

再発と化学療法, その実験結核モデル

金井興美・近藤瑩子

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和45年2月20日

RELAPSE AND CHEMOTHERAPY IN EXPERIMENTAL
MOUSE TUBERCULOSIS*

Koomi KANAI and Eiko KONDO

(Received for publication February 20, 1970)

Seventy-five mice were infected intravenously with 0.02 mg of a streptomycin-dependent strain of tubercle bacilli, and streptomycin of 10 mg per day was administered intraperitoneally for the first 2 weeks to support bacillary multiplication. At the time of 10 week infection, the mice were divided into 2 groups of equal half; one group to be readministered with streptomycin and the other to be treated by combined administration of streptomycin and isoniazid (0.2 mg per day) for 4 weeks. During the whole experimental period of 20 weeks, the time-course examination of viable counts of the lung and spleen were made with 2 week intervals. For this purpose, mice were sacrificed sampling 4 at random from each group and a serial 10-fold dilutions of homogenate of the weighed amount of tissue were inoculated onto glycerol-egg media containing streptomycin in 100 mcg per ml. The results are summarized in Fig. 2.

In both the lung and spleen, the infecting bacilli multiplied in response to streptomycin-administration for the first few weeks and then declined in viable counts gradually. When the drug was given again at the time of 10 week infection, the bacilli in the lung were stimulated to resume multiplication. The viable counts reached the level higher than the previous peak. Many typical tubercles appeared on the surface of the lungs. In the spleen, however, the bacilli did not multiply at all despite of the streptomycin administration. This organ difference is explained by an uneven distribution of acquired immunity, being much stronger in the spleen. The acquired immunity was considered to have been produced by the bacillary multiplication during the first two weeks.

Interesting was the different effects of isoniazid on the fate of infecting bacilli in these organs. The drug was highly active in decreasing viable counts of the lung, but was almost inactive in the case of the spleen. This observation supported our previous assertion that isoniazid is effective only against multiplying bacilli but not against resting bacilli. On the other hand, when streptomycin was not given just after infection (Fig. 1), the infecting bacilli did not multiply unlike the case of Fig. 2. It is considered that, under this situation, acquired immunity was not established in these mice. Therefore, bacillary multiplication did occur even in the spleen in response to streptomycin administration at the time of 10 week infection and isoniazid was effective against these bacilli.

The experimental system as described above will be a model for "relapse and chemotherapy in tuberculosis in association with acquired immunity".

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

現在、結核病学における重要問題の一つは、再発に関するものに違いない。しかし複雑な病理学的、病態生理学的条件を背景とし、年月を経て起こる再発の機序を、一般の動物実験で検討することは至難のことに思われる。副腎皮質ホルモンの投与によつて、慢性実験結核症の増悪を観察することはできようが、そのみで臨床結核における再発の機序を、どの程度カバーしうるかは疑問であろう。また“Microbial persistence”⁽¹⁾⁽²⁾が容易に成立するマウス実験結核症において、感染菌の再増殖は時としてみられるが、これが偶発的なものであるかぎり計画的実験にはなりがたい。

しかし、いま主題を「再発と化学療法」と限定し、再発を感染菌の再増殖という側面でのみ捉えて、薬剤の効果検討を目的とするならば、ある程度のモデル実験は可能である。すでに報告しているように⁽³⁾⁽⁴⁾、私たちは有毒結核菌由来のストレプトマイシン (SM) 依存株を感染菌に用い、その感染を受けたマウスに SM を投与あるいは中止することによつて、菌の分裂増殖、あるいは休止を招来せしめ、こうした条件における INH の治療効果を比較検討してきた。今回の報告は、この仕事の延長として、再発と化学療法についての、一つの実験モデルを提供するものである。

実験方法と材料

dd 系市販マウス、体重 18g 前後の雄を 150 匹用意し、75 匹ずつの A, B 2 群に分けた。10 匹ずつアルミ製飼育箱に收容し、飼育は固型飼料と水とを用いた。感染には、SM を 100 mcg/ml に含むソートン培地上に継代保存している SM 依存株 18b (有毒結核菌 H2 株由来⁵⁾) を用いた。これを SM を含まないソートン培地に移して 10 日間残余増殖せしめ、発育の停止を見極めてこれより型のごとく 0.1 mg/ml の蒸留水菌液を調製し、この 0.2 ml を両群一様に尾静脈に注射して感染した。翌日、両群より 2 匹ずつ、計 4 匹を解剖して、肺、脾より感染菌を定量的に分離した。まず臓器の重量を計り、次にそれらの表面を滅菌蒸留水でよく洗浄し、濾紙で表面の水をかるくきつた後、肺、脾それぞれまとめて乳鉢中に入れ、蒸留水による 10 倍乳剤を調製した。これをガーゼ 1 枚で濾過し、この濾液を出発材料とした 10 倍希釈系列を作り、それぞれ 0.1 ml ずつ SM を 100 mcg/ml に含んだ小川培地に接種した。5 週間培養後の発生集落数と、平均臓器重量から、肺、脾中の全感染菌数を計算した。また、この日より B 群の動物に対してのみ、SM を毎日 10 mg 腹腔内に注射投与し、2 週間に及んで中止した。この時点で、またこれ以後 2 週ごとに、A, B 両群よりそれぞれ 4 匹を選んで剖検し、感染菌の分離を前述の方法で行なつた。

