

薬剤耐性菌感染に関する研究

第4編 低耐性菌感染に関する実験的研究

大里敏雄・工藤賢治・青木正和

結核予防会結核研究所

受付 昭和43年9月14日

STUDIES ON THE INFECTION OF DRUG RESISTANT TUBERCLE BACILLI*

Part 4. Experimental Studies on the Infection of Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli

Toshio OHSATO, Kenji KUDOH and Masakazu AOKI

(Received for publication September 14, 1968)

The results of experimental studies on the infection of SM or INH low-grade-resistant tubercle bacilli were reported. The methods and results of experiments were as follows:

1. The infection of SM low-grade-resistant tubercle bacilli

1) First experiment

24 guinea pigs and 30 mice were infected intravenously (0.1 mg in the former and 0.01 mg in the latter) with Kurono strain grown in SM 1 mcg containing Dubos medium (SM sensitivity of bacilli is demonstrated in Table 2), and each of them were divided into three groups. i.e., in guinea pigs, treated with SM 10 mg, KM 20 mg, and the control; and in mice, treated with SM 1 mg, KM 2 mg, and the control. The treatment started at 3 weeks after inoculation and continued for 4 weeks. As shown in Table 1, SM was ineffective on the animals infected with SM low-grade-resistant tubercle bacilli. SM resistance of tubercle bacilli isolated from viscera of animals showed the increase of resistant population for 10 mcg SM (Table 2).

2) Second experiment

6 guinea pigs were infected with 0.1 mg of SM low-grade-resistant tubercle bacilli subcutaneously and 6 guinea pigs were infected with 0.01 mg of the same strain intravenously and sacrificed at 6 weeks after inoculation. SM resistance of tubercle bacilli isolated from the spleen of guinea pigs showed the increase of resistant population for 10 mcg of SM, and the increase of resistant population was observed also in the examination of the subculture of the bacilli which was used for the infection (Table 3).

30 mice were examined by the same method as in the first experiment. As shown in the lower part of Table 1, SM treatment for mice infected with SM low-grade-resistant tubercle bacilli demonstrated no therapeutic effects. Tubercle bacilli isolated from the lung of mice also showed the increase of resistant population for 10 mcg SM.

2. The infection of INH low-grade-resistant tubercle bacilli

1) First experiment

24 guinea pigs and 30 mice were infected intravenously with Kurono strain grown in 0.02

* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

mcg INH Dubos medium (INH sensitivity of bacilli was demonstrated in Table 5.), and each of them were divided into 3 groups: i.e., in guinea pigs, treated with INH 2 mg, 0.5 mg and the control; and in mice with INH 0.2 mg, 0.05 mg and the control. The treatment was started at 3 weeks after the inoculation and continued for 4 weeks. As shown in Table 4, the therapeutic effects were seen in the treatment groups according to the dosage of INH given. INH resistance of tubercle bacilli isolated from viscera of animals showed the marked decrease of resistant population for 0.02 mcg of INH (Table 5).

2) Second experiment

6 guinea pigs were inoculated subcutaneously and 10 mice intravenously with Kurono strain grown in 0.05 mcg INH containing medium and sacrificed at 6 weeks after inoculation. Tubercle bacilli isolated from the spleen of guinea pigs and the lung of mice showed the decrease of INH resistance (Table 6). The same number of guinea pigs and mice were infected by the same methods mentioned above with Kurono strain grown in 0.1 mcg INH containing Dubos medium and sacrificed at 6 weeks after the inoculation. Tubercle bacilli isolated from viscera of animals showed the decreased resistance for INH (Table 6). The decrease of resistance was also observed in the examination of the first and the second subcultures of bacilli used for the infection.

The authors concluded that SM low-grade-resistant tubercle bacilli may have much more significance for SM treatment than the INH low-grade-resistant tubercle bacilli for INH treatment. The interesting fact was the increased resistance for SM of tubercle bacilli isolated from animals after infection and that of subcultures of SM low-grade-resistant tubercle bacilli and the decreased resistance for INH of tubercle bacilli isolated from animals after infection and that of subcultures of INH low-grade-resistant tubercle bacilli. The results mentioned above give important suggestions for studying the problem of primary drug resistance.

