

原 著

## 感染菌の増殖度と結核化学療法効果

## I. ストレプトマイシン依存株を用いたマウス実験モデル

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  
EFFETIVENESS OF CHEMOTHERAPYI. Observations in a Mouse Experimental Model Using  
a Streptomycin-dependent Strain

Eiko KONDO\* and Koomi KANAI

(Received for publication January 26, 1977)

Mice were infected intravenously with a streptomycin-dependent strain of tubercle bacilli which had been brought into the antibiotic-starved condition by growing them on streptomycin-free Sauton medium. Chemotherapy with isoniazid, isoniazid plus pyradinamide, or ethambutol exerted little influence on the persisting or declining fate of these infecting bacilli, but rifampicin reduced markedly their viable counts in the spleen and lung down to the undetectable level. From this result in the highly artificial model, a suggestion was made that rifampicin, unlike isoniazid and ethambutol, might be effective even against the resting or persisting bacilli in tuberculous lesions.

## はじめに

結核化学療法が、期待すべき効果を挙げえない場合、その理由としていくつかの点が指摘されてきた。耐性菌の発生、感染組織における薬剤有効濃度維持の問題がそのもつとも重要な要因であろう<sup>1)</sup>。後者については、単に薬剤の投与量、投与方法、血中濃度の面のみでなく、結核菌の宿主細胞であるマクロファージ内の薬剤濃度、病巣内乾酪物質による薬剤と菌との接触阻止、病巣をとりまく血管の乏しい結締織の存在、更に宿主酵素による薬剤の不活化などが考慮されてきた<sup>2)</sup>。

これらの要因に加えて私たちは、慢性病巣内における分裂静止菌が代謝的に不活発であり、このため薬剤に対

する感受性が一般的にひくい“persisters”であろうという説<sup>2)</sup>に興味をいだいてきた。この問題につよい関心をもつ前川ら<sup>3,4)</sup>は、以前より主として *in vitro* で研究をすすめており、また臨床的立場からは、切除肺の閉鎖病巣の培養所見<sup>5,6)</sup>がこの現象に深いかかわりをもつと考えられる。しかし実験的研究を主とする私たちは、これまで人為的なマウスモデルで問題の検討を続けてきた<sup>7,8)</sup>。

方法としては、*in vitro* で分裂静止状態とした菌を感染に用いる点に新しいアプローチがあるが、その手段としてストレプトマイシン (SM) を分裂増殖のために必要とする SM 依存変異株<sup>9)</sup> を利用してきた。この菌がそのまま現実の“persisters”を代表するものとは考えられないが、いずれにせよ、この菌による感染に対して、イン

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

ニアジド (INH) はその強力な治療効果を発揮しなかつた<sup>7)</sup>。また、もしこうした感染にも有効な薬剤があるとすれば、それはこれまでの結核化学療法に一つの飛躍的発展を約束する可能性も考えられる。

私たちは、予備的実験ではあつたが<sup>8)</sup>、リファンピシン (RFP) がこの実験的分裂静止菌感染にも効果のあることを観察した。その後の本実験においても、INH、エタンブトール (EB) と異なつて、RFP は確実に分裂静止感染菌を減少せしめることを認めた。この成績が、現在 RFP の得ている高い評価の裏づけとなるか否かは今後の問題として、一つのアプローチによる観察結果として記録にとどめたい。

### 実験材料と方法

実験動物: ddY マウスの雄、体重 18~20g のものを用いた。10 匹ずつおがくずを敷いたアルミ製のケージに入れ、固型飼料と水を用いて飼育した。

感染: すべて尾静脈において静注感染を行なつた。

菌株: 結核菌 H2 株由来の SM 依存株 18b<sup>9)</sup> とカナマイシン耐性の *Mycobacterium bovis* のラブネル株を使用した。これらはソートン合成培地上で継代維持され、前者には特に SM を 50 $\mu$ g/ml に加えた培地を使用した。この株を SM 欠乏状態による分裂静止菌とするためには、SM を含まない新鮮培地に移植して 10~14 日間残余増殖せしめた。感染にあつては、ソートン培地上発育菌膜より蒸留水浮遊液を調製した。

