 500 $\gamma$  of INH every day.

Consequently, the tuberculous involvement of the fifth group was the slightest both in the number of viable units recovered from the lung and in the histological findings. There was observed no significant difference between the third and the fourth group.

These results *in vivo* are quite in agreement with those *in vitro* described in the author's first report. Thus the effect of 1314 Th is enhanced by the combination with INH, even in the case of INH-resistant tubercle bacilli.

\* From Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine.

#### 緒 言

INH 耐性菌を有する肺結核患者に対し、1314 Th (以下 TH) に INH をあえて併用することは、TH, KM, CS 併用に劣らぬ好成績を得るとする著者の教室における臨床的な経験に基づいて、INH 耐性菌に対する TH と INH の併用効果とその作用機序を *in vitro* において証明することを試み、第1報<sup>1)</sup>において報告した。それによれば、Dubos 液体培地、Kirchner 液体培地および小川式直立拡散法を応用した方法によるいずれの場合でも、

INH 耐性菌に対して、TH と INH を併用して、TH 単独以上の効果が認められた。その作用機序としては、TH に接触することによつて、結核菌の INH に対する耐性が減弱してくる事実も認められたが、その他に、それぞれ単独では十分な静菌効果が得られない程度の TH と INH が共存することによつて十分な静菌作用を示すようになる可能性も考えられた。

いずれにしても、著者の教室において、臨床的に経験した INH 耐性菌に対する TH と INH の併用による併用効果<sup>2)3)</sup>を、*in vitro* の実験でも確認しえたので、その

後著者はさらに、INH耐性菌感染によるマウス実験結核症に対して、同様な効果が認められるかどうかを追求した。以下その成績について述べる。

## 実験方法

### 1. 実験動物

均一系マウスである CF #1 系（実験動物中央研究所産）の生後 42~44 日の雄 70 匹を使用した。平均体重は 25g であった。

飼育は小麦と、砕いた煮干を 10:1 の割合に混ぜて与え、飼料も水も制限せず任意の量だけ摂取せしめた。

### 2. 接種菌株および感染方法

接種菌は結核予防会結核研究所より分与された H<sub>37</sub>Rv・INH 50r/ml 完全耐性菌を用いた。接種菌液の調整は、あらかじめ INH 50r/ml 含有の 3% 小川培地にて、2 週間培養した新鮮菌を用いて、グラスホモジナイザーにより生理食塩水にて均等化し、Optical Density が 610  $\mu$  で 0.1 になるように希釈し、その 0.2 ml ずつを全マウスの腹腔内に接種した。

この調整された菌液 0.2 ml 中には、定量培養により、 $46 \times 10^4$  の生菌数を確認した。なお結核菌接種に先立ち、前処置として水性ペニシリン 300 単位ずつを背部皮下に注射した。

### 3. 薬剤投与方法

菌接種後 2 週間は無治療のまま観察し、2 週経過後に 5 匹を屠殺し、その後次の 5 群に分けて治療を開始した。

- すなわち
- 第 1 群： 対照群（無治療）
  - 第 2 群： INH 500r 単独連日群
  - 第 3 群： TH 500r 単独連日群
  - 第 4 群： TH 500r + INH 100r 併用連日群
  - 第 5 群： TH 500r + INH 500r 併用連日群
- とした。

なお INH は市販の注射液から生理食塩水で無菌的に希釈して、0.2 ml 中に INH 100r および 500r を含有するように調整し、これを背部皮下に注射した。

また TH は、あらかじめ一定量を計って、100% エチルアルコールで溶解し、これを多数の小試験管に一定量ずつ分注してから沸騰水中にてアルコールを蒸発せしめ、これを無菌的に保存しておいて、使用時に 1 ml のプロピレングリコールにて温めながら溶解せしめたのちさらに生理食塩水を用いて 0.2 ml 中に 500r を含むように希釈して、この 0.2 ml ずつをマウスの腹腔内に注射した。この方法によれば、連日の注射液の調整がきわめて容易に行なえる。

### 4. 観察方法

菌接種後 2 週目に 5 匹を屠殺し、以後治療 3 週目および 6 週目に各群からそれぞれ 5 匹ずつ断頭屠殺し、剖検

した。

これらの各マウスについては、脳も含めて、全身各臓器の肉眼的所見の観察のほか、左肺よりの肺内結核菌の生菌数の定量培養と、右肺、肝、脾、腎、心についてのヘマトキシリン・エオジン染色を行なつて各群の治療効果を比較した。