緒 言

薬剤耐性菌感染は結核対策の成果を反映するものとして疫学的に大きな課題であると同時に、耐性菌感染例の治療効果の劣ることから、臨床上也重大な問題であるが、耐性の基準に達しないいわゆる低耐性菌感染に対する化学療法の効果については明確にされていない。治療前に低耐性菌が検出された場合でも、現在の3者併用を原則とする治療の効果におおわれて、低耐性菌感染の臨床的な意義を明らかにすることは困難である。低耐性菌感染の意義を明らかにするためには、低耐性を示した薬剤による単独治療が行なわれた場合の成績を検討する必要があるが、このような研究は事実上不可能に近い。そこで、SM および INH 低耐性菌を用いて in vitro および in vivo の実験を行ない、低耐性菌感染の意義を検討することにした。

実験方法と成績

1. SM 低耐性菌感染に関する実験

1) 第1回実験

SM 1 mcg 含有 Dubos 培地にクロノ株 0.2 mg を接

種し、日立 EPO-B 型光電計による Density が 0.18~0.2 (Blanc は Dubos 培地) に達したものを 4 mg/ml と仮定し、0.01 mg (1.3×10^6 生菌単位) を 24 匹のモルモットの静脈内に接種し、これを3群に分け3週後より4週間 SM 10 mg, あるいは KM 20 mg の投与を行ない、7週後に剖検した。また 30 匹のマウスには 0.1 mg (1.3×10^6 生菌単位) を静脈内に接種し、3群に分け、3週後より4週間 SM 1 mg あるいは KM 2 mg の治療を行なった後に剖検した。

その成績は表1に示したように、モルモット、マウスのいずれにおいても SM の治療効果はほとんど認められなかった。表には KM の治療成績は省略してあるが、KM の治療効果は明らかに認めることができた。

またモルモットの脾臓、マウスの肺臓を均等化し 1% NaOH 処理後 1% 小川培地を用い直接法によって SM 耐性菌の population を検査した成績が次の表2である。SM の濃度は表示濃度であるが、この成績からみると、接種菌に比して動物の臓器内の菌の SM 耐性は高い方向に推移しており、特に 10 mcg 耐性菌がかなりの率に認められた。SM 耐性の上昇は無治療群においても認められたことから、動物体内における SM 耐性の上昇が

Table 1. Response to SM Treatment for Animals Inoculated with SM Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli

1) Guinea pig (Inoculated $0.01 \text{ mg} - 1.3 \times 10^5$ —intravenously)

Group	Macroscopic indices			$\sqrt{\text{Spleen index}}$	Viable bacilli isolated from spleen/10mg (Log.)
	Viscera	Lymph nodes	Total		
Control	7.4	3.8	11.1	0.629	2.6232
SM 10mg	7.1	4.3	11.4	0.606	2.7076

$$* \sqrt{\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100}$$

2) Mouse

(1) First experiment (Inoculated $0.1 \text{ mg} - 1.3 \times 10^6$ —intravenously)

Group	Specific lung weight*	Viable bacilli isolated from lung/10mg (Log.)
Control	177	4.9477
SM 1mg	158	4.0502

(2) Second experiment (Inoculated $0.1 \text{ mg} - 1.95 \times 10^6$ —intravenously)

Group	Specific lung weight*	Viable bacilli isolated from lung/10mg (Log.)
Control	134	4.327
SM 1mg	136	4.504

$$* \frac{\text{Lung weight (mg)}}{\text{Body weight (g)}} \times 10$$

Notes: SM treatment was started at 3 weeks after inoculation and continued for 4 weeks. 8 guinea pigs and 10 mice were inoculated for each group.

SM の治療効果を著しく低下させた原因であると考え、次の再実験を行なった。

2) 第2回実験

第1回実験と同様に SM 1mcg 含有 Dubos 培地に培養したクロノ株を用い、6匹のモルモットに 0.1 mg (1.3×10^6 生菌単位) を皮下に接種し、 0.01 mg を6匹のモルモットの静脈内に接種し、無治療で放置して7週で剖検した。マウスでは第1回と同様の方法で実験を行なった。その結果 SM 低耐性菌を感染したマウスに対する

Table 2. SM Resistance of Tubercle Bacilli Isolated from Animals Inoculated with SM Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli (4 weeks' reading)

Animal	Viscera	Group	Proportion of SM resistant bacilli			
			0 mcg	1 mcg/ ml	2 mcg/ ml	10 mcg/ ml
Inoculum			100	72	49	(0.1)
Guinea pig	Spleen	Control	100	70	60	17
		SM 10mg	100	82	78	24
Mouse	Lung	Control	100	89	74	2
		SM 1mg	100	85	65	6

SM 治療は表1の下段に示したように、全くその効果を認めることができなかった。臓器内の菌の SM 耐性は表3に示したように 10 mcg 耐性菌の population の増加傾向が認められた。この傾向は皮下および静脈内に接種した無治療のモルモットの脾臓内の菌においても認められた。したがって SM 低耐性菌を接種した動物体内における SM 耐性の上昇は再実験によつて確認されたわけであるが、動物に接種した菌の耐性検査を行なつた対照培地上の菌を用いて間接法による耐性検査を行なつた成績をみても、表3のように 10 mcg 耐性菌の population の増加が認められた。

