

原 著

動物の実験的結核症における薬剤耐性菌の出現に関する研究

山之内孝尚**・沢井陽***・堀三津夫

大阪大学微生物病研究所結核病理学部門

(** 現 大阪大学微生物病研究所附属感染動物実験施設)

(***) 現 結核予防会大阪府支部附属結核研究所)

受付 昭和 48 年 4 月 16 日

STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF DRUG-RESISTANT TUBERCLE BACILLI IN EXPERIMENTAL ANIMAL TUBERCULOSIS*

Takahisa YAMANOUCHI, Akira SAWAI** and Mitsuo HORI

(Received for publication April 16, 1973)

Development of drug-resistant tubercle bacilli in the course of chemotherapy is one of the most important problems in the research of tuberculosis.

The purposes of the present studies were, first, to establish the method for obtaining the drug-resistant tubercle bacilli with high frequency in experimental tuberculosis, and, second, to analyze the main factors responsible for the development of drug-resistant tubercle bacilli *in vivo*.

Experiment I

Materials and methods: Mice (CF#1, ♀, 6 weeks of age) were injected intrapulmonarily with 1.0 mg of human type tubercle bacilli "Strain Kuroono", suspended in 0.1 ml of paraffin oil, and were divided into 3 groups each composed of 22 or 23 animals. The mice of the first group were set aside as non-treated control group. From the 15th day of infection, the mice of the second and the third groups were administered subcutaneously isoniazide (INH) in the single daily dose of 0.1 mg and 0.5 mg, respectively. The medication was carried out 6 days weekly.

Just before the treatment was started and after 62 and 110 times of the administration, several mice from each group were sacrificed and the emulsion of the lungs was prepared by homogenizing with 1% NaOH solution and appropriate amounts of each emulsion were inoculated onto the 1% KH_2PO_4 -Ogawa's solid egg media containing various concentrations of INH. Thus, the bacilli recovered from the lungs were determined their susceptibility to INH.

Results:

1) Non-treated control group: Almost all cultures of bacilli were susceptible to $0.03 \mu\text{g}$ or less per ml of INH, while they contained a very small numbers of bacilli resistant to

* From the Department of Tuberculosis, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita City, Osaka 565 Japan.

** Preent address: Quarters for Experimentally Infected Animals, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University.

*** Present address: Research Institute for Tuberculosis of Osaka Branch of Japan Anti-Tuberculosis Association.

1.0 μg or more per ml of INH. The population of the resistant bacilli was calculated to be less than 0.01%.

2) The second group: The population of INH-resistant bacilli from the lungs of the mice treated with 0.1 mg of INH daily appeared to be slightly more than that of the control group.

3) The third group: The bacilli recovered from the lungs of the mice treated with 0.5 mg of INH daily, were more resistant to INH than those from the lungs of the control or of the second group. After 62 times of administration, bacilli from 8 animals out of 10 were resistant to 20 μg per ml of INH in full population, and after 110 times, bacilli from 6 animals out of 9 were resistant to INH in the same degree. The bacilli recovered from one mouse in this group were resistant to 0.2 μg per ml of INH in full population but more highly resistant bacilli were not detectable. And it was found that the INH resistant tubercle bacilli thus obtained were divided into at least two types as to the colony size; the relatively small colonies fully composed of higher resistant bacilli and the ordinary colonies of lower resistant bacilli.

Experiment II

In this experiment, mice were infected intravenously with 0.1 mg of bovine type tubercle bacilli "Strain Ravenel" suspended in 0.2 ml of saline. All mice from non-treated group died within 25 days after infection. The time at which one half of mice died was 19 days.

All of 10 mice in each group, which were treated with 1.0 mg of SM or 0.1 mg of INH by subcutaneous injection, once a day, started on the day of infection, survived. After 25 times of administration, the treatment was paused for 18 days in these two groups, and was started again in the same schedule as before. After 62 and 91 times of administration of the drugs, surviving mice of each group were sacrificed and tubercle bacilli in the lungs were cultured to examine for their susceptibility to SM or INH.

Only one mouse in the group treated with INH 62 times, developed the low resistant bacilli to INH in partial population. But all the others, 5 mice of each group treated with SM or INH, did not develop drug-resistant bacilli.

Experiment III

Adult guinea pigs sensitized with heat-killed tubercle bacilli were injected intrapulmonarily with suspension of agar coated bovine type of tubercle bacilli "Strain Ravenel". About one half of animals died within 30 days after infection. At this time, 32 surviving guinea pigs were divided into 4 groups as follows; the first and the second groups were treated with daily dose of 2 mg and 10 mg of INH, respectively, and the other two groups were treated with 2 mg or 10 mg of INH combined with daily dose of 50 mg of PAS (sodium salt of para-aminosalicylic acid). The drugs were injected subcutaneously once a day, six days a week, and paused for a week every three weeks.

After 38, 86 and 114 times of administration of the drugs, several animals from each group were sacrificed and appropriate amounts of emulsion prepared from lungs, were inoculated onto Ogawa's medium with or without INH and the susceptibility of the bacilli to INH was examined. One of the animals sacrificed after 86 administrations of 2 mg of INH, had a small sized cavity in the inoculated lung, and the bacilli recovered from the cavity were resistant to 10 μg of INH in partial population.

After 114 times of administration of 10 mg of INH, one guinea pig had a cavity and

another had an encapsulated caseous lesion with liquefied content in the lungs. The bacilli resistant to 1 μ g and 10 μ g of INH were recovered from these lesions in full population, respectively. All other animals of this group did not develop the resistant tubercle bacilli in the lungs. And, no tubercle bacilli were detectable in lungs, liver and spleen of the animals treated with both drugs after 114 times.

Summarizing these results, it was suggested that the main factors responsible for the development of drug resistant tubercle bacilli *in vivo* were:

- the virulence of the inoculated bacilli, that is, their growing ability *in vivo* and the ability to cause the progressive tuberculous lesions,
- the possible presence of drug resistant bacilli in the inoculum, even if they were of a very small fraction, and
- the characters of tuberculous lesions as the circumstances for the growth of drug resistant bacilli contained in the inoculum.

Thus, the administration of sufficient amounts of the drugs suppressed the growth of the sensitive fraction of the inoculum and the resistant bacilli could grow to detectable amount under the favourable conditions in lesion or lesions.

はじめに

結核化学療法剤の開発は結核症の治療に飛躍的發展をもたらしたが、同時に結核菌の薬剤耐性という問題を提起する結果となつた。

結核症の特質上これに対する化学療法は長期間施行されなければならず、薬剤耐性菌の出現は患者の治療に対して最大の障害となるばかりでなく、耐性菌感染例の増

加は結核予防の面からも無視しえない問題となつている。現在結核治療に使用しうる薬剤の種類と数に制限がある以上、化学療法に際しては薬剤耐性菌の出現防止に最大の努力がはらわれなければならない。

一方、動物実験での薬剤耐性菌の出現ならびにその防止に関する研究は、Feldman ら¹⁾の結核モルモットならびに Youmans ら²⁾の結核マウスでの Streptomycin (以下 SM と略記) 耐性菌の出現についての研究以来多

Table 1. Composition of Bacillary Populations. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs before the Treatment with INH, 2 Weeks after Intrapulmonary Infection

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs										
		INH concentration in medium (mcg/ml)										
		0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10
C ₁	10 ⁻²	+++**	+++	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻³	++	++	+	60*	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁴	78	85	60	13	0	0	0	0	0	0	0
C ₂	10 ⁻²	V	V	V	+++	5	0	1	0	0	1	1
	10 ⁻³	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁴	+	+	+	36	0	0	0	0	0	0	0
C ₃	10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	2	0	0	0	0	1	0
	10 ⁻³	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁴	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0

* Number of colonies.

** In case of heavy growth of colonies on the medium, symbols are designated for colony growth as follows :

+: can not be counted exactly, but presumed over 150 to 200 colonies.

++: over 200 colonies, but less abundant than the next symbol "++"

++: cover on whole surface of the medium but not confluent.

+++ : bacillary film formation on the whole surface.

V : wrinkle formation on the bacillary film.

These symbols are common in all tables.

くの報告^{21)~24)}がみられるが、それらの成績は必ずしも一致しておらず、これは動物実験では薬剤耐性菌を恒常的かつ高率に出現せしめることが困難であることに起因するものと考えられる。

われわれは動物実験で薬剤耐性結核菌の出現防止について研究を行う目的で、その基礎研究として主として Isonicotinic acid hydrazide (以下 INH と略記) を用いて、マウス体内で恒常的かつ高率に薬剤耐性菌が出現せしめる実験方法を確立するとともに、動物体内での薬剤耐性結核菌の出現を左右する主要な諸因子を明らかにしようとして研究を行つた。ここに現在までの成績をとりまとめて報告する。

実験 I：人型結核菌黒野株感染マウスにおける INH 耐性菌出現とその Population について

〔実験材料ならびに実験方法〕

使用動物：CF #1 系雌マウス、週齢 6 週。

マウスは実験期間を通じて 20℃、相対湿度 60% を標準として調節された飼育室で、滅菌木毛を入れた大型アルマイトケージに 25 匹以内を収容した。前部の内皿は毎日滅菌したものと交換し、毎週マウスを滅菌ケージに移し換え、飼育環境の保全につとめた。なお飼料は“オリエンタル”MF 固型飼料、給水には水道水を用いた。

Table 2. Composition of the Bacillary Populations after 62 Days of Treatment with INH

A. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs in Untreated Control Group

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs													Autopsy findings
		INH concentration in medium (mcg/ml)													
		0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.3	1.0	10	20		
C ₄	10 ⁻²	V	V	##	##	5	4	10	2	4	2	0	0	0	###***
	10 ⁻³	##	##	##	##	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	##	S**+S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₅	10 ⁻²	###	###	##	## ^S	13	6	2	0	0	0	0	0	0	##
	10 ⁻³	##	##	##	##	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	##	52 ^S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₆	10 ⁻²	V	V	V	## ^S	2	0	0	2	0	0	0	0	0	###
	10 ⁻³	##	##	## ^S	13 ^S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	+	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₇	10 ⁻²	V	V	V	V	##	1	1	2	1	0	0	0	0	###
	10 ⁻³	###	###	##	112	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	##	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₈	10 ⁻²	V	V	V	###	10	16	5	5	2	3	2	3	2	V
	10 ⁻³	###	###	###	##	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	##	+ ^{SS}	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₉	10 ⁻²	###	###	###	+ ^S	⑤*	0	0	0	0	0	0	0	0	###
	10 ⁻³	##	##	##	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	13	27	33	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₁₀	10 ⁻²	###	###	##	+ ^S	1	0	0	0	0	0	0	0	0	##
	10 ⁻³	##	##	17	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	13	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₁₁	10 ⁻²	V	V	V	V	##	3	5	1	2	4	4	0	0	V
	10 ⁻³	###	###	###	##	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	##	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* No results available due to contamination.

