

原 著

感染菌の増殖度と結核化学療法効果

II. 種々な感染条件における観察

近藤 瑩子・金井 興美

国立予防衛生研究所結核部・細菌第1部

受付 昭和52年1月26日

STUDIES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE PROLIFERATION RATE OF
INFECTING TUBERCLE BACILLI AND THE EFFECTIVENESS OF
CHEMOTHERAPY

II. Observations in Various Types of Infection Experiment

Eiko KONDO* and Koomi KANAI

(Received for publication January 26, 1977)

1) Isoniazid-treatment was poor in its effectiveness on tubercle bacilli of the secondary infection whose multiplication was inhibited under the pressure of acquired immunity induced by the primary infection.

2) Mice were infected intravenously with tubercle bacilli preexposed *in vitro* to a low concentration of streptomycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Isoniazid-treatment with 0.5 mg daily dose was less effective on these infecting bacilli than on the unexposed control bacilli.

3) The multiplication of infecting tubercle bacilli was accelerated by cortisone-administration. Isoniazid-treatment was highly effective on those bacilli as revealed by remarkable reduction of viable counts in the spleen.

4) From these observations it was concluded that isoniazid-treatment was more effective when infecting bacilli were more active in multiplication.

はじめに

前報告¹⁾において述べたように、私たちはストレプトマイシン (SM) 依存株を用いた実験において、イソニアジド (INH) のような極めて強力な化学療法剤も、分裂静止状態の感染菌に対してはその効果を発揮しがたいことを観察した。この観察が、感染菌の状態と INH の治療効果との関係についての一般的な法則であるか否かは、極めて重要な問題である。

そこで私たちは、より自然に起こりうる条件をもつ三つの方法によつて、マウスにおける結核菌の増殖度と

INH 投与効果との関係を検討した。その一つは、有毒結核菌を用いて再感染実験を実施し、その再感染菌の増殖が阻止されている状態に対する INH の効果をみたものである。他の一つは、Mitchison²⁾ の報告に基づき、あらかじめ *in vitro* で低濃度の SM に暴露せしめた菌でマウスを感染し、この菌の消長に対する INH の投与効果をみた実験である。最後の一つは、コーチゾンによつて感染菌の増殖を促進せしめ、これに対して INH の治療効果をみたものである。

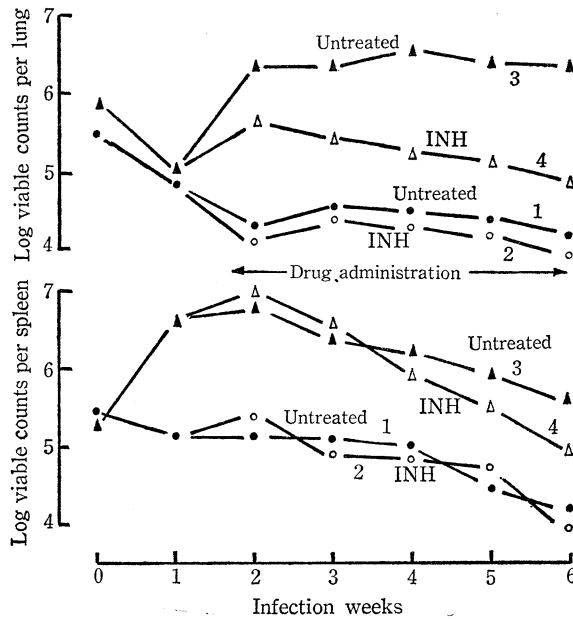
これらの実験のいずれにおいても私たちは、感染菌の分裂増殖の旺盛な場合に、INH の治療効果はより顕著

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

Fig.1. Effects of Isoniazid-treatment on the Fate of Inocula of Tubercle Bacilli Employed for the Primary or Secondary Infection

Design of experiment

| Mouse group | Infection with 0.1mg H37Rv | Interval | Infection with 0.05mg H37RvR-KM | Interval | Treatment with 0.1mg INH | Observation |
|-------------|----------------------------|----------|---------------------------------|----------|--------------------------|--|
| 1 | + | 4 wks | + | 12 days | - | Differential isolation of H37RvR-KM from spleen and lung |
| 2 | + | | + | | + | |
| 3 | - | | + | | - | |
| 4 | - | | + | | + | |