左肺からの結核菌定量培養は、まずトーションバランスで mg 単位まで正確に重量を測定し、グラスホモジナイザーに入れて、19 倍量の 1% NaOH を加えて 20 倍に希釈し、十分均等に摩滅せしめ、この液からさらに 1% NaOH で 200 倍、2,000 倍希釈まで作り、この 3 段階に希釈された臓器均等液を、おのおの 3 本ずつ合計 9 本の 3% 小川培地に、マイクロピペットを用いて 0.1 ml ずつ正確に定量培養した。

しかして、もつとも 100 コロニーに近い希釈段階を採用して、その 3 本の平均値から、臓器 10mg 中の生菌数を算出した。

一方、これらの治療効果判定のほか、残りの 15 匹を 5 匹ずつの 3 群に分け、INH 100r および 500r 皮下注射と、TH 500r 腹腔内注射を行なつて、1 時間目の INH または TH の血清中濃度を測定した。

それには、屠殺前にラボナール 0.1 ml の腹腔内注射を行なつて全身麻酔をし、無菌的に胸壁外の皮膚および筋肉を切開して空所を作り、鎖骨下動脈を切断して、その空所に噴出した血液を採血する方法を考案した。しかして 1 匹から 0.5 ml ずつ採血して、各群 5 匹ずつの血液を混和し、その血清から小川<sup>4)</sup> および大貫<sup>5)</sup> の方法に従つて直立拡散法により INH または TH の血清中濃度を測定した。

## 実験成績

### 1. 肺内結核菌定量培養成績

肺 10mg 中の生菌数は表 1 のごとくであり、各群の経過を、実数の平均値の対数で表すと図 1 のごとくなる。

これらの表および図から、INH 単独投与群は、対照群と全く差がなく、この菌が INH 耐性菌であり、INH による治療には全く反応していないことがよく認められた。

一方 TH を含む治療を行なつた他の 3 群は、かなり治療効果が高く、対照群および INH 単独群では、6 週目には一そう生菌数が増加していたのとは逆に、これらの TH 治療の 3 群はすべて 6 週目には生菌数も全く認めなかつた。なかでも TH と INH 500r 併用群は、TH 単独群および TH と INH 100r 併用群より一そう早く効果が現われる傾向がうかがわれ、3 週目からすでに生菌を認めないまでになつており、TH と INH の併用による効果を示したものと思われた。

Table 1. Number of Viable TB-Bacilli in 10mg of the Lungs

Pretreatment	Groups	Posttreatment	
		3 weeks	6 weeks
75( $\times 10^2$ ) 85 15 15 40	Control (No treatment)	24( $\times 10^3$ )	1000( $\times 10^3$ )
		7	400
		128	160
		90	105
		5	170
	INH 500r	15( $\times 10^3$ )	170( $\times 10^3$ )
		177	18
		21	286
		50	47
		79	900
	TH 500r	1( $\times 10^3$ )	0
		0	0
		0	0
		0	0
		4	0
	TH 500r + INH 100r	2( $\times 10^3$ )	0
		0	0
		0	0
		0	0
		0	0
	TH 500r + INH 500r	0	0
		0	0
		0	0
		0	0
		0	0

Fig. 1. Means of the Number of Viable TB-Bacilli in 10mg of the Lungs

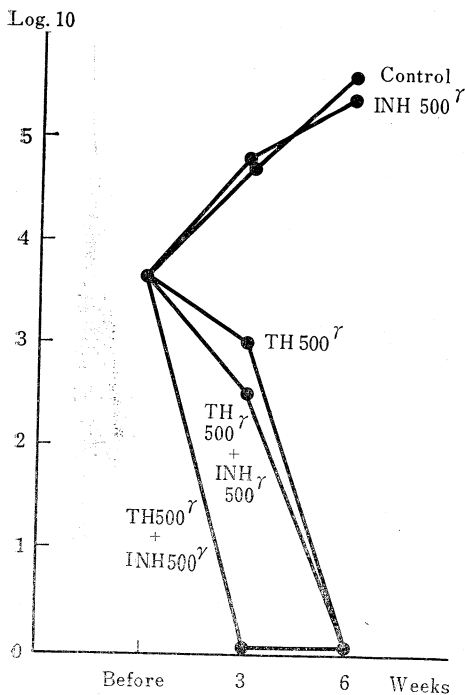


Table 2. Histo-pathological Findings

Pretreatment	Groups	Posttreatment	
		3 weeks	6 weeks
+	Control (No treatment)	+	+
		±	±
		±	±
		±	±
		±	±
	INH 500r	+	±
		+	±
		+	±
		±	±
		±	±
	TH 500r	±	+
		±	+
		+	+
		+	+
		-	+
	TH 500r + INH 100r	±	-
		±	+
		+	+
		±	+
		±	+
	TH 500r + INH 500r	-	+
		±	-
		±	±
		-	±
		-	-