** Additional remarks to symbol or number, indicate the size of colonies as compared with ordinary size of colonies in the same line.

m : slightly small.

S : small.

SS : very small.

*** Macroscopic findings on the inoculated lung.

+ : localized abscess at inoculation site.

++ : abscess in two or more lobes.

+++ : larger abscess than the former symbol “++”.

++++ : abscess in the whole lung.

V : in addition to findings of the symbol “++++”, lung can not be separated from thorax owing to severe adhesion.

結核菌感染方法：人型結核菌黒野株を用いた。1% KH_2PO_4 小川培地（以下 1% 小川培地と略記）に増殖した菌苔をグリセリン馬鈴薯培地に移植し、生育した菌薄膜をグリセリンパイオン表面に移し、37°C、15 日間培養し、増殖した菌薄膜を採取して滅菌濾紙で脱水、秤量し、メノウ乳鉢法で 10 mg/ml の菌流動パラフィン懸濁液（以下流パラ菌液と略記）を作製した。

この流パラ菌液 0.1 ml をマウスの胸壁を通して肺内に注射した。

薬剤投与：感染 15 日後にマウスを次の 3 群に at random に分け、INH 投与を開始した。

- 1) 非投与対照群
- 2) INH 0.1 mg 投与群
- マウス数 22
- マウス数 23

3) INH 0.5 mg 投与群

マウス数 23

使用薬液は注射直前に滅菌脱イオン水で所要濃度に調製した。各群マウスに薬液 0.2 ml、1 日 1 回、週 6 日皮下注射により投与を行った。

旧ツベルクリン注射：結核性炎症を増進させる目的で、感染 2 日後より全マウスに 10 倍旧ツベルクリン液 0.2 ml ずつ、1 週 1 回、12 週にわたり皮下注射した。

肺内結核菌の INH 感応度 Population の測定：検査前日に、INH を 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1、0.2、0.5、1、10、20 mcg/ml の各濃度に添加した 1% 小川培地を薬剤非添加培地（以下対照培地と略記）とともに調製し、中型試験管に 6~7 ml ずつ分注し、ファン付血清凝固器で 85±2°C で 1 時間加温滅菌した。

Table 2-B. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs in the Group Treated with 0.1 mg of INH

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs												Autopsy finding	
		INH concentration in medium (mcg/ml)													
		0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10	20		
0.1 I ₁	10 ⁻²	V	V	V	##	12	11	12	10	0	6	2	1	0	V
	10 ⁻³	V	V	V	+ ^s	4	1	2	3	1	2	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	+	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₂	10 ⁻²	V	V	###	+	49	Ⓢ(+)*	4	1	0	0	0	0	1	###
	10 ⁻³	###	###	###	+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	###	##	+	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₃	10 ⁻²	V	V	V	##	77	92	95	85 ^s	5	1	5	1	0	###
	10 ⁻³	###	###	###	+	11	9	6	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	##	+ ^s	0	2	1	1	0	0	0	0	0	
0.1 I ₄	10 ⁻²	V	V	V	Ⓢ	6	6	3	Ⓢ 1(Ⓢ)*	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	##
	10 ⁻³	###	###	###	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	+	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₅	10 ⁻²	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	##
	10 ⁻³	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₆	10 ⁻²	10	5	1	0	0	0	1	1	2	0	1	0	0	###
	10 ⁻³	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₇	10 ⁻²	V	V	###	##	12	27	17	15 ^s 33 ^l s**	6	12 ^s	22	15	V	
	10 ⁻³	###	###	##	+	3	1	4	3	2	0	3	2		0
	10 ⁻⁴	+	+	+	10 ^s	0	0	1	0	0	1	0	0		0
0.1 I ₈	10 ⁻²	V	V	V	##	+	6	12	7	4	0	2	4	0	###
	10 ⁻³	###	###	###	+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	##	##	+	63 ^s	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
0.1 I ₉	10 ⁻²	###	###	##	12	8	0	4	0	2	12 ^{ss}	7	3	Ⓢ	###
	10 ⁻³	##	##	150	2	0	2	4	2	2	1	2	2	0	
	10 ⁻⁴	29	62	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₀	10 ⁻²	V	V	###	+ ^{ms}	0	0	4	1	0	0	0	0	0	##
	10 ⁻³	###	###	###	50 ^s	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	+	+	+	9 ^s	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* Exact results are not available due to partial contamination.

** These 33 colonies are mixed population in size of colonies. Additional remark "l" indicates relatively large size, and "s" means small size of colonies.

薬剤投与開始直前に非投与対照群3匹、薬剤62回投与2日後、110回投与2日後にそれぞれ表2、3に表示した数のマウスを石炭ガスで致死、剖検、全肺を採取、滅菌脱イオン水9mlを加えホモジナイザーで摩砕して乳剤とし10% NaOH 1mlを加え雑菌処理、10倍希釈で2段階または1段階希釈液を調製し、原液および各希釈液それぞれ0.1mlずつを対照培地、INH添加培地に接種、37℃で5週間培養し、発生した集落数を算定

してINHに対する感受性、耐性の程度ならびにそのPopulation（以下Pop.と略記）構成を測定した。なお胸腔内癒着がはなはだしく、肺の採取困難な場合は全胸郭を採取乳剤を調製した。各培地斜面に生育した集落数が数えがたい場合は次の基準に従って記号をもつて表現した。

+：正確な数を算定するのに困難であるがおおむね150~200の集落。

Table 2-C. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs in the Group Treated with 0.5 mg of INH

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs																	Autopsy findings
		INH concentration in medium (mcg/ml)																	
		0																	
		0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10	20						
0.5 I 1	10-2	##	###	##	###	###	V	###	###	###	##	##	##	###	###	+	+	###	
	10-3	+	##	##	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0.5 I 2	10-2	27	25	10	12	7	15	8	8	14	2	12	11					##	
	10-3	3	3	1	1	0	0	0	1	2	0	1	0					##	
0.5 I 3	10-2	3	4	4	7	3	4	10	5	6	4	3	13	0				##	
	10-3	0	0	0	1	0	3	1	0	1	1	0	1	0				##	
0.5 I 4	10-2	30	63	75	6	47	4	1	6	0	5	22	0	0				##	
	10-3	5	15	4	2	12	1	2	3	4	10	2	0	0				##	
0.5 I 5	10-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0				+	
	10-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				+	
0.5 I 6	10-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				+	
	10-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				+	
0.5 I 7	10-2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	##	+SS				V	
	10-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	77	0				V	
0.5 I 8	10-2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V				###	
	10-3	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###				###	
0.5 I 9	10-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/m	+m	+ms	+SS*				###	
	10-3	55** (25S, 30S)	36 (19S, 17S)	40 (23S, 17S)	29 (12S, 17S)	30 (13S, 16S)	32 (17S, 15S)	34 (17S, 15S)	27 (2S, 25S)	23S	20S	22S	15S					###	
0.5 I 10	10-2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	###	###				V	
	10-3	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###				V	

* 20 colonies of relatively large size are found in abundant colonies of very small size.