に表現されることを経験した。その成績を第II報としてここに報告する。

実験材料と方法

動物実験の材料と基本的な方法に関しては、前報告¹⁾とかかわるところはない。感染菌としてはカナマイシン(KM)耐性の *Mycobacterium tuberculosis* (H 37 Rv R-KM) と *M. bovis* (Ravenel R-KM) を用いており、それらの株を感染臓器から再分離するにあたっては、KMを 100 $\mu\text{g/ml}$ に含む小川培地を使用した。

実験成績

実験1. 初感染あるいは再感染に用いられた同一接種結核菌の消長に及ぼす INH の治療効果: 100 匹のマウスを用意して2群に等半し、その一方の群をKM感受性の H 37 Rv 株の 0.1 mg で一様に静注感染した。4週後、両群のすべての動物に、H 37 Rv R-KM 株の 0.05 mg を静注感染した。したがって、この接種菌は一方の群では再感染菌であり、他方の群では初感染菌とし

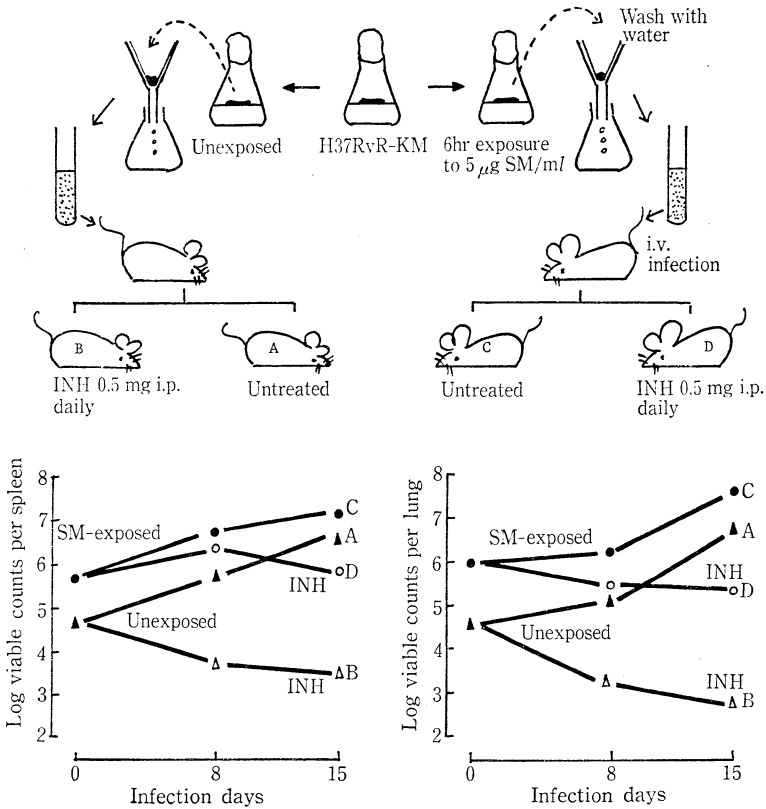
て用いられたことになる。4時間後、そして1週後に各群より3匹をサンプリングし、その肺、脾よりKM加小川培地を用いて H 37 Rv R-KM 株の選択分離を定量的に試みた。感染12日目からそれぞれの群を更に等半して二つの小群とし、その一方に、INH 0.1 mg を1日量として週6回、連日腹腔内投与した。

以後毎週、各小群より動物を3~5匹ずつサンプリングし、上述のように肺・脾からの感染菌分離を継続した。その成績を Fig.1 に示した。

肺における感染菌消長のカーブをみると、このKM耐性菌が初感染に用いられた第3群の場合、接種菌は1週後にかけて生菌数が減少し、それから2週までは増殖し、それ以後はほぼ同一レベルの菌数を維持して生残した。このような感染に対して、12日目から開始された INH 投与は効果を示し、第4群における菌数レベルは終始第3群のそれを下まわり、6週時まではほぼ 1/100 の菌数であった。

これに反し、同一菌液が再感染用として用いられた第1群においては、2週後まで感染菌数は下降し、そのあ

Fig. 2. Isoniazid-treatment of Mice Infected with Tubercle Bacilli which had been Exposed to Streptomycin (5 µg/ml) for 6 hr *in vitro*