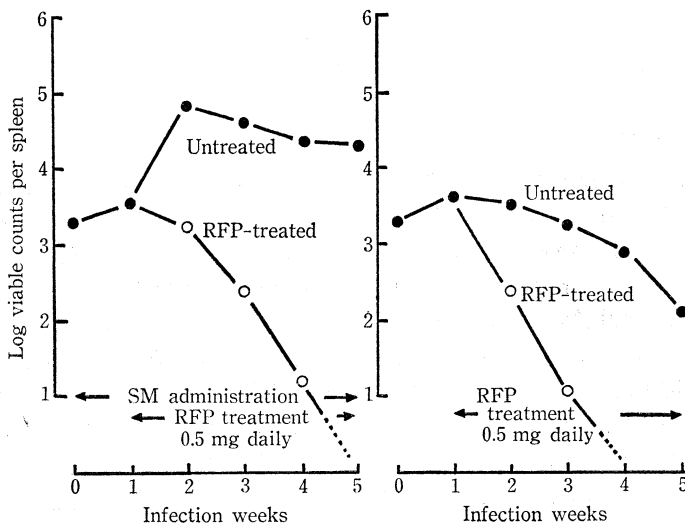
薬剤投与: INH, EB はそれぞれ 2.5 mg/ml、5 mg/ml の水溶液とし、1 回にその 0.1 ml ずつを腹腔内に注射した。RFP および PZA はそれぞれの 150 mg に 50 ml のプロピレングリコールを加えて加温して溶かし、更に水で 1.5 l に希釈した (0.1 mg/ml となる)。これを吸水塚より経口的に投与した。1 匹のマウスは 1 日平均 5 ml を吸飲した。解剖前日には治療薬剤の投与を中止した。SM は 50 mg/ml の水溶液とし、その 0.2 ml を腹腔内に毎日注射した。

肺・脾よりの感染菌分離: 肺・脾を摘出し、重量を測定したのち、それらの表面を滅菌蒸留水でよく洗い流し、濾紙で吸湿したのち、それぞれ蒸留水を媒液として 10 倍乳剤を調製した。これをガーゼ 1 枚を通して濾過し、その濾液は蒸留水によつて連続 10 倍希釈を行ない、その適当と推定される 3 段階の希釈度のものを、それぞれ 0.1 ml ずつ 3 本の小川培地 (1% 磷酸カリ・グリセロール鶏卵培地) に接種した。SM 依存株分離のためにはストレプトマイシンを、KM 耐性株分離のためにはカナマイシンを、それぞれ 100 $\mu$ g/ml に加えた培地を使用した。4 週培養後の集落数より、臓器全体における感染菌数を計算した。

### 実験成績

実験 1: 100 匹のマウスを一樣に SM 欠乏状態の SM 依存株の 0.02 mg で静注感染した。50 匹ずつの 2 群に分け、一方の動物には SM 1 日量 7.5 mg の腹腔内連日

Fig. 1. Effect of Rifampicin Treatment on the Fate of Multiplying and Resting Tubercle Bacilli in the Mouse Spleen



Note: Infection was made intravenously with a SM-dependent strain of tubercle bacilli (18b) which had been brought into SM-starvation. The bacilli could multiply under SM-administration into the infected mice.

投与を開始し、他方の群にはSMを投与せず、分裂静止菌感染とした。1週後、これらの群をそれぞれ25匹ずつの二つの小群とし、その一方をRFP投与群とした。投与は1日量0.5mgを経口的に連日実施した。感染直後、そして1週ごとに各群より4匹ずつサンプリングし、それらの脾をプールしてホモジネイトとし、その生菌単位数を測定して各群における感染菌数の消長を追求比較した。成績はFig.1に示した。

SM投与によつて、18b株は2週間に100倍近く増殖し、以後ほとんど同一菌数レベルで残し、SMを投与しない場合はほとんど増殖せず、徐々に減少して5週間にはじめの1/10ほどの菌数レベルになった。