2. INH 低耐性菌感染に関する研究

1) 第1回実験

INH 0.02 mcg 含有 Dubos 培地に発育したクロノ株 ($0.18 \sim 0.2$ Density) の 0.01 mg (8.7×10^4 生菌単位) を24匹のモルモットの、 0.1 mg を30匹のマウスの静脈内に接種し (接種菌の INH 耐性の状況は表5に示した)、3週後から4週間の INH 治療を行なつた後に剖検した。INH の量はモルモットでは 2 mg および 0.5 mg /モルモット、マウスにおいては 0.2 mg および 0.05 mg /マウスである。その成績は表4に示したが、モルモット、マウスのいずれにおいても INH の投与量に応じて明らかな治療効果が認められた。

またモルモットの脾臓内、マウスの肺臓内の菌の INH

Table 3. Second Experiment on SM Resistance of Tubercle Bacilli Isolated from Animals with Inoculated SM Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli (4 weeks' reading)

Animal	Viscera	Group of experiment		Proportion of SM resistant bacilli			
		Inoculation	Treatment	0 mcg	1 mcg/ml	2 mcg/ml	10 mcg/ml
Inoculum				100	89	67	1
Subculture (Growth on control medium)				100	72	36	29
Guinea pig	Spleen	0.1 mg subcutaneously	Control	100	77	61	9
		0.01 mg intravenously	Control	100	86	67	6
Mouse	Lung	0.1 mg intravenously	Control	100	91	88	15
			SM 1 mg	100	93	79	22

Notes: 6 guinea pigs and 10 mice were inoculated for each group. (1 mg contained 1.3×10^7 viable bacilli).

Table 4. Response to INH Treatment for Animals Inoculated with INH Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli

1) Guinea pig (Inoculated $0.01 \text{ mg} - 8.7 \times 10^4$ —intravenously)

Group	Macroscopic indices			Spleen index	Viable bacilli isolated from spleen/10 mg (Log.)
	Viscera	Lymph nodes	Total		
Control	11.8	13.6	25.4	1.039	3.2856
INH 2mg	5.7	4.3	10.0	0.428	3.7634
INH 0.5mg	8.9	8.9	17.8	0.719	3.0899

2) Mouse (Inoculated $0.1 \text{ mg} - 8.7 \times 10^5$ —intravenously)

Group	Specific lung weight	Viable bacilli isolated from lung/10mg (Log.)
Control	85.55	4.3284
INH 0.2 mg	58.22	3.017
INH 0.05 mg	65.29	3.6712

Notes: INH treatment was started at 3 weeks after inoculation and continued for 4 weeks. 8 guinea pigs and 10 mice were inoculated for each group.

耐性を直接法によつて検査したが、その成績は表5に示したように 0.02 mcg 耐性菌はほぼ完全に消失し、明らかに耐性の低下が認められた。INH 耐性の低下は無治療群でも認められたので、この点を確実にするため、やや高い耐性菌を用いて再実験を行なつた。

2) 第2回実験

INH 0.05 mcg および 0.1 mcg 含有 Dubos 培地に培養したクロノ株をおのおの6匹のモルモットの皮下と10匹ずつのマウスの静脈内に接種し(接種菌のINH耐性は表6に示した)、放置して6週後に剖検し、モルモットの脾臓内、マウスの肺内菌のINH耐性を直接法によつて検査した。また動物接種を行なつた菌のINH耐

Table 5. INH Resistance of Tubercle Bacilli Isolated from Animals Inoculated with INH Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli

Animals	Viscera	Group	Proportion of INH resistant bacilli			
			0 mcg	0.02 mcg/ml	0.05 mcg/ml	0.1 mcg/ml
Inoculum			100	64	(0.33)	0
Guinea pig	Spleen	Control	100	0	0	0
		INH 2mg	100	(0.43)	0	0
		INH 0.5mg	100	0	0	0
Mouse	Lunge	Control	100	(0.65)	0	0
		INH 0.2mg	100	0	0	0
		INH 0.05mg	100	(0.78)	0	0

性を調べた対照培地上の菌を用いて間接法により再度INH耐性を調べ、その後更に同様にして対照培地上の菌のINH耐性を検査した。これらの成績は表6に示したごとく、INH耐性菌のpopulationはin vitroおよびin vivoの実験のいずれにおいても明らかに減少が認められ、低い耐性に移行している傾向がみられた。この結果は第1回の実験成績を再現しているものと考えられるが、マウスにおけるINH耐性の低下はモルモットにおける程著明ではないようであつた。