- : No tuberculous lesion  
 ± : Very slight lesion  
 + : Lesions below 10% of total lung  
 † : Lesions covering 10~25% of total lung

2. 病理組織学的所見

肝, 脾, 腎, 心には, 全群とも, ごく一部に, わずかな病変を認める程度であつた。

肺内病変に関しては, 表2のごとく, 治療3週目および6週目とも, INH単独群には, 対照群と大差ない進行性の病変が認められていたことは肺内生菌数の場合と全く同様の傾向であつた。

TH単独群は, いく分これら2群より病変が少なく, かつ滲出傾向も少なかつた。

THとINH 100r併用群は, TH単独群と大差を認めなかつたが, THにINH 500r併用群は, 対照群はもとより, TH単独群およびTHとINH 100r併用群よりも病変も少なく, かつ滲出傾向もほとんど認められなかつた。これらの組織学的所見は図2~12によく表われている。

3. 血清中濃度測定成績

INH 100r, 500r および TH 500r をそれぞれ単独に与えた各群の血液について, 方法の項でのべたように, 各群の平均値としての血清中濃度を測定したが, その成績は, INH 100r および 500r 皮下注射1時間後のINH血清中濃度は, それぞれ 0.46r/ml および 1.30r/ml であつた。また, TH 500r 腹腔内注射1時間後の血清中濃度は 78.0r/ml を示していた。

## 考 察

マウスを用いた実験結核症においては、染谷<sup>6)</sup>、大貫<sup>7)</sup>の強調しているように、個体差からくる病変の相違をできるだけ除外するために、実験条件をとくに厳しく規定する必要がある。

そこで本実験においては、均一系マウスの中でも、実験結核症に適した系統と認められているものの一つである CF #1 系マウスを用い、性を雄に統一し、生後日数を 42~44 日に揃えた。また感染菌としては毒力の安定した H<sub>37</sub>Rv 株を用い、接種菌量についても 1 匹当りの接種生菌数をはば一定にするよう心掛けた。

腹腔内感染という方法については、この感染法による全身各臓器とくに肺への結核菌のリンパ行性および血行性の拡散、撒布の仕方について、すでに加藤<sup>9)</sup>や大貫<sup>7)</sup>の、マウスによる詳細な研究が行なわれており、腹腔内感染マウス結核症による治療実験が十分可能な方法であることが証明されている。

さて、このような統一された実験条件のもとに 5 群に分けられたマウスの示した治療成績は、肺内生菌数からみても、また肺の病理組織学的所見からみても、TH と INH 500r 併用群において、明らかに TH と INH との併用による併用効果があつたことを示していた。

このことは第 1 報<sup>1)</sup>における *in vitro* の実験による成績と全く同一の結果であり、INH 耐性菌であっても、TH に INH を併用することの価値を一そう裏づけるものであつた。

ところでこの場合に、TH に INH 100r 併用群は、TH 単独群と大差ない成績であつたということは興味ある問題である。

すなわち、第 1 報における *in vitro* の実験によれば、Dubos 液体培地または Kirchner 液体培地内では、INH 1r/ml 以上共存するときに TH との併用効果が認められるという成績であつたが、マウスの場合でも、TH との併用効果を示した INH 500r 皮下注射のさいは、1 時間後の血清中濃度が 1.30 r/ml であり、併用効果を示さなかつた INH 100r 皮下注射後 1 時間目の血清中濃度は 0.46 r/ml であつたということは、*in vitro* における成績とよく符合するものごとく思われた。

もちろん血清中濃度がそのまま組織中の結核菌と接触する濃度にはならないが、少なくとも、一定量以上の濃度の INH が TH と共存したときに相乗効果が現われるという点においては共通した成績であり、そしてその限界の濃度が 1r/ml 前後であるように思われる成績であつた。

ところで、TH 未接触の人型結核菌に対する TH の試験管内の最低発育阻止濃度は、Rist ら<sup>9)10)</sup>によれば、Youmans 培地で 0.6~1.2 r/ml、Dubos 培地で 2.5~