と“persist”の状態となつている。このような感染菌消長は、初感染によつて成立している獲得免疫の影響によるものと考えられるが、この場合、INHの投与効果は極めて弱く、第1群と第2群のカーブのずれはわずかであつた。

脾においては、初感染の場合、H 37 Rv R-KMは接種後1週にかけて早くも増加し、1週から2週にかけピークに達し、そのあとは減少カーブに入つている。したがつて、INH投与はすでに増殖がピークに達した12日目から開始されているためか、その影響ははつきりあらわれなかつた。再感染菌として用いられた場合には、この接種菌の増加は全くみられず、INH投与によつてもその菌数消長に変化を来すことがなかつた。

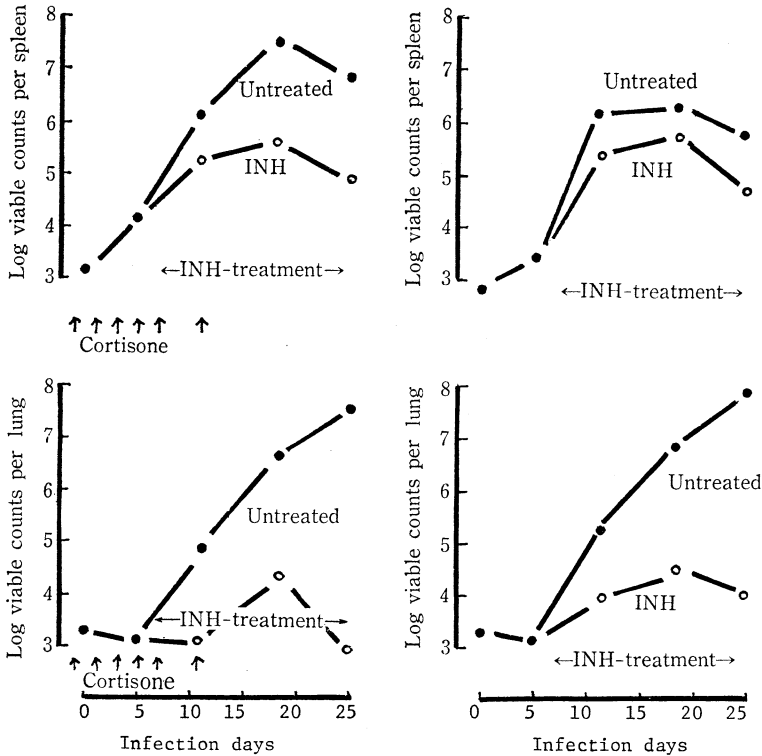
実験2. あらかじめ SM 5 µg/ml に暴露された菌による感染と INH 投与効果: Mitchison²⁾によれば、5 µg/mlの SM に6時間暴露された菌は、たとえ SM がその環境から除かれたあとも、8~10日間分裂静止状態 (lag) にとどまるとされる。この報告に基づき、ソートン合成培地上の H 37 Rv R-KM 株を用い、その15日発育時に SM を 5 µg/ml に加えて6時間放置した。そのあと、Fig. 2 に示したように菌体を水でよく洗つてから菌液を

調製し、その 0.5 mg 菌量を用いて25匹のマウスを静注感染した。SM と接触せしめない対照菌はその 0.1 mg を用い、上と同様に別の25匹のマウスに静注感染した。感染4時間後、それぞれの群から5匹ずつ殺して肺・脾の定着生菌数を測定し、残りを10匹ずつの二つの小群とし、その一方を INH 0.5 mg の連日投与で治療した。感染8日目、15日目に各小群より5匹ずつサンプリングし、肺・脾から定量的に感染菌を分離してその消長を追求した。

成績は Fig. 2 に示した。SM 暴露菌はある程度の生菌数減少があるものと予測し、対照菌の5倍量を感染に用いたが、現実には生菌数の減少はなかつたため、定着菌数は対照菌の10倍前後となつた。この2種類の接種菌に対する INH の治療効果は、それぞれの非治療群と治療群における感染菌消長曲線の開きで評価される。そして、この図から明らかなように、その開きは SM 暴露菌の場合においてははるかに小さく、INH 投与効果の弱かつたことを示唆している。

実験3. コーチゾン注射による感染菌増殖促進と INH 投与効果: 40匹のマウスを *M. bovis* (Ravenel R-KM) の 0.01 mg で静注感染した。20匹ずつの2群に分ち、