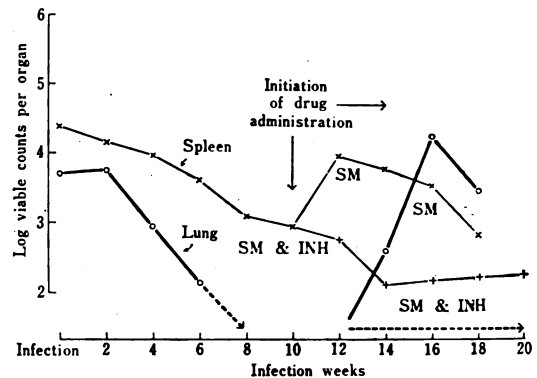
かくして感染後 10 週にいたり、A, B 両群はそれぞ

れ折半して同数の小群に分け、一方には SM 10 mg を腹腔内投与した。他方にはこれに加えてイソニコチン酸ヒドラジド (INH) 0.2 mg を同じく 4 週間腹腔内投与した。これ以後 2 週ごとに、これら 4 つの小群より、それぞれ 4 匹ずつ殺して感染菌を定量分離した。

実験成績

A 群における感染菌消長は Fig. 1 に示されている。感染後、マウスは SM 投与を受けなかつたため、脾における感染菌数は初めから次第に減少して、10 週においては感染時のその 1/10 を多少下まわっている。しかし、ここでマウスに SM 投与が開始されると、感染菌数は急増加し、投与 2 週後はすでに感染時のそれに戻り、そのあと再び徐々に減少しはじめた。SM と一緒に INH 投与を受けた群では、菌数は増加を示すことなく、そのまま減少を続けた。そして治療 4 週で非治療群の 1/100 に近い感染菌数になつたが、以後ほぼ同一レベルを維持して“Microbial persistence”の様相を呈した。他方、肺においては感染直後の菌数減少が著しく、6 週以後ほとんど検出不能の状態であつた。しかし感染 10 週時に SM 投与が始まると、投与 4 週で感染菌分離が可能となり、その 6 週目には実験開始時のレベルをはるかに上まわつた菌数を示した。これに対して、INH 治療群においては検出不能の状態が続いた。

Fig. 1. Resting Primary Infection in Mice with a Streptomycin-Dependent Strain of Tubercle Bacilli and Later Treatment with Isoniazid under the Streptomycin-Induced Activation



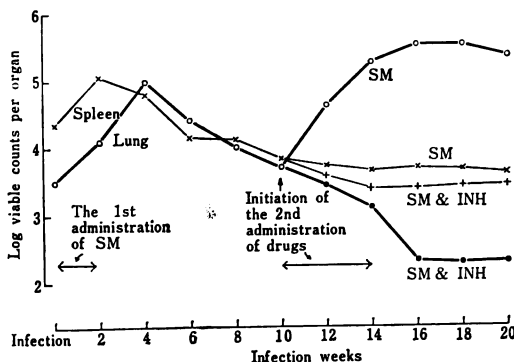
次に B 群であるが、A 群と異なつて、感染直後 2 週間の SM 投与を受けたので、感染菌は初期には増殖している。これは、これらのマウスに感染免疫を発生せしめる意図によるものであつた。その後、肺、脾ともに感染菌数は徐々に減少して 10 週にいたつた。ここで SM の 4 週間にわたる再投与を開始すると、肺においては感染菌は再増殖を示し、投与 6 週後には 100 倍以上の菌数に達して、その後もほぼ同一レベルを維持した。そして、こ