** 55 colonies are composed of 25 of relatively large size and 30 of small size.

Table 3. Composition of the Bacillary Populations after 110 Days of Treatment with INH
A. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs in Untreated Control Group

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs												Autopsy findings
		INH concentration in medium (mcg/ml)												
		0	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10	20		
C ₁₂	10 ⁻²	V	V	V	+++	+++ ^s	7	6	4	0	2	1	0	+++
	10 ⁻³	V	V	+++	12	0	0	0	0	0	Ⓢ	0	0	
	10 ⁻⁴	+++	+++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₁₃	10 ⁻²	V	V	V	++	13	2	0	0	0	0	0	0	++
	10 ⁻³	+++	++	+++	3	0	0	0	0	0	0	0	0 ^{ss}	
	10 ⁻⁴	++	++	+	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₁₄	10 ⁻²	V	V	V	++ ^s	1	0	0	0	0	0	0	0	V
	10 ⁻³	+++	++	+++	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	85	83	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₁₅	10 ⁻²	V	V	V	V	3	0	0	0	0	0	0	0	+++
	10 ⁻³	V	V	V	+	1	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	+++	+++	+++	9	0	0	0	0	0	0	0	0	
C ₁₆	10 ⁻²	V	V	V	+++	+++	+++ ^s	1	1	1	0	0	0	V
	10 ⁻³	+++	+++	+++	20 ^s	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

++: ++~+++の間と判定されるもの。

+++ : 培地斜面全面に集落が密在するが集落はそれぞれ孤立しているもの。

+++ : 集落が密在し全面に融合状態が認められるもの。

V : 菌苔表面に凹凸を生じ皺が認められるもの。

[実験成績]

I a] マウス肺病巣内の INH 耐性菌の Population

A) INH 非投与対照群について

対照群マウス中実験終了時まで死亡したものは6例で投与開始前3例, 62回投与時8例, 110回投与時5例についての成績をそれぞれ表1, 表2A, 表3Aに示した。

すべてのマウスを通じて病巣内結核菌の大部分は0.03 mcg/ml (以下 mcg/ml を単に r と記載する) に感性を示し, きわめて多量の菌が対照培地に生育した例, C₁₂, C₁₆ では INH に対する感受性の限界は 0.04~0.05 r まで上昇しているが, 次の希釈段階では 0.03 r 以下であつた。なお投与開始時の2例, 62回投与時の5例に少数の 0.1~10 r (または 20 r) の耐性菌が検出されたが, その Pop. は 0.01% 以下と推定される。また病巣内結核菌数は投与開始時, 62回投与時, 110回投与時と漸増の傾向がうかがわれる。

B) INH 0.1 mg 投与群について

INH 0.1 mg 投与群中実験終了までに死亡したものは3例で, 62回投与時, 110回投与時のそれぞれ10例についての成績を表2B, 表3Bに示した。62回投与時の2例 (0.1 I₅, 0.1 I₆), 110回投与時の1例 (0.1 I₁₆) では対照培地に生育した集落数はきわめて少なく, これ

らの例では INH 0.1 mg 連続投与の治療効果の著しいことを示しているが, 他の17例については, 肺病巣内結核菌数は対照群のそれとほぼ同じレベルを示し流パラ菌液 1 mg/ml 肺内注射という感染条件では一般には INH の治療効果は顕著でない。INH 耐性菌もかなりの数に検出され, 対照群では 0.1 r 培地に生育した集落菌数がいずれも10以下であるのに, INH 投与群の 0.1 I₁, 0.1 I₃, 0.1 I₇, 0.1 I₁₄, 0.1 I₁₅, 0.1 I₁₇ では 10¹ のオーダーの集落が検出されており軽度の INH 耐性菌の Pop. の上昇の傾向が認められる。なお62回投与群, 110回投与群の間には INH 耐性菌の Pop. については差を認めがたいが病巣内結核菌数は62回投与時より110回投与時のほうが全般的に増加している傾向がうかがわれる。

C) INH 0.5 mg 投与群について

INH 0.5 mg 投与群中実験終了までに死亡したものは4例で, 62回投与群10例, 110回投与群9例の成績を表2C, 表3Cにかかげた。

62回投与群の 0.5 I₂, 0.5 I₃, 0.5 I₄, 0.5 I₆ の各マウスでは, 投与開始前ならびに62回投与時対照群に比較して肺病巣内の菌数は激減しているが, 0.5 I₆ のマウスを除き 0.5 I₅ では 0.2, 0.5, 10 r 培地に少数の集落が認められ, 他の3例ではそれぞれ1, 10, 20 r 培地に対照培地とほぼ同数の集落が認められた。また 0.5 I₁, 0.5 I₇, 0.5 I₈, 0.5 I₉ および 0.5 I₁₀ の各マウスでは肺病巣内の菌数は対照群との間に顕著な差は認められないが, 各培養はほとんど full pop. で INH 1~20 r に耐性を示した。

Table 3-B. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs in the Group Treated with 0.1 mg of INH

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs												Autopsy findings
		INH concentration in medium (mcg/ml)												
		0	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10	20		
0.1 I ₁₁	10 ⁻²	V	V	V	+++ ^s	2	1	0	0	0	0	0	0	+++
	10 ⁻³	+++	+++	++	7	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₂	10 ⁻²	++	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+++
	10 ⁻³	20	14	7	⊙	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₃	10 ⁻²	V	V	V	V	2	5	5	3	7	4	1	1	V
	10 ⁻³	+++	+++	+++	2 ^s	2	2	2	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	++	++	++	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₄	10 ⁻²	V	V	V	+++ ^s + ^ℓ	55 ^s (50 ^s , 5 ^ℓ)	39 ^s (35 ^s , 4 ^ℓ)	35 ^s	32 ^s	2 ^s	0	0	0	++
	10 ⁻³	V	V	V	++	6	6	3	2	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	+++	++	+++	5 ^s (4 ^s , 1 ^ℓ)	1	0	1	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₅	10 ⁻²	V	V	V	V	+++ ^s 30 ^ℓ	34	32	5	1	3	0	0	V
	10 ⁻³	+++	+++	+++	+++	++ ^s	2	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	++	++	++	4 ^s	1 ^s	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₆	10 ⁻²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++
	10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₇	10 ⁻²	V	V	V	+++ ^s + ^ℓ	+ ^s + ^ℓ	+++ ^s + ^ℓ	12 ^s (6 ^s , 6 ^ℓ)	47 ^s (37 ^s , 10 ^ℓ)	17 ^s (15 ^s , 2 ^ℓ)	13 ^s	4 ^s	3 ^s	V
	10 ⁻³	V	V	V	+++ ^s	28	20	16 ^s (8 ^s , 8 ^ℓ)	9	4	4	0	0	
	10 ⁻⁴	V	V	V	+++ ^s	4	1	1	4	0	0	0	0	
0.1 I ₁₈	10 ⁻²	++	++	+++	++	67 ^s (57 ^s , 10 ^ℓ)	18 ^s	0	0	0	0	0	0	++
	10 ⁻³	++	++	+	22 ^s (12 ^s , 10 ^ℓ)	6 ^s (5 ^s , 1 ^ℓ)	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	15	12	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₁₉	10 ⁻²	V	V	V	+++	+ ^s	1	0	0	0	0	0	0	V
	10 ⁻³	+++	+++	+++	+++	12	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ⁻⁴	++	⊙	+	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1 I ₂₀	10 ⁻²	V	V	V	V	12 ^s (10 ^s , 2 ^ℓ)	19 ^s (6 ^s , 13 ^ℓ)	4 ^s	14 ^s	⊙	7 ^s	5 ^s	1 ^s	+++
	10 ⁻³	V	V	V	+++ ^s 10 ^ℓ	1	0	0	0	0	1	0	0	
	10 ⁻⁴	+++	+++	+++	30 ^s (20 ^s , 10 ^ℓ)	⊙	0	0	0	0	0	0	0	

これらの成績は INH 0.5 mg 62 回投与によりすべてのマウスの肺病巣内の結核菌群は菌数の多寡にかかわらず、ほとんど full pop. で INH 1 γ 以上の耐性菌に推移していることを示し、対照群、INH 0.1 mg 投与群の成績と著しい差を示した。

110 回投与群のマウス肺病巣内菌数については激減しているもの、減少しているもの、あるいは対照群とほぼ同じレベルにあるものなど、62 回投与群の成績と同様の傾向にあり、INH 耐性菌の Pop. についても同様の成績であつた。ただ 0.5 I₁₄ マウスのみは INH 0.1~0.2 γ まで full pop. で耐性を示し、0.5 γ 以上の耐性菌は全く検出されず、病巣内菌群は、いわゆる INH 低耐性

菌のみと推定され、このような成績を示したのは全実験群を通じてこの 1 例のみであつた。

D) マウスの肺病巣の肉眼的所見について

人型結核菌黒野株の流パラ菌液の肺内注射による肺病巣は、感染後 2 週、すなわち INH 投与開始時には肺葉の一部に薄い被膜に包まれた流パラ液が認められる程度であるが、INH 62 回投与時、110 回投与時では接種側肺の 1 葉に限局した膿瘍、片肺全葉が被包化された膿瘍、胸壁との癒着はなはだしく肺の剥離の困難なものなど、種々の病変を示し、膿性内容も壊死巣の軟化融解に類した濃厚なものから一部透明な流パラ滴が認められる流動性の高いものまで種々の様相を示した。

Table 3-C. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium tuberculosis*, Strain Kurono, Isolated from Mouse Lungs in the Group Treated with 0.5 mg of INH

Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs												Autopsy findings
		INH concentration in medium (mcg/ml)												
		0	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10	20		
0.5 I ₁₁	10 ⁻²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	
	10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5 I ₁₂	10 ⁻²	27	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	++	
	10 ⁻³	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	10 ⁻⁴	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5 I ₁₃	10 ⁻²	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	+++	
	10 ⁻³	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	10 ⁻⁴	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
0.5 I ₁₄	10 ⁻²	++	++	++	++	++	++	++ ^S	0	0	0	0	+++	
	10 ⁻³	+	+	+	+	72	+	⑤	++ ^S	0	0	0		
	10 ⁻⁴	17	8	9	11 ^ℓ	29 ^ℓ	20 ^ℓ	8 ^ℓ	20 ^S	0	0	0		
0.5 I ₁₅	10 ⁻²	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	+++	
	10 ⁻³	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
	10 ⁻⁴	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++ ^{ℓS}	+++ ^{ℓS}	+++ ^{ℓS}	+++ ^{ℓS}		
0.5 I ₁₆	10 ⁻²	++	++	++	++	++	++	++ ^{ℓS}	++ ^{ℓS}	++ ^{ℓS}	++ ^{ℓS}	++ ^{ℓS}	++	
	10 ⁻³	+	+	+	37	53	56	77	37	29	18	24		
	10 ⁻⁴	13	9	18	2	5	10	6	2	0	1	10		3
0.5 I ₁₇	10 ⁻²	+	+	+	+	75	55	40	21	35	45	38	++	
	10 ⁻³	16	16	23	⑤	15	10	3	4	4	2	5		
	10 ⁻⁴	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1		
0.5 I ₁₈	10 ⁻²	30	29	45	52	43	37	30	4	3	12	6 ^S	4 ^S	++
	10 ⁻³	6	6	12	2	0	4	1	1	2	0	0		
	10 ⁻⁴	1	⑤	1	0	1	0	0	0	0	0	0		
0.5 I ₁₉	10 ⁻²	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	+++	
	10 ⁻³	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
	10 ⁻⁴	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++		