Fig. 3. Effects of INH-treatment on the Fate of *M. bovis* (Ravenel) in the Mice Pretreated or Untreated with Cortisone



その一方の動物には感染前1日、感染後1日、3日、5日、7日、11日目にコーチゾン（酢酸コーチゾン水性懸濁液 25 mg/ml、日本メルク万有株式会社製）を5 mg ずつ腹腔内に注射した。7日目に各群を更に10匹ずつの二つの小群とし、その一方のマウスに対し、INH 1日量 0.5 mg の腹腔内連日注射による治療を開始した。この間、感染当日には全体から4匹、5日目には各群より2匹、11日目、18日目、25日目には各小群よりそれぞれ2匹、3匹、3匹をサンプリングし、肺・脾における感染菌の定量的分離を実施した。各小群における感染菌消長曲線を Fig. 3 に示した。

実験1、2と同じく、対照群と治療群の間における感染菌消長曲線の開きの大小によつて治療効果をみるならば、コーチゾン注射マウスの脾における INH 投与効果は顕著であつた。コーチゾンによる免疫抑制作用によつて脾における感染菌の分裂増殖は促進され、これに対して INH の殺菌効果は増強されたと解せる。肺においては、コーチゾン投与の如何にかかわらず、感染菌の増殖は脾におけるよりもはるかに旺盛であり、したがつて INH 投与の効果はいずれの場合においても極めて顕著で、両群の間での差はほとんど認められなかつた。

考 察

実験1と実験3の成績は、結核感染における菌の消長

が、その毒力（増殖力）と宿主の獲得免疫（防御力）とのバランスによつて支配されていることを示唆している。そして、INH 投与効果は、菌の増殖の旺盛な時期には顕著であるが、獲得免疫が成立して菌の増殖が静止に傾くと、その効果が減弱することが証明された。また、実験1にみるように、獲得免疫による抗菌力は肺よりも脾において強く表現されるので、化学療法効果はむしろ発揮されにくい。このことは、マウスを用いて持続感染と結核化学療法効果の関係について研究した McCune と Tompsett の最初の論文³⁾にすでに指摘されている。

したがつて、獲得免疫が発展すれば、それだけ INH 投与効果はおちるといふ、結核治療に関しては二律背反的な状況ができるが、治療というものが終局的には個体の防御力に依存すべきであるという建前からすれば、むしろ合目的な帰結であろう。ただ問題は、そのため残存した感染菌が長い年月ののちに、再発の原因となりうることである。この辺に現在の結核化学療法の中心問題の一つがあろう。

実験2は上の二つの実験と異なり、もともと抗結核剤の投与方法と関連した問題であつた。Mitchison²⁾はその基礎実験として、*in vitro* で結核菌を種々の抗結核剤に一定時間暴露せしめ、薬剤をその環境から除いたのち、生き残つた菌が分裂を再開するまでの時間を測定した。その実験では、SM 5 μ g/ml に6時間暴露した菌の場合、

8～10日という結果を得ている。私たちはこの報告をもとに実験2を計画したが、その結果は、こうした低濃度のSMに接触した感染菌に対して、INHの効果はおちることを示している。このことは、SM投与は殺菌的に働く十分な量を与えるべきで、不十分な量ではむしろINHの併用効果にとつてもマイナスな結果になりうることを示唆している。いずれにせよ、この実験によつても、感染菌の増殖度とINH投与効果の関係が実証されたと考える。

INHが分裂中の結核菌にのみ働いて休止菌に作用しないことは、MacknessとSmith⁴⁾、Schaefer⁵⁾の*in vitro*の実験で証明されているが、私たちはこのことが*in vivo*においても事実であろうことを動物実験で示し

た。慢性結核における閉鎖病巣中の“persisters”と結核化学療法の問題を、こうした視点から再検討することは、結核症の再発や悪化の問題と関連して重要であろう。

文 献

- 1) 近藤瑩子・金井興美：結核，52：411，1977.
- 2) Mitchison, D. A.: Bull. Intern. Union against Tuberc., 43：322，1970.
- 3) McCune, R. M. and Tompsett, R.: J. Exptl. Med., 104：737，1956.
- 4) Mackness, G. B. and Smith, N.: Amer. Rev. Tuberc., 67：322，1953.
- 5) Schaefer, W. B.: Amer. Rev. Tuberc., 68：125，1953.