5 r/ml、Loewenstein-Jensen 固形培地で 10 r/ml、戸田ら<sup>11)</sup>は Kirchner 培地で 1.0 r/ml、林ら<sup>12)</sup>は 1% 小川培地で 20 r/ml、Brouet ら<sup>13)</sup>は Youmans 培地で 1.2~2.5 r/ml、Steenken ら<sup>14)</sup>は Dubos 培地で 1.6 r/ml、Proskauer-Beck 培地で 12.5 r/ml、堂野前ら<sup>15)</sup>は Dubos 培地で 1~5 r/ml、1% 小川培地で 10~25 r/ml、北本ら<sup>16)</sup>は Youmans 培地で 2~5 r/ml となつており、培地によつて最低発育阻止濃度に差がみられるが、液体培地では 0.6~5 r/ml、固型培地では 10~25 r/ml の間にあるようである。またとくに直立拡散法によつて最低発育阻止力をみた大貫<sup>5)17)</sup>らの成績では、TH 3~4 r/ml で H<sub>37</sub>Rv 株の発育阻止を認めている。

一方、今回の著者の実験で、TH 500r 腹腔内注射後 1 時間目の TH 血清中濃度が、直立拡散法で 78.0 r/ml であつたということは、前記の試験管内最低発育阻止力の成績と比較すれば、TH 単独でもきわめて高い静菌効果が得られる量であつたことが考えられ、そのために、TH 単独群でも 6 週目には生菌を認めないまでに効果が現われたものと判断される。

そして、そのような場合でも、INH 500r 併用群はその TH の効果を一そう高め、かつ速めたことになる。

これらの成績および第 1 報<sup>1)</sup>の *in vitro* の成績からみて、著者の教室における、INH 耐性菌を有する患者に対して、TH に INH を併用することは、十分価値のある治療法であるという臨床的経験を実験的にも十分裏づけることができたといつてよからう。

## 結 語

CF #1 系雄マウス 70 匹を用い、H<sub>37</sub>Rv・INH 50 r/ml 耐性菌の腹腔内感染による実験結核症について、肺内生菌数および病理組織学的所見から、TH と INH との併用による併用効果を検討した結果次の結論を得た。

1) TH 500r と INH 500r 併用群は、明らかに併用効果を認めた。

2) TH 500r と INH 100r 併用群は、TH 単独群と大差を認めなかつた。

3) そのさい、INH 500r および 100r 皮下注射 1 時間後の INH 血清中濃度は、それぞれ 1.3 r/ml および 0.46 r/ml であり、TH との併用効果を示した INH 濃度が、1 r/ml 以上であつたという第 1 報で認められた液体培地における成績と類似の成績であつた。

4) これらの成績から、INH 耐性菌を有する患者に、TH と INH の併用を臨床的に応用することは十分価値があるものと思われた。

終りにのぞみ、終始御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜つた東京医科歯科大学第二内科大淵重敬教授、藤森岳夫助教授、大貫稔講師に深く感謝致します。また御

(Nozaki, T.)

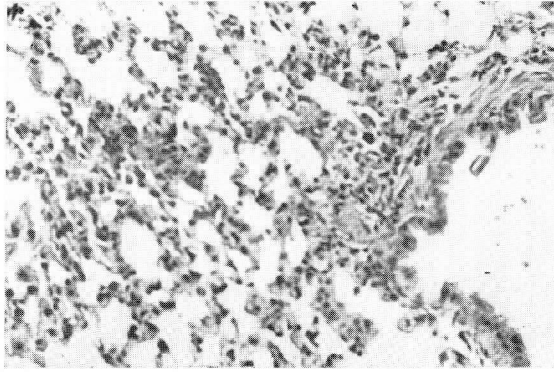


Fig. 2. Pretreatment, 2 weeks after inoculation : acute slight lesion.