の菌の増殖に応じて肺には多数の定型的な結核結節を肉眼的にみる事ができた。これに反し、脾においてはSM再投与に応じた菌の再増殖は全くみられず、しかし感染10週時の菌数レベルをその後さらに10週間にわたって維持した。さてSM再投与にINHを加えて治療した場合は、肺においてその効果は著しく、INH投与6週後において、非治療群の1/100の菌数に減少し、以後この状態にとどまっている。ところが脾においては、INH投与効果はほとんどみられず、感染菌は非治療群とごくわずかのレベルの差で、これと平行的な消長曲線を示した。

考 察

試験管内実験と異なり、生体における菌と薬剤との関係は、常に宿主側の条件が関与するところに問題がでる。これを表現して、“Host-parasite-drug relationship”なる言葉がうまれるわけであるが、その立場で、まずB群 (Fig. 2) について考察してみる。感染直後2週間のSM投与によって、マウス体内で感染菌は一定期間増殖し、それから菌数減少が始まった。菌の初期増殖によって、これらマウスには感染免疫が成立したことは当然である。ところが、この獲得免疫の程度は、脾に強く、肺に弱いという部位差のあることを、私たちはこのdd系マウスについて報告してきた⁹⁾。この事実を反映して、感染10週時からSMの再投与を行なうと、肺においては感染菌は再増殖を開始し、ここに再発像を現出したが、脾においては感染菌数は10週時のレベルを維持したままである。つまり脾においてはそこでの強い免疫力によって、感染菌の再増殖が阻止されているのである。ところがINH投与を行なうと、再増殖の強い肺においてのみ、逆に感染菌数の減少が顕著で、脾においてはINHの効果は微少であつた。INHが分裂増殖中の菌

Fig. 2. Active Primary Infection in Mice with a Streptomycin-Dependent Strain of Tubercle Bacilli and Later Treatment with Isoniazid under Streptomycin-Induced Reactivation



に有効で、休止菌にはその効果を発揮しがたいという、これまでの私たちの主張⁹⁾を裏書きするものであり、そしてまた、この場合の菌の再増殖の可能性が、宿主の免疫力によつて制御されていることを示した点で、再発機序の一つを示す実験モデルでもあろう。さらにつけ加えるならば、肺におけるINH効果も、再増殖の盛んな当初の時期においてのみ顕著で、再増殖のピークに達した後期においては不鮮明である。そして肺においても、脾においても、結局“Microbial persistence”の様相を示し、再び慢性感染像が成立した。

ここで、A群の場合を比較考察しよう。SM投与による感染菌の増殖を経験していなかつたこの群のマウスにおいては、10週の時点において獲得免疫力は脾においても乏しかつたと考えられる。したがつて、ここで始まつたSM投与に反応して、脾においても感染菌の増殖がみられ、そしてまたINH投与効果もはつきり認められたのである。本報告においては、INHが一つの素材として用いられたのであるが、このような再発に関する動物実験モデルにおいて、他の抗結核剤の効果も検討できるはずである。

結 論

マウスをSM依存性結核菌株で感染し、SMの投与、そして一定期間をおいた再投与を行なつて、その間の感染菌数の消長を追求した (Fig. 2)。獲得免疫力の弱い肺においてはSM再投与に応じて感染菌の顕著な再増殖がみられ、免疫力発生の強い脾においては再増殖は全くみられなかつた。この条件においてINHを用いた化学療法は、肺においてのみ、その菌数を著明に減少せしめたが、脾ではほとんど無効であつた。他方、免疫力を誘発せしめていないマウスの脾においては (Fig. 1)、SM投与に応じて感染菌の増殖がみられ、また、これに対するINHの効果も認められた。

以上の所見は、INHの効果は分裂増殖中の菌に対しては発揮されるが、休止中の菌には無効であることを示している。

すなわち感染菌の増殖を人為的に制御しうる実験条件を用い、また獲得免疫力発生の度合を異にするマウスの肺、脾における感染菌数の消長を比較して、再発と化学療法に関する一つの実験モデルを提供したといえる。

本研究は、第44回日本結核病学会総会シンポジウム「結核化学療法強化の可能性とその限界」に関連して行なわれた仕事の延長であり、座長内藤益一教授のご鞭撻に対して謝意を表す。また実験実施に当たつては、福田健一氏の助力の大きいことを記して謝意としたい。

文 献

- 1) McCune, R.M., Jr. et al.: J. Exptl. Med., 123 : 445, 1966.
- 2) McCune, R.M., Jr. et al.: J. Exptl. Med., 123 : 469, 1966.
- 3) 金井興美・中村玲子: 結核, 39 : 537, 昭 39.
- 4) 金井興美・近藤登子: 結核, 44 : 379, 昭 44.
- 5) 橋本達一郎: 結核, 30 : 707, 昭 30.
- 6) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 415, 昭 43.