INH 62 回投与時、ならびに INH 110 回投与時の各群マウスの肺病変の程度をそれぞれ表 2 ならびに表 3 に表示した。表にみられるように、62 回投与時の各群の病変の程度には顕著な差異は認めがたいが、110 回投与時では INH 0.5 mg 投与群の病変は 0.1 mg 投与群、ならびに対照群の病変に比較するとわずかながらも軽度であった。

I b] マウスの肺病巣より分離した INH 耐性菌の INH 耐性度の Population

実験 I a] に際して INH 添加培地に生育した結核菌集落には比較的大型円型のものから粟粒状の微小のものまで、種々の大きさが認められ、その典型的なものについては表に記載した。また INH 耐性菌が full pop. で検出された例については、対照培地でも大型、小型の 2 種の集落が識別された。そこで 0.5 I₁₈ の肺乳剤を培養した INH 0.05 r 培地、対照培地から大型、小型それぞれ 1 集落；0.5 r、10 r 培地より小型集落を 1 集落、計 6

コの集落を単離し、それぞれ手振コルベンに移し、10 ml の滅菌脱イオン水を加えて菌液を調製し、それぞれを 10 倍、100 倍、1,000 倍に希釈して、その 0.1 ml ずつを INH 各種濃度添加、非添加 1% 小川培地に接種、37°C で 5 週間培養し、これら 6 種の結核菌集落の INH 耐性度の Pop. を検討した。

その成績は表 4 にみられるように、対照培地、0.05 r 培地より単離した大型集落はいずれも 0.1 r の INH に対して full pop. で耐性を示し、0.2 r 以上の耐性菌をほとんど含んでいない。分離された培地の種類とは無関係に 4 コの小型集落は 10 r までの INH に対して full pop. で耐性を示した。0.5 I₂、0.5 I₉ の分離菌についても検査を行つたが、同様の成績を示した。

以上の成績はマウス肺病巣内に出現した人型結核菌黒野株の INH 耐性菌には少なくとも、0.1 r/ml の INH に耐性を示す低耐性菌、10 r/ml またはそれ以上の濃度の INH に耐性を示す高耐性の 2 種類の耐性菌が存在し

Table 4. Correlation between INH Susceptibility and Colony Size of the Resistant Strains of Kurono Recovered from the Lungs of Infected Mouse Treated with INH

Source of colony	Size of colony	Dilution factor	Viable units of colony											
			INH concentration in medium (mcg/ml)											
			0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10	
Control medium without INH	Small	10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		10 ⁻³	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
		10 ⁻⁴	35	30	32	25	27	36	24	32	23	23	35	40
	Large	10 ⁻²	V	V	V	V	V	V	V	0	0	1	0	
		10 ⁻³	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	
		10 ⁻⁴	++	++	++	++	++	+	++	0	0	0	0	
		10 ⁻⁵	20	15	17	17	19	20	12	16	0	0	0	0
Medium containing INH 0.05 %/ml	Small	10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		10 ⁻³	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	
		10 ⁻⁴	24	17	25	12	22	6	8	16	15	15	17	12
	Large	10 ⁻²	V	V	V	V	V	V	V	4	3	0	0	
		10 ⁻³	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	
		10 ⁻⁴	++	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	
		10 ⁻⁵	42	45	40	27	32	33	46	41	0	0	0	0
Medium containing INH 0.5 %/ml	Small	10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		10 ⁻³	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	
		10 ⁻⁴	20	17	13	17	13	11	15	16	20	20	24	23
	Small	10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		10 ⁻³	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
		10 ⁻⁴	39	79	38	51	65	75	36	42	73	46	48	60

ていることを示している。

実験 II：牛型結核菌 Ravenel 株 感染マウスにおける薬剤耐性菌の出現について

〔実験材料ならびに実験方法〕

使用動物：CF #1 系雌マウス，週齡 4 週，飼育方法は実験 I と同様である。

結核菌感染方法：牛型結核菌 Ravenel 株を使用した。1% 小川培地に 37°C，3 週間培養，生育した菌苔をメノウ乳鉢に移し，滅菌生理的食塩水を用いて型のごとく 0.5 mg/ml の菌液を調製し，その 0.2 ml（生菌単位 38×10⁶/マウス）を尾静脈内に接種した。

薬剤投与：マウスを 10 匹ずつ 3 群に分け，1 群を薬剤非投与対照群とし，他の 2 群には感染翌日より INH 0.1 mg または SM 1.0 mg を 0.2 ml 溶液として 1 日 1 回，連日，25 回，皮下注射により投与した。その後 18 日間休薬，ふたたび上記と同様に薬剤投与を行つた。ただし再開後の薬剤投与は 1 日 1 回，週 6 日法により施行した。

結核菌の分離培養ならびに薬剤耐性菌の Population の測定：実験 Ia) の方法に準じて行い，薬剤投与 62 回（再開後 37 回），91 回（再開後 66 回）の各時期に INH 投与群，SM 投与群の数匹ずつのマウスを屠殺，全肺を

9 ml の滅菌脱イオン水で，ホモジナイザーにて乳剤とし，10% NaOH 1 ml を加えて雑菌処理，逐次 10 倍法で階段希釈してその 0.1 ml ずつを薬剤添加，および非添加の 1% 小川培地に接種，37°C に 5 週間培養した。

〔実験成績〕

本実験では対照群マウスは薬剤 25 回投与時には全例死亡し，その半数死亡日数は 19 日であつた。これに対し INH 0.1 mg 投与群，SM 1.0 mg 投与群は同時期において，それぞれ 10 匹全例が生残し，薬剤投与再開時すなわち，感染後 43 日においては INH 群では全例，SM 群では 8 例生残した。また薬剤 62 回投与時（感染後 86 日）では INH 投与群では 8 例，SM 投与群では 6 例が生残した。INH および SM 投与群の薬剤 62 回，91 回投与時の肺内結核菌数ならびにそれぞれの薬剤に対する感性度の Pop. 検査の成績を表 5 A, B にかかげた。表にみられるように INH 投与群では，62 回投与時の 3 例，91 回投与時 3 例中 2 例の肺内菌数は 10⁴～10⁵ であり，他の 1 例では 10⁵ 以上と推定される。また SM 投与群 62 回投与時の肺内菌数は 3 例とも 10⁶ 以上と推定され，91 回投与時の 2 例では 10⁴～10⁵ であつた。しかしながらこれらの菌の薬剤に対する感受性については，INH 投与群では全例を通じて 62 回投与時の 1

Table 5. Composition of the Bacillary Populations of *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel

A. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel, Isolated from Lungs of Mouse Infected Intravenously and Treated with 0.1 mg of INH

Days of treatment	Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs									
			INH concentration in medium (mcg/ml)									
			0	0.01	0.02	0.03	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	10
62	1	10 ⁻²	++ ++	*	++			0			0	0
		10 ⁻³	+ +		17			0			0	0
		10 ⁻⁴	9 7		2			0			0	0
	2	10 ⁻²	+++ ++					0			0	0
		10 ⁻³	49 45		12			0			0	0
		10 ⁻⁴	10 9		3			0			0	0
	3	10 ⁻²	+++ ++		++			70			0	0
		10 ⁻³	16 14		54			0			0	0
		10 ⁻⁴	4 3		0			0			0	0
91	4	10 ⁻²	66 32	63	30	13	1	0	0	0	0	0
		10 ⁻³	17 12	6	5	2	0	0	0	0	0	0
	5	10 ⁻²	+++ +++	+++	+++	+	4	0	0	1	0	0
		10 ⁻³	++ ++	++	++	42	0	0	0	0	0	0
	6	10 ⁻²	++ ++	++	+	36	6	0	0	0	0	0
		10 ⁻³	40 37	25	19	4	0	0	0	0	0	0

* Blank space = not tested.