実験成績の総括と考案

いわゆる低耐性菌感染が治療に及ぼす影響について検討する目的で実験を行なつた結果、SM 1 mcg 含有 Dubos 培地に発育し、1%小川培地で 10 mcg 耐性菌をほとんど認めない程度のSM低耐性菌を接種したモルモットおよびマウスに対するSMの治療効果はほとんど認められなかつた。この実験において、動物臓器内の菌の

Table 6. INH Resistance of Tubercle Bacilli among Subcultures of INH Low-Grade-Resistant Tubercle Bacilli and that Isolated from Animals Inoculated with the Same Strains

Strains used	Bacilli examined	Viable bacilli from viscera/10 mg	Proportion of INH resistant bacilli				
			0 mcg	0.025 mcg/ml	0.05 mcg/ml	0.1 mcg/ml	1mcg/ml
Culture in 0.05 mcg INH Dubos medium ($3.85 \times 10^6/\text{mg}$ viable bacilli)	Inoculum	—	100	50.2	4.5	16.6	11.8
	First subculture	—	100	92.7	21.8	1.8	0
	Second subculture	—	100	78.8	40.4	3.4	0
	Spleen of guinea pig	385	100	72.3	16.9	0	0
	Lung of mouse	996	100	79.9	45.5	10.7	2.4
Culture in 0.1 mcg INH Dubos medium ($6.8 \times 10^6/\text{mg}$ viable bacilli)	Inoculum	—	100	100	91.2	27.2	25.7
	First subculture	—	100	75	32.1	14.9	0
	Second subculture	—	100	116.7	49.2	29.9	0
	Spleen of guinea pig	108	100	54.4	36.9	1.5	0
	Lung of mouse	1,598	100	78.3	91.5	15.4	9.9

Notes: 6 guinea pigs and 10 mice were inoculated with 0.1 mg of each strain, subcutaneously for the former and intravenously for the latter.

SM 耐性は無治療群においても高い方向への移行が認められ、これがSMの治療効果を低下させた主因であろうと考えたのであるが、このことは再度の実験によつて確認された。またSM耐性の上昇は *in vivo* のみならず継代による *in vitro* の実験においても観察された。木村²⁾はSM 1 mcg 含有 Dubos 培地に発育した H₂ 株をマウスに接種し、SM 治療を行なつた場合の肺内菌のSM耐性が上昇していた成績を報告している。しかしこの報告には、無治療対照群の成績が示されていないのでSM耐性の上昇がSM投与によつて助長されたかどうか明らかでない。

INH 低耐性菌感染の第1回の実験では、耐性の低い菌であつたためかもしれないが、明らかにINHの治療効果が認められた。この際興味ある事は、動物臓器内の菌のINH耐性が著明に低下していたことである。そこで、次の実験は治療効果の問題から離れるが、INH低耐性菌の *in vitro* および *in vivo* の耐性の変動を検討した。再実験に用いた菌のINH耐性は第1回のもより高い耐性菌であつたが、継代によつてINH耐性の低下が認められ、またモルモットの脾臓内の菌も耐性低下を示した。INH耐性菌の耐性低下については多くの報告^{3)~11)}があり、著者ら¹²⁾もINH高度耐性菌感染モルモットの臓器内の菌の耐性が著明に低下した株のあることを報告したが、今回の実験に用いた程度の低耐性菌においてもすでに耐性の低下の認められたことは興味のあることである。しかしマウスにおいてはやや異なつた成績を示すようである。第1回の実験においてはマウスでもモルモットに比べると同様に明らかな耐性の低下が認められたが、第2回の実験においてはマウスの肺内菌のINH耐性の低下はモルモット程著明でなかつた。木村²⁾、堀¹³⁾はマウスを用いたINH低耐性菌の感染実験でINH耐性の低下を認めていない。したがつてマウスにおいてはモルモットとかなり異なつた反応を示すことが考えられる。しかしINH高度耐性菌のみならず低耐性菌でもモルモット体内でINH耐性の低下が起こることとは一これを直ちにヒトの感染に当てはめることはできないにしても一回耐性あるいは耐性菌感染を検討する場合に十分に考慮せねばならないであろう。INH高度耐性菌感染の少ないことは、ヒトに対する毒力の低下、感染後体内における耐性の低下が主因であろうと考えたのであるが¹²⁾、より低い耐性菌においても感染後耐性が低下して表現される可能性があるものと考えられる。また継代によつてもINH耐性が低下するとすればINHの初回耐性の研究には耐性検査の方法によりかなりの誤差が生ずる可能性を考慮せねばならないであろう。各施設と菌検査センターの成績を比較した療研¹⁴⁾の研究では、INH耐性の差異が最も大きかつたことが報告されている。