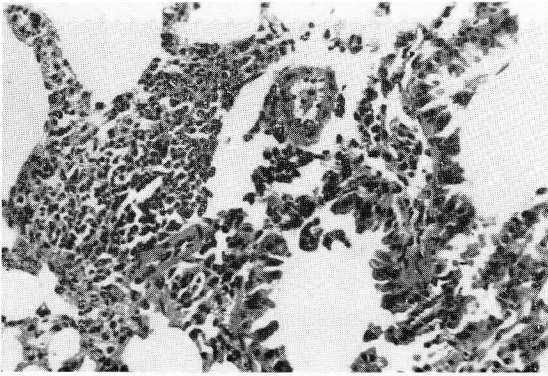


Fig. 3. Control, 3 weeks :

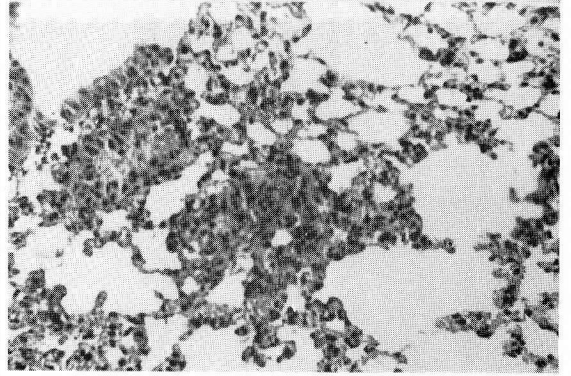


Fig. 4. Control, 6 weeks :

progressive and expansive lesions.

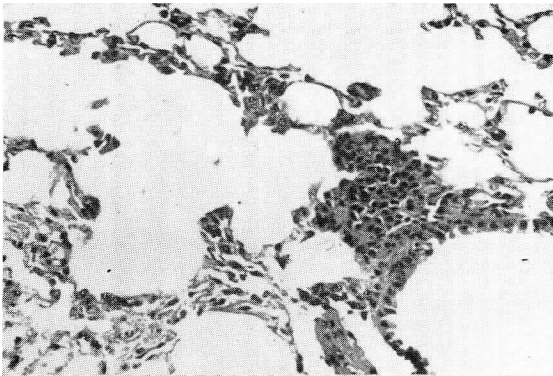


Fig. 5. INH 500 $\gamma$ , 3 weeks :

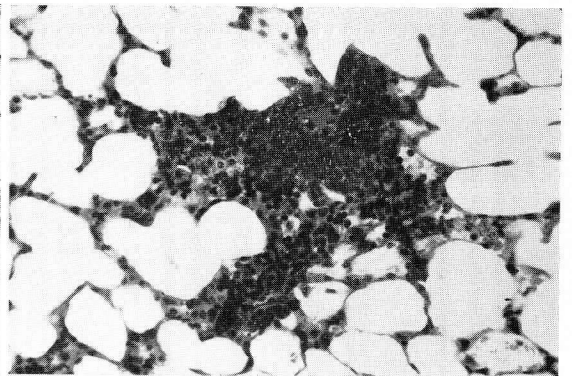


Fig. 6. INH 500 $\gamma$ , 6 weeks :

progressive lesions.

(Nozaki, T.)

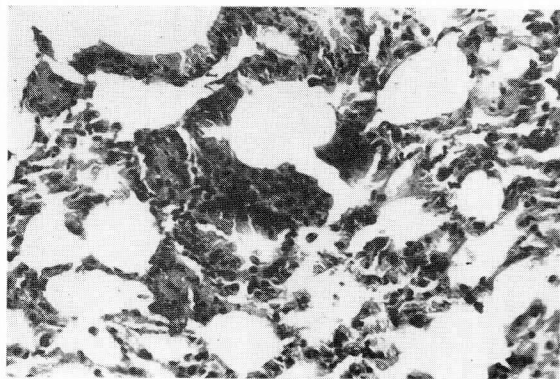


Fig. 7. TH 500 $\gamma$ , 3 weeks :

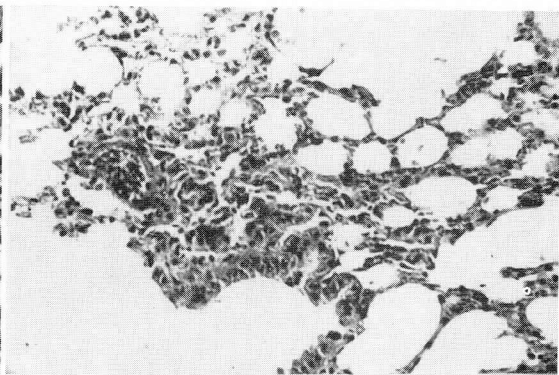


Fig. 8. TH 500 $\gamma$ , 6 weeks :

fairly resolved and proliferative lesions.