Table 5-B. Susceptibility to Streptomycin of the *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel, Isolated from Mouse Lungs Treated with 1.0 mg of Streptomycin

Days of treatment	Mouse No.	Dilution factor	Viable units in mouse lungs							
			Streptomycin concentration in medium (mcg/ml)							
			0	2.5	5	10	20	40	100	
62	1	10 ⁻²	V V			0	0		0	
		10 ⁻³	V V			0	0		0	
		10 ⁻⁴	+++ +++			0	0		0	
	2	10 ⁻²	V V			0	0		0	
		10 ⁻³	V V			0	0		0	
		10 ⁻⁴	++ ++			0	0		0	
	3	10 ⁻²	V V			0	0		0	
		10 ⁻³	+++ +++			0	0		0	
		10 ⁻⁴	++ ++			0	0		0	
91	4	10 ⁻²	+ +	0	0	0	0	0		
		10 ⁻³	32 31	0	0	0	0	0		
		10 ⁻⁴	5 3	0	0	0	0	0		
	5	10 ⁻²	++ ++	0	0	0	0	0		
		10 ⁻³	+ +	0	0	0	0	0		
		10 ⁻⁴	18 18	0	0	0	0	0		

例に 0.1 r INH に対する不完全耐性が認められたのみであり、SM 投与群では 62 回投与時、91 回投与時ともに全例に SM 耐性菌の出現は認められない。本実験は薬剤の投与法になお検討の余地があり、かつ実験例も少数であるので結論を下しえないが、マウスに毒力の強い結

核菌を静脈感染して、薬剤非投与対照群が 100% 死亡する時点で薬剤投与群が 100% 生残しうるような感染条件、ならびに薬剤投与条件で長期間薬剤投与を行い、なおかつ肺から相当多数の菌を分離しうるような実験条件下でも、薬剤耐性菌の出現を認めえない場合のあること

を示している。

実験 III：牛型結核菌 **Ravenel** 株感染モルモット
における INH 耐性菌の出現とその
Population について

〔実験材料ならびに実験方法〕

使用動物：体重 600 g 以上の市販モルモット，感染時
月齢は約 12 カ月である。飼育環境条件は実験 I に準じ
たが，飼料はオリエンタル GC₅ 固型飼料を用いた。ケ
ージは 40×40×55 cm の金網製で，5～6 匹を収容し
た。糞尿は皿に受け，受皿は毎日交換して環境の保全に
努めた。

Table 6 A. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel, Isolated from
the Organs of Guinea Pig in Control Group before the Treatment

Guinea pig- No.	Days after infection	Remarks	Organ	Autopsy findings	Weight of organs used for culture (mg)	Viable units in organ											
						INH concentration in medium (mcg/ml)											
						0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1	10	
1	30	Killed	Spleen (2.1g)* *	++ *	10	++	++	++	+		0	0	0	0	0	0	
					1	53	42	29	9		0	0	0	0	0	0	
					0.1	8	2	2	0		0	0	0	0	0	0	
			Liver	++ ?	10	++	++	++	+		0	0	0	0	0	0	
					1	22	15	10	3		0	0	0	0	0	0	
					0.1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
			Lung	—	10	45	34	23	10		0	0	0	0	0	0	
					1	2	1	0	0		0	0	0	0	0	0	
					0.1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
2	30	Killed	Spleen (3.5g)	+++	10	+++	+++	+++	++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	+		0	0	0	0	0	0	
					0.1	30	26	15	9		0	0	0	0	0	0	
			Liver	++	10	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					1	+	+	+	+		0	0	0	0	0	0	
					0.1	20	18	9	8		0	0	0	0	0	0	
			Lung	++	10	V	V	V	+++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					0.1	++	+	+	+		0	0	0	0	0	0	
3	28	Died	Spleen (3.2g)	+++	10	V	V	+++	+++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					0.1	++	++	++	+		0	0	0	0	0	0	
			Liver	+++ ?	10	V	V	V	+++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					0.1	+	+	+	12		0	0	0	0	0	0	
			Lung	+++	10	V	V	V	+++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					0.1	++	++	+	+		0	0	0	0	0	0	
4	28	Died	Spleen (4.2g)	+++	10	+++	+++	+++	++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	+	10		0	0	0	0	0	0	
					0.1	30	29	10	0		0	0	0	0	0	0	
			Liver	+++ ?	10	V	V	V	+++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					0.1	92	87	60	52		0	0	0	0	0	0	
			Lung	+++	10	V	V	V	++		0	0	0	0	0	0	
					1	++	++	++	++		0	0	0	0	0	0	
					0.1	++	++	++	+		0	0	0	0	0	0	

* Macroscopic findings on the lungs are designated as follows :

— : no lesions.

± : suspicious tubercles.

+

++ : one or a few tubercles.

+++ : several tubercles scattered.

++++ : many discrete tubercles.

+++++ : many tubercles and partially confluent lesion or pneumonia-like consolidation.

These symbols are common in Tables 6 A, 6 B, 6 C, and 6 D.

In liver, macroscopic findings for tuberculous lesion are not so clear, but described according to the degree of enlargement and consolidation. In spleen, symbols are determined according to the same standard as in lung.

** Figures in parenthesis indicate the weight of spleen at autopsy.

結核菌感染方法：牛型結核菌 Ravenel 株を用い、Dubos-Albumin 培地 (Albumin は榮研製で 10% に添加) 1 週間ごとに 2 代継代培養した菌を遠沈管に移し、滅菌脱イオン水を加えて 3,000 r. p. m. で 10 分間遠心沈殿し、上清を除去、沈渣に 10% に寒天 (Difco Special Agar) を溶解した 2 ml の Sauton 培地を 45°C に加温して加えよく混和し、0°C で凝固せしめた。この寒天塊をホモジナイザーで摩砕して、得られた微細寒天片を滅菌脱イオン水で 2 回遠沈洗浄し、これを 1% グラチン加 Sauton 培地 60 ml に懸濁して感染菌液として使用した。個々の動物に接種された菌量は測定しえないが、菌液の調製に用いた Dubos 培地はこれを Colemann Spectrophotometer で 590 μm の吸光度を測定した結果から約 5 mg (湿菌量) の菌を含有していると計算された。

あらかじめ人型結核菌 H₃₇Rv の加熱死菌流パラ懸濁液の筋肉内注射 (1.0 mg/0.2 ml/モルモット) によつて感作され、ツベルクリン反応が陽性に転化しているモルモットの右肺内に胸壁を通じて上記菌液 0.5 ml を注射して感染した。

このような特殊な感染方法を用いたのは、感染初期の菌の散布をできるだけ制限し、菌接種局所病変の限局

化、壊死乾酪化ないしは空洞化を意図したためである。

薬剤投与：上記のような感染を行つたため、感染後 9 日より動物は死亡しはじめ、感染 1 カ月までに 66 匹中 32 匹の動物が死亡した。死亡例の多くは感染側胸腔内に多量の滲出液が貯留しており、感染 1 カ月後の死亡例では肺、肝、脾に多数の結節ないしは強い病変が肉眼的に認められた。結核感染 1 カ月後に生残モルモット 34 匹のうち 2 匹を屠殺し、直前に死亡した 2 匹の所見とあわせて薬剤投与前対照群とし、残りの 32 匹を次の 4 群に分けて薬剤を投与した。

- I INH 2.0 mg, 単独投与群
- II INH 10.0 mg, 単独投与群
- III INH 2.0 mg+PAS 100 mg, 併用投与群
- IV INH 10.0 mg+PAS 100 mg, 併用投与群

ただし上記の薬剤量は各モルモットに対する 1 回の投与量を示す。

上記の薬剤を 2.0 ml の生理的食塩水に溶解して、皮下注射により、1 日 1 回、週 6 日 2 週間投与、1 週間休薬、これを 1 サイクルとして投与をくり返した。ただし PAS 併用注射群は注射局所の炎症が強いので 16 回投与時より PAS を 50 mg に減量した。投与開始前、36 回、86 回、114 回 (投与終了) 投与時に、各群それ

Table 6 B. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel, Isolated from the Lung of Guinea Pigs Infected Intrapulmonarily and Treated Daily with 2.0 mg or 10 mg of INH Combined with or without 50 mg of PAS (Results after 38 days of treatment)

Treatment	Guinea pig No.	Days after infection	Autopsy findings	Weight of organs used for culture (mg)	Viable units in guinea pig lungs														Viable units in spleen	Viable units in liver	
					INH concentration in medium (mcg/ml)																
					0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1	10						
INH 2.0 mg/day	1	99 Killed	+++	10	+	+											0	0	+	+	
				0	15	11												0	0	20	15
				0.1	4	1												0	0	4	1
	2	95 Died	±	10. 1 0.1	58 11 0	37 7 0	67	⊙	24	⊙	1	0	0	0	0	0	10 1 0	9 1 0	+++ ++ 0	+++ ++ 37	
INH 10 mg/day	1	92 Died	+++	10	0	0											0	0	0	0	
				1	0	0												0	0	0	0
				0.1	0	0												0	0	0	0
	2	90 Died	+++	10 1 0.1	0 0 0	0 0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	
INH 2.0 mg/day with PAS 50 mg/day	1	99 Killed	+++	10	0	0											0	0	6	4	
				1	0	0												0	0	0	0
				0.1	0	0												0	0	0	0
	2	99 Killed	+++	10 1 0.1	10 3 1	7 2 0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
INH 10 mg/day with PAS 50 mg/day	1	99 Killed	++	10	32	42											0	0	0	0	
				1	3	3												0	0	0	0
				0.1	0	0												0	0	0	0
	2	99 Killed	+++	10 1 0.1	2 0 0	1 0 0	11	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 6 C. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel, Isolated from the Lung of Guinea Pigs Infected Intrapulmonarily and Treated Daily with 2.0 mg or 10 mg of INH Combined with or without 50 mg of PAS
(Results after 86 days of treatment)

Treatment	Guinea pig No.	Days after infection	Autopsy findings	Weight of organs used for culture (mg)	Viable units in guinea pig lungs													Viable units in spleen	Viable units in liver			
					INH concentration in medium (mcg/ml)																	
					0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1	10							
INH 2.0 mg/day	3	182 Killed	++ *	10	V	V	V	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	3	0	0	0		
				1	+++	+++	+++	++	80	64	28	46	20	41	32	40	0	0	0	0		
				0.1	++	++	++	+	8	8	3	0	4	7	4	5	0	0	0	0		
	4	182 Killed	+	10	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INH 10 mg/day	3	182 Killed	±	10	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	182 Killed	+	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INH 2.0 mg/day with PAS 50 mg/day	3	182 Killed	+	10	14	10	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	182 Killed	—	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	0	0												0	0	0	0	
				0.1	0	0												0	0	0	0	
INH 10 mg/day with PAS 50 mg/day	3	182 Killed	—	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	0	0												0	0	0	0	
				0.1	0	0												0	0	0	0	
	4	182 Killed	—	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	0	0												0	0	0	0	
				0.1	0	0												0	0	0	0	

* With a 10 mm sized round cavity with thick irregular wall in right lung.