以上SMおよびINHの低耐性菌感染について検討した結果、SMとINHとでは治療効果からみてその意義が異なるものと考えられるが、これは感染後の耐性推移の方向がSMとINHとでは差異があるためであろうと推論した。

結 論

SM 1 mcg 含有 Dubos 培地およびINH 0.02 mcg 含有 Dubos 培地に発育したクロノ株をモルモットおよびマウスに接種し、3週間より4週間SMあるいはINHの治療を行なつて剖検し、治療効果を検討すると共に、臓器内の菌の耐性の変動を調べた。更にSM低耐性菌に関する研究は再実験を行なつて再現性を調べ、INH低耐性菌については0.05 mcg および0.1 mcg 含有 Dubos 培地に発育したクロノ株を接種した動物体内の菌のINH耐性の状態を検査した。その結果次の結論を得た。

- 1) SM低耐性菌を接種した動物に対してはSMの治療効果はほとんど認められなかつた。この結論は再実験によつて確かめることができた。
- 2) INH低耐性菌(0.02 mcg 培地発育)感染動物においてはINHの治療効果は明らかに認められた。
- 3) 動物に接種したSM低耐性菌には10 mcg 耐性菌はほとんど含まれていなかったが、動物の臓器内の菌のSM 10 mcg 耐性菌の population は増加していた。これはSMの投与を行なわない対照群においても認められ、継代による *in vitro* の実験においても観察された。
- 4) INH 0.02 mcg, 0.05 mcg および0.1 mcg 含有培地に発育した菌を接種した動物、特にモルモットにおいては、臓器内の菌のINH耐性は明らかに低下を示し、継代による *in vitro* の実験においても同様に耐性の低下が認められた。

以上の結果から、低耐性菌感染の意義はSMとINHとではかなり違うものと考えられるが、SM低耐性菌感染は治療上重大な意義を有するものと思われる。

薬剤耐性菌感染に関する研究成績の総括

本問題について種々の方向から研究を進めた結果を4回に亘つて報告してきたが、これらの成績を総合すると次のように結論されるであろう。

我国の初回耐性は少なくとも最近10年間著明な変動はなく、増加傾向は認められなかつたが、小児結核例のごとき特殊な対象では初回耐性はやや高率であり、感染源が既治療である場合の小児では初回耐性が非常に高率に認められた。この場合INH耐性は感染源と小児において平行せず、小児側においてより低い耐性を示すことが観察された。

そこでINH高度耐性菌感染について実験的に研究した結果、INH高度耐性菌の毒力の低下と感染後体内に

おける耐性の低下が INH 高度耐性菌感染の頻度を低く表現している主因であろうと推測した。また耐性基準に達しない低耐性菌の感染は、SM では治療効果に重大な影響を及ぼす可能性が考えられたが、INH 低耐性菌感染においては体内で INH 耐性の低下することから SM の場合と異なつた意義を有するものと考えられる成績を得た。

本研究は当所岩崎所長のご援助とご指導に負うところが大きい。また当所の多数の研究者、技術者のご協力をいただいた。更に各医療機関、保健所のご援助を賜つた。ご協力、ご援助をいただいた多くの方々に深い感謝の念を捧げる。

本研究の一部は第 43 回日本結核病学会「薬剤耐性菌感染」のシンポジウムにおいて大里が報告した。

文 献

- 1) 青柳昭雄：第 43 回結核病学会シンポジウム報告，結核，43：343，昭 43.
- 2) 木村仁：結核，40：49，昭 40.
- 3) 久世彰：結核の研究，3：39，昭 31.
- 4) 大藤真 他：日結，19：585，昭 35.
- 5) 中野昭 他：結核，36：170，昭 36.
- 6) 中谷照：岡山医誌，74：317，昭 38.
- 7) Meissner, G. : Beit. Klin. Tbk., 113 62, 1955.
- 8) 高原誠：日胸，21：122，昭 37.
- 9) 八木淳：大阪大医誌，118：2105，昭 34.
- 10) Meissner, G. : Beit. Klin. Tbk., 113：280, 1955.
- 11) 佐藤直行：結核，30：247，昭 30.
- 12) 大里敏雄 他：結核，43：473，昭 43.
- 13) 堀三津夫：大阪大医誌，12：439，昭 35.
- 14) 療研：昭和 42 年療研研究報告書.