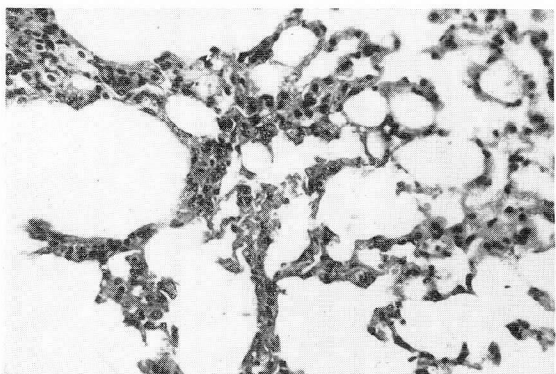


Fig. 9. TH 500 $\gamma$  + INH 100 $\gamma$ , 3 weeks :

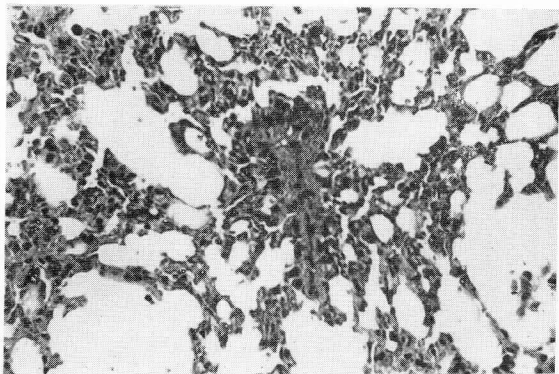


Fig. 10. TH 500 $\gamma$  + INH 100 $\gamma$ , 6 weeks :

similar lesions with those of group 4.

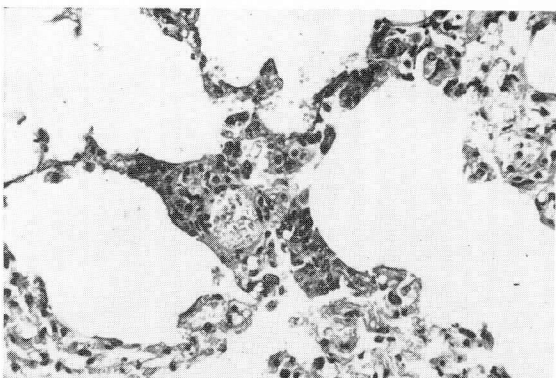


Fig. 11. TH 500 $\gamma$  + INH 500 $\gamma$ , 3 weeks :

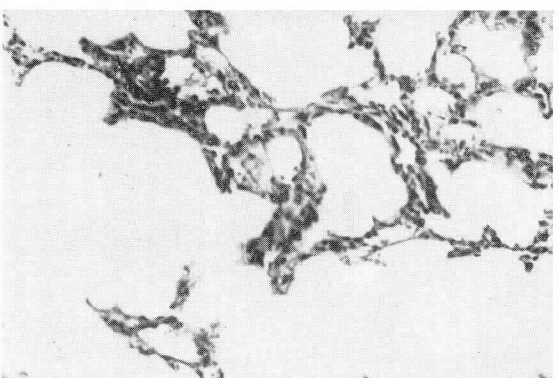


Fig. 12. TH 500 $\gamma$  + INH 500 $\gamma$ , 6 weeks :

mostly slight and productive lesions.

協力頂いた医局諸先生および霞ヶ浦分院中央検査室名位  
に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 野崎：結核, 39 : 6, 217, 1964.
- 2) 大淵他：日本胸部臨床, 20 : 682, 1961.
- 3) 大淵他：治療, 44 : 2217, 1962.
- 4) 小川：日本胸部臨床, 16 : 417, 1957.
- 5) 大貫他：日本胸部臨床, 20 : 881, 1961.
- 6) 染谷他：日本臨床結核, 15 : 28, 1956.
- 7) 大貫：結核研究の進歩, 28 : 183, 1960.
- 8) 加藤：医学と生物学, 32 : 314, 1954.
- 9) Rist, N. : Bull. Intern. Union. Tuberc., 28 : 208, 1958.
- 10) Rist, N. et al. : Am. Rev. Tuberc., 79 : 1, 1959.
- 11) 戸田他：日本臨床結核, 18 : 862, 1959.
- 12) 林他：日結研 (1960, 4).
- 13) Brouet, G. et al. : Am. Rev. Tuberc., 79 : 6, 1959.
- 14) Steenken, W. et al. : Am. Rev. Resp. Dis., 81 : 761, 1960.
- 15) 堂野前他：日本医事新報, 1897 : 9, 1960.
- 16) 北本他：最新医学, 15 : 2988, 1960.
- 17) 大貫他：日本胸部臨床, 21 : 624, 1962.