それ 2~3 匹のモルモットを屠殺し、接種側肺、肝、脾の一部をとり秤量後滅菌脱イオン水および 10% NaOH を用いて、ホモジナイザーで 10 mg/ml の 1% NaOH 臓器乳剤を作り、1% NaOH で 10 倍または 100 倍に希釈、0.1 ml ずつを INH 添加、または非添加 1% 小川培地に接種、37℃ で 5 週間培養し、肺からの培養菌では INH 耐性菌の Pop. を、その他の臓器については単位重量内に含まれる生菌単位を測定しその成績を表 6 A, B, C, D にかかげた。なお表には接種側肺の結核病巣の肉眼的所見を結節の多寡、病巣の拡りの程度、性状によつて+~Ⅲの記号で表すとともに、壊死巣の有無、大きさ、さらには空洞の有無などについても記載した。

〔実験成績〕

薬剤投与前対照群の各臓器内の生菌数は 10 mg 当り $10^4 \sim 10^5$ であり、0.05 r 以上の INH 耐性菌は検出されていない。

投与 38 回時（感染後 99 日）では、各群モルモットの肺の肉眼的結核病変は投与前対照群のそれに比較して大きな差異は認められないが、INH 2.0 mg 投与群の 2 例を除き他の例では臓器内生菌数は激減しており、INH

耐性菌も検出されない。

投与 86 回時（感染後 182 日）では INH 2.0 mg 投与群の 1 例を除きさらに菌数減少の傾向が強く、また病変も軽微で少数の菌が検出されたにすぎない。しかしながらこの 1 例では接種側の肺に小空洞を認め、空洞内容から 10 r の INH 耐性菌が検出された。その Pop. は 1~2% である。

投与 114 回終了時（感染後 230 日）においては、INH 2.0 mg 投与群の肺病変は軽微であり、1 例に $10^2 \sim 10^3$ 程度の菌が検出されたが、いずれの動物にも INH 耐性菌は認められない。INH 10 mg 投与群の 2 例は、接種側肺にそれぞれ空洞または内容の一部軟化した被包乾酪巣が認められ、その部位からの検出菌数は単位重量当り 10^3 程度であるが、空洞例では 1 r 完全、10 r 不完全の INH 耐性菌群が、また被包乾酪巣例では INH 10 r までの完全耐性菌が証明された。ちなみにこれら動物の脾、肝からは菌は検出されていない。また PAS 併用の 2 群にはすべての動物に菌を証明しえない。

以上 INH 耐性菌を証明しえた 3 例のうち 2 例は空洞、1 例は内容の一部軟化した被包乾酪巣が認められた動物

Table 6 D. Susceptibility to INH of the *Mycobacterium bovis*, Strain Ravenel, Isolated from the Lung of Guinea Pigs Infected Intrapulmonarily and Treated Daily with 2.0 mg or 10 mg of INH Combined with or without 50 mg of PAS
(Results after 114 days of treatment)

Treatment	Guinea pig No.	Days after infection	Autopsy findings	Weight of organs used for culture (mg)	Viable units in guinea pig lungs														Viable units in spleen	Viable units in liver
					INH concentration in medium (mcg/ml)															
					0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.5	1	10					
INH 2.0 mg/day	5	230 Killed	+	10 1	8 1	4 0	12 1	⑤ 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	6 0	3 0	0 0		
	6	230 Killed	±	10 1	5 0	⑤ 0	3 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		
	7	230 Killed	+	10 1	+	+	+	38 12	17 3	3 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		
INH 10 mg/day	5	230 Killed	++ *	10 1	++ 25	++ 19	++ 30	++ 35	++ 26	++ 23	++ 33	++ 24	++ 30	++ 29	++ 25	+	0 0	0 0		
	6	230 Killed	++ **	10 1	++ 29	++ 19	++ 29	++ 28	++ 13	++ 17	++ 17	++ 29	++ 30	++ 24	++ 32	27 0	0 0	0 0		
INH 2.0 mg/day with PAS 50 mg/day	5	230 Killed	±	10 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		
	6	230 Killed	—	10 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		
INH 10 mg/day with PAS 50 mg/day	5	230 Killed	—	10 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		
	6	230 Killed	—	10 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		

* With a 15 mm sized encapsulated caseous-necrotic lesion with abscess in central area of the right lung.

** With a 15 mm sized cavity in the right lung.

であり、INH 投与開始前の4例、38回投与時の全群8例にはいずれもこのような病巣は認められず、耐性菌も検出されていない。INH と PAS 併用の2群では INH 耐性菌の出現を認めず、また INH 10 mg+PAS 50 mg 併用の86回、114回投与群では全例に菌が検出されず、PAS の併用効果が認められる成績と判断されるが、実験例数が少ないので結論はさしひかえたい。

総括と考察

動物の実験的結核症における INH, SM などに対する薬剤耐性結核菌の出現に関する研究は、Youmans²⁾, Canetti²²⁾ らによつて代表される耐性菌の出現を肯定するものと^{11)12)17)~19)21)}, Wolinsky⁵⁾, McCune^{13)~15)} らの報告にみられるように高度の耐性菌の出現はほとんど認められないとするもの、の2つに大別される。

一般的にいつて、動物実験での薬剤耐性菌の出現は、

① 使用結核菌株の当該薬剤に対する感受性または耐性の程度とその Population 構成、すなわち実験に供した菌株に目標とする薬剤に対する耐性菌が、どれくらいの程度の耐性菌が、どれくらいの比率に、もともと含まれていたか。

② 使用菌株の感染菌量、ならびにその菌株の供試動物に対する毒力すなわち動物体内における増殖力。

③ 使用動物の種類と結核菌感染によつて形成された

病巣の性状すなわち壊死あるいは乾酪化を伴う限局性病巣ないしは空洞の有無。

④ 供試薬剤の種類および投与方法すなわち結核菌感染後薬剤投与開始までの期間、投与量、投与期間など。

①, ②, ③, ④の実験条件によつて大きく左右されるものと考えられる。

このような観点から、以上のわれわれの実験成績は以下のように総括される。

実験 Ia] において、われわれはマウスの肺に限局性の壊死ないしは乾酪巣を形成させる目的で、人型結核菌黒野株の流バラ菌液を肺内注射するという特殊な感染方法を用い、かつ旧ツベルクリン 10 倍希釈液を結核感染後週1回、12 週間注射した。結核感染後2週より INH を約 11 週間および 19 週間にわたつて投与した結果、INH の1回量 0.5 mg という比較的大量の投与によつて高率に INH 耐性菌を出現せしめることに成功した。

同様の実験はその後もうり返されているが、成績の再現性は良好である。

旧ツベルクリンの注射は結核アレルギー反応を利用して病巣の壊死ないしは乾酪化を促進することを意図したものであるが、その後の実験ではツベルクリンの注射はこのような目的のためには必ずしも必要とせず、また耐性菌の出現にも大きな影響を与えないと判断される成績が得られている。

また流パラ菌液の肺内注射という感染法によると、INH 非投与対照群のマウスは高度の肺病変を有するにもかかわらず生残率が高く、INH 投与群の成績と対比せしめえたことはひとつの成果であり、表1、表2A、表3Aにみられるように対照群マウスの肺から分離された菌群のINH感受性は総体的には、INH 0.03 γ 以下と判定されるが、ごくわずかながらもINH 0.5 γ 以上の耐性菌を含んでおり、このことが特異な肺病巣の形成とあいまってINH投与による耐性菌の出現に大きな役割を演じたものと想定される。

事実 Canetti ら²²⁾は彼らの実験で結核感染に使用した2菌株はかなりの数のINH耐性菌を含んでいたことを報告しており、また木村²³⁾²⁴⁾は人型結核菌H₂株を*in vitro*の増殖環境で低濃度の薬剤に接触させて得られたINH低感受性株(INH 0.1~0.5 γ 不完全耐性)、SM低感受性株(SM 1 γ 完全耐性)をそれぞれマウスに静脈感染して、感染2週間後より1日量INH 0.2mgあるいはSM 0.4mgを投与し、INH投与群では71日投与で全例に5 γ 完全または不完全耐性菌を検出し、SM投与群では38日投与で10~50 γ の不完全耐性菌の出現を認めたと報告している。また安田⁹⁾は人型結核菌F株の1.0mgをマウスに静脈内接種し、感染翌日よりSM 0.5mgまたはINH 0.02mgを毎日投与し、SM投与137日で全マウスの肺からの分離菌にSM 1 γ 完全耐性菌の出現を認め、SM投与35日のマウス肺から分離した菌を新たなマウスに接種してSM投与を35~36日間続け、この操作をマウス4代までくり返したところ、4代目マウスSM 70日投与群の全4例にSM 10 γ 耐性菌が出現したこと、ならびにINH投与例では、INH 0.02mg、123日投与で1/5(5例中1例)にINH 1 γ 完全耐性菌が証明され、上記SM投与の場合のような操作を行った2代目マウスINH 35日投与例で2/6に10 γ 不完全耐性菌が、4代目マウスINH 70日投与例では1/4に10 γ 完全耐性菌が、3/4に10 γ 不完全耐性菌が出現したと報告している。この実験は薬剤投与が長期間であることが耐性菌の出現に一役を演じていることが考慮されねばならないが、供試菌のマウス継代と薬剤投与によつて、継代を重ねるに従つて感染菌群に含まれる薬剤耐性菌のPop.が上昇し、このことが耐性菌の出現に大きな要因となつたであろうことは想像にかたくない。しかしながらわれわれ²⁵⁾²⁶⁾はINH 0.1~0.2 γ の低耐性菌を高率に含む患者材料よりの分離菌株をマウスに静脈感染してINHを3~4週間投与したのではINH 1 γ 以上の耐性菌を高率に得ることはむしろ困難であることを実験し、またH₃₇Rv株と*in vitro*の増殖環境で薬剤に接触せしめて逐次耐性化したH₃₇Rv株のSM、INH二重耐性菌の混合菌液を結核死菌感作ウサギの肺内に注射して結核性空洞ないしは壊死巣を形成し、INHを10週およ