このいずれの場合もRFPは効果を示し、3週あるいは4週以後は検出限界以下に菌数は減少してしまつた。

実験2：80匹のマウスを*M. bovis* R-KM(Ravenel) 0.005mgとSM欠乏18b株0.1mgで同時混合静注

感染した。5日後、20匹ずつの4群に分け、1群を対照非治療群とし、残り3群はそれぞれ1日量INH0.25mg, RFP0.5mg,あるいはPZA0.5mgとINH0.25mgの併用による連日投与の治療を開始した。感染当日ならびにほぼ10日間隔で、各群より3匹または4匹をサンプリングし、摘出した肺そして脾をプールしてそのホモジネイトの生菌単位数を測定した。この際、培地はKM含有ならびにSM含有小川培地を同時に使用して、感染に用いた2種類の菌を鑑別分離した。成績はFig.2に18b株を、そしてFig.3にR-KM(Ravenel)株を示した。Fig.2をみると、非治療群においてもSM依存18b株は脾内では極めて徐々に、肺においてはより速やかに減少し、60日間に脾では1/10に、肺においては1/100に減少していることがわかる。このような感染菌に対してRFPは顕著な殺菌効果を示し、40日あるいは50日以後には検出限界以下に減少せしめた。これに反し、

Fig.2. Effects of Chemotherapy with RFP, INH or INH plus PZA on the Fate of Resting Tubercle Bacilli in the Mouse Spleen and Lung

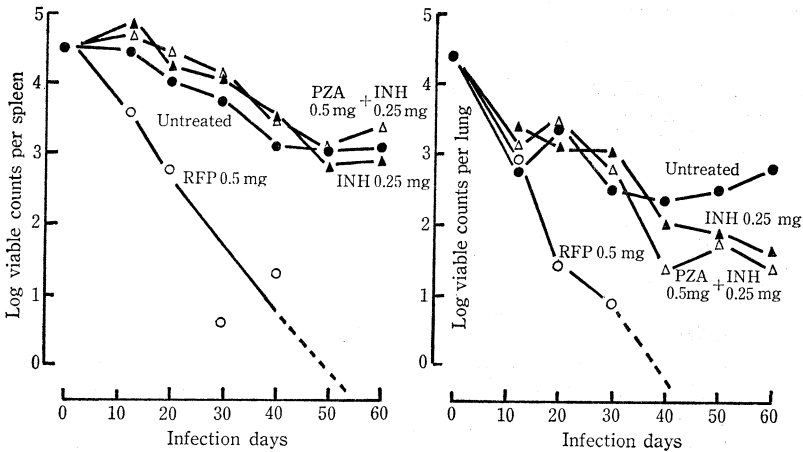
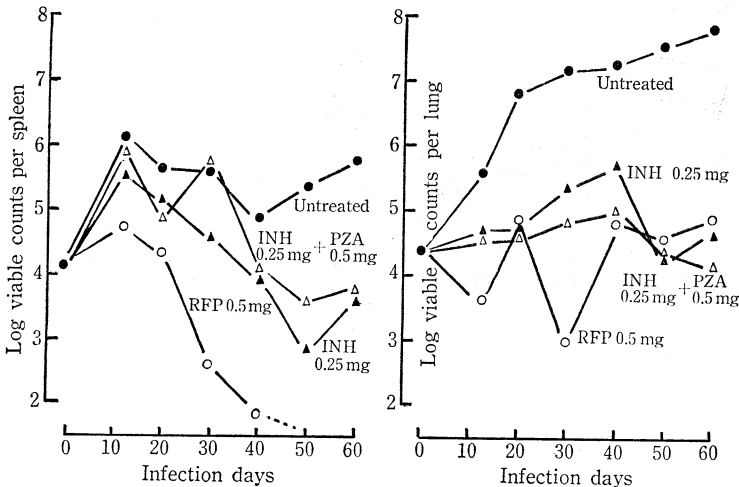


Fig.