び20週間にわたつて投与した結果、病巣内結核菌群のINH耐性菌のPop.の上昇は感性菌の増殖抑制と耐性菌の選択的増殖が主因と考えられることをすでに発表した²⁵⁾²⁷⁾。

このように、動物の実験的結核症での薬剤耐性菌の出現には上記の①の条件がかなり大きな要因を占めてはいるが、後に考察するように③の条件もまた重要な役割を演じており、②、④の条件がこれに加わつて実験結果を複雑なものにしていると考えられる。

またわれわれは実験Ia]において、マウス肺から分離した結核菌集落に比較的大型円型のものから微小の粟粒状のものまで種々の大きさの集落が認められることに注目し、典型的な大型および小型集落計6集落について、そのINH耐性度のPop.を検討したのに、大型集落はいずれもINH 0.1 γ までfull pop.で耐性を示し、INH 0.2 γ 以上の耐性菌をほとんど含まず、小型集落はすべてINH 10 γ までfull pop.で耐性を示した。これらの集落について、定性試験でそのカタラーゼ活性を検した結果、大型集落のINH低耐性菌は弱陽性、小型集落のINH高耐性菌は陰性であり、また米田²⁸⁾の方法によつて菌の β 抗原の有無を検索したが、INH高耐性菌は β 抗原を証明しえず、低耐性菌は菌体にのみ β 抗原を認めえた²⁹⁾。以上の成績は動物の実験的結核症でもINHに対する耐性度をことにし、かつ他の属性でも明らかに区別しうる2種類のINH耐性菌を分離しうることを初めて実証したものであり、臨床的にみられているINH投与患者の喀痰中に出現するINH耐性菌の耐性の程度が動揺^{30)~40)}するという現象と関連してきわめて興味深く、動物実験でもこのような現象がみられるかどうかは今後の研究に待ちたい。

次に上記の②の条件、すなわち供試菌株の毒力、感染菌量、などと薬剤耐性菌の出現との関係という課題に関連する研究は、これを意図すると否にかかわらず、すでに多くの成績が報告されている。

Youmans ら²⁾は人型結核菌No.24株の1.0mgをマウスに静脈感染し、SM 1.5mgを連日155日間にわたつて投与し、高率にSM耐性菌を得たと報告しているが、この実験ではSM非投与対照群の平均生存日数は14.6日であり、Canetti ら²²⁾がINH耐性菌を高率に証明しえたとしている実験でも、S₁₃株あるいはS₁₇株を静脈感染されたマウスの半数死亡日数はそれぞれ26日および22日である。また染谷¹⁸⁾²¹⁾らは牛型結核菌TC₉₀株をマウスに静脈接種してINHを15週間経口投与し、INH 10 γ 完全耐性菌が高率に認められたと述べているが、この実験でのマウスの平均生存日数は17.1日である。さらにわが国でこの種の研究によく使用されている人型結核菌黒野株¹¹⁾¹²⁾¹⁷⁾¹⁹⁾はわれわれの経験によつてもそのマウスに対する毒力は相当に強く、牛場¹¹⁾、

手塚¹²⁾, 岩下¹⁷⁾はマウスに黒野株を静脈感染して, SM あるいは INH を投与し, 高率に薬剤耐性菌を分離しえたことを発表しており, われわれの実験 I の結果でも結核感染方法は異なるが, 高率に INH 耐性菌が証明されている。また岩崎²⁰⁾はマウスの静脈内に人型結核菌 KH₁ 株の 0.01 mg を接種し, 2 週後から Cortisone を投与して体内での菌増殖を促進せしめて, INH を 13 週間投与して INH 耐性菌を高率に出現せしめたと報告している。

しかしながら Wolinsky および Steenken⁴⁾はマウスに H₃₇Rv 株, Cambell 株, あるいは Erdman 株のそれぞれ 0.25 mg を静脈接種して SM を 160 日間にわたって投与し, 分離菌群の過半数に SM 感受性の低下を認めたが, SM 5 r 以上に耐性を示したものはわずかに 3/53 しか証明しえなかつたと報告しており, この実験での対照群マウスの平均生存日数はそれぞれ 69 日, 68 日および 58 日である。なお彼らはモルモット, ウサギを用いた実験でも同様の成績を認めている。McCune および Tompsett¹³⁾, McCune¹⁴⁾¹⁵⁾ らもマウスに H₃₇Rv 株の大量を感染して INH を長期間投与したのに INH 耐性菌の出現をほとんど認めえなかつたと発表し, 渡辺¹⁹⁾はマウスに黒野株の 0.01 mg, 0.1 mg, 0.5 mg, ならびに H₃₇Rv 株, 三輪株の 0.1 mg をそれぞれ静脈感染して感染翌日より INH 0.2 mg を毎日経口投与し, 3 週後すでに黒野株 0.5 mg 接種群では 4 例すべてに, また黒野株 0.1 mg 接種群では 2/4 例の肺病巣に INH 10 r 完全耐性菌の出現を認め, 5 週後には黒野株 0.5 mg 接種群には INH 100 r に部分耐性を示す菌群もみられたが, H₃₇Rv 株, 三輪株接種群では H₃₇Rv 群に 3 週後 1 例に INH 1 r 部分耐性を認めたのみで, 他は全例に耐性菌を証明しえず, 黒野株 0.01 mg, 0.1 mg, 0.5 mg 接種群の死亡日数の中央値はそれぞれ 27 日, 20 日, 18 日であり, H₃₇Rv 株, 三輪株接種群のそれは 42 日以上であつたと報告している。

われわれもまた実験 II において, マウスに毒力の強い牛型結核菌 Ravenel 株を静脈感染し, INH あるいは SM をかなり長期にわたって投与したが, この場合対照群マウスの半数死亡日数は 19 日であつたにもかかわらず, 薬剤耐性菌の高率な出現を証明しえなかつた。

以上の 2 つの相反する実験結果は, 動物の実験的結核症での薬剤耐性菌の出現には, 強毒菌の大量感染という条件が大きな要因ではあるが, これが必ずしも唯一の因子ではないことを示しており, 供試菌株の差異, おそらくは①の条件が耐性菌の出現に影響を及ぼしているものと考えられるが, 供試菌株に含まれているであろう薬剤耐性菌の Pop. 構成が, ことに動物に感染後薬剤投与前, 投与中, 実験終了時, などのそれが, 対照群動物の斃死のため正確に測定されていないので結論を下すことは困

難である。この意味においてわれわれの実験 I の成績は大きな参考になるものと思われる。

次に動物の実験的結核症での薬剤耐性菌の出現に上記の③の条件がどのような影響を及ぼしているかについてであるが, すでに述べたようにわれわれの実験 Ia] の成績は, 結核感染にマウスに毒力の強い黒野株を使用したにとどまらず, 流パラ菌液の肺内注射という感染方法をとつたためにマウスの肺に形成された病巣が壊死ないしは膿瘍であつたことが, 耐性菌の出現に有利に働いたことを示唆しており, このことはわれわれの実験 III の成績からも容易に首肯される。

すなわち, 実験 III においては, あらかじめ結核死菌で感作されたモルモットを用い, 牛型結核菌 Ravenel 株の特殊な菌懸濁液を肺内に注射し, 感染 1 カ月後より INH を投与した。

その結果はモルモットの肺に空洞あるいは乾酪壊死巣のみられた例からのみ耐性菌が高率に分離され, 耐性菌の出現に病巣の性状が大きな役割を果していることが明瞭に示された。

同様な成績は, Wolinsky ら⁵⁾がウサギに牛型結核菌 Ravenel 株を静脈感染した播種性結核症では SM の長期間投与によつても SM 高耐性菌の出現を認めえなかつたが, 噴霧吸入感染して肺に空洞を生じた 5 例のウサギに同じく SM を投与し, 1 例の遺残空洞の内容に SM 30 r 耐性菌を検出しえたとの報告, また鈴木ら⁸⁾の結核感作ウサギに 10% セラチン結核菌液を肺内注射して空洞を作成し, INH 投与によつて INH 10 r 耐性菌を証明し, 特に空洞部位に高率に検出したとの発表にみられ, 動物に形成された結核病巣の性状が薬剤耐性菌の出現に重要な影響を及ぼしていることをものがたっている。

事実ヒトの結核症においても, 化学療法に際して有空洞症例が無空洞症例に比較して薬剤耐性菌の出現が容易であることは周知の通りであり, 有空洞症例では空洞が大きいほど, また排出菌の多いほど耐性菌が高率に排出され⁴¹⁾⁴²⁾, また同一症例では空洞部位には他の病巣部位に比べて特に高率に耐性菌が証明される⁴³⁾⁴⁴⁾, などのことが報告されており, 動物実験でも形成された結核病巣の性状の如何が薬剤耐性菌の出現を大きく左右するものと考えられる。

さらにまた, INH 高耐性菌はそのモルモット, ウサギなどに対する毒力が減弱している(マウスに対しては必ずしもそうではない)ことが明らかにされており, また実験的に INH 耐性菌の増殖は環境に存在するいろいろの物質によつてかなり影響されることもすでに多く研究され, 空洞あるいは乾酪巣という環境下では INH 耐性菌はよく増殖することが報告されてお^{45)~47)}われわれもこれを実証²⁵⁾²⁷⁾した。したがつて動物の実験的結核症での, 特に INH 耐性菌の出現についての研究に際

しては、INH 耐性菌の生体内での増殖環境、すなわち使用動物の種類、形成された結核病巣の性状などがINH 耐性菌の出現に大きな要因となつてることが常に配慮されなければならない。

最後に、上記④の条件と耐性菌出現との関係については、Youmans²⁾の実験では SM 1 回量 1.5 mg 投与群が 0.75 mg 投与群より高率に SM 耐性菌が出現しており、また Canetti ら²²⁾の成績でも INH 1.0 mg 投与群のほうが 0.1 mg 投与群より速やかに INH 耐性菌の Pop. の上昇が認められ、われわれの実験 Ia] の結果でも INH 1 回量 0.5 mg 投与群は 0.1 mg 投与群に比較して INH 耐性菌の出現が確実でしかも高率であった。

これらの事実は動物実験での薬剤耐性菌の出現に投与薬剤の量、すなわち 1 回の投与量、投与期間なども 1 つの条件となつてゐることを示している。要はわれわれの既報²⁵⁾²⁷⁾の二重耐性菌を用いた実験成績が示しているように、生体内での薬剤感受性菌の増殖を抑制する量の薬剤が投与されることが必要であり、薬剤耐性菌の増殖にともなつて耐性菌の Pop. が上昇し、その結果をわれわれが耐性菌の出現として把握しているものと考えられ、薬剤が実際に作用しなければならない菌の増殖環境、すなわち形成された結核病巣の性状と薬剤の投与量、期間とが相関して耐性菌の出現に一役を演じることが考慮されねばならない。

なお Canetti²²⁾は結核感染後 2 週を経て INH 投与を開始し、この間における感染菌群中の INH 耐性菌の菌数の増加が、INH 投与による選択作用に対し有利な条件となつて INH 耐性菌の出現に好影響を与えた、と想定しているが、感染菌群中に混在した微量の INH 耐性菌が感染によつて生じた免疫を突破してその後も豊富な増殖を続けることに疑問を提起し、INH の耐性菌に対する増殖促進因子としての作用、あるいは耐性菌が INH によつて induce された可能性も否定しきれないとしている。しかしながら Canetti のこのような推定の当否は別問題として、結核感染後薬剤投与開始までの期間の問題は、むしろ感染菌が、その中に混在する微量の薬剤耐性菌を包含して、その増殖に好適な場、すなわち結核病巣を形成するのに要する期間と解釈するほうが妥当のように思われる。

結 語

動物の実験的結核症での薬剤耐性菌の出現について研究し以下の成績を得た。

1) 強毒人型結核菌黒野株の流動パラフィン懸濁液をマウスの肺内に接種して壊死ないしは膿瘍を主体とする結核病巣を形成し、INH の比較的多量をかなり長期にわたって投与し、確実かつ高率に INH 耐性菌が出現せし

めることに成功した。

2) このようにして得られた INH 耐性菌には、INH に対する耐性の程度をことにし (低耐性菌および高耐性菌)、かつ他の属性でも区別しうる、少なくとも 2 種類の耐性菌が存在することを証明した。

3) 強毒牛型結核菌 Ravenel 株の生理的食塩水菌液をマウスに尾静脈内感染し、INH あるいは SM を相当長期間投与したが、薬剤耐性菌の出現はほとんど認められなかった。

4) 強毒牛型結核菌 Ravenel 株の寒天包裡菌液を結核死菌感作モルモットの肺内に接種して、INH を投与したのに、空洞あるいは乾酪巣が形成された動物の肺からのみ INH 耐性菌が高率に分離された。

5) 以上の成績に基づいて、動物の実験的結核症での薬剤耐性菌の出現に関与する主要な諸因子について考察を加えた。

稿を終るに当たり、実験の遂行に協力してくださった教員各位に謝意を表します。

(本研究の一部は昭和 38 年、第 38 回日本結核病学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Feldman, W. H., Karlson, A. G. and Hinshaw, H. C.: Am. Rev. Tbc., 56 : 346, 1947.
- 2) Youmans, G. P., Williston, E. H. and Osborne, R. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 70 : 36, 1949.
- 3) Williston, E. H. and Youmans, G. P.: Am. Rev. Tbc., 62 : 156, 1950.
- 4) Steenken, W., Jr., Wolinsky, E. H., Pratt, P. C. and Smith, M. M.: Am. Rev. Tbc., 66 : 194, 1952.
- 5) Wolinsky, E. and Steenken, W., Jr.: J. Bact., 66 : 229, 1953.
- 6) 宮本泰・三浦馨・山崎久治: 結核, 28 : 379, 1953.
- 7) 北本治・岡田晃昌・福原徳光・石井省吾・坂本立身・高尾泰・鈴木実・小野みどり・芦刈宏彰・松宮恒夫: 結核, 29 (増刊号): 133, 1954.
- 8) 鈴木修・三島淳三郎: 結核, 29 (増刊号): 270, 1954.
- 9) 安田正憲: 結核, 30 : 39, 1955.
- 10) 大西積守: 結核, 30 : 64, 1955.
- 11) 牛場大蔵・阿倍逸夫・遠藤武・草間久子・横山宗雄: 結核, 30 : 114, 1955.
- 12) 手塚孝: 結核, 31 : 17, 1956.
- 13) McCune, R. M., Jr. and Tompsett, R.: J. Exp. Med., 104 : 737, 1956.
- 14) McCune, R. M., Jr., Tompsett, R. and McDermott, W.: J. Exp. Med., 104 : 763, 1956.
- 15) McCune, R. M., Jr., Lee, S. H., Deuschle, K. and McDermott, W.: Am. Rev. Tbc., 76 : 1106, 1957.

- 16) Schmidt, L. H.: Am. Rev. Tbc., 74, Part 2 : 138, 1956.
- 17) 岩下一郎: 結核, 32 : 489, 1957.
- 18) 染谷四郎・林治: 結核, 34 : 78, 1959.
- 19) 渡辺元洋: 結核, 34 : 503, 1959.
- 20) 岩崎龍郎・松崎芳郎・古久保文造・木野智慧光 : 結核, 34 (増刊号) : 217, 1959.
- 21) 染谷四郎: 結核, 35 (増刊号) : 31, 1960.
- 22) Canetti, G., Grumbach, F. and Grosset, J.: Am. Rev. Resp. Dis., 82 : 295, 1960.
- 23) 木村仁: 結核, 40 : 49, 1965.
- 24) 木村仁: 結核, 40 : 95, 1965.
- 25) 堀三津夫: 結核, 33 (増刊号) : 14, 1958.
- 26) 堀三津夫: 阪大医誌, 12 : 439, 1960.
- 27) 山之内孝尚: 阪大医誌, 12 : 867, 1960.
- 28) 米田正彦: 結核, 38 : 287, 1963.
- 29) Yoneda, M., Fukui, Y. and Yamanouchi, T.: Biken J., 8 : 201, 1965.
- 30) 熊谷岱蔵: 日結, 12 : 217, 1953.
- 31) 熊谷岱蔵・熊谷博・芦野芳久・相沢慎吉・金谷皓: 日結, 12 : 609, 1953.
- 32) Knox, R.: Lancet 1 : 443, 1953.
- 33) Johnston, R. N. and Riddell, R. W.: Am. Rev. Tbc., 70 : 442, 1954.
- 34) 石川哲也: 結核, 30 : 183, 1955.
- 35) 馬場真: 結核, 30 : 423, 1955.
- 36) 小倉貞雄: 結核, 30 : 446, 510, 1955.
- 37) Tompsett, R.: Am. Rev. Tbc., 70 : 91, 1954.
- 38) 佐藤直行: 結核, 29 : 393, 1954.
- 39) 佐藤直行: 結核, 30 : 310, 1955.
- 40) 喜多舒彦: 阪大医誌, 11 : 4143, 1959.
- 41) 芳賀敏彦: 日本化学療法学会雑誌, 1(1) : 3, 1954.
- 42) 桜井宏・下村康夫・井上幾之進・高井馨 : 日結, 16 : 281, 1959.
- 43) 小酒井望: 結核, 26 : 279, 1951.
- 44) Medlar, E. M., Bernstein, S. and Reeves, F. C.: Am. Rev. Tbc., 63 : 449, 1951.
- 45) Middlebrook, G. and Cohn, M. L.: Science, 118 : 297, 1953.
- 46) Peizer, L. R., Minkin, A. and Widelock: Am. Rev. Tbc., 70 : 728, 1954.
- 47) Rist, N.: Am. Rev. Tbc., 74, Part 2 : 75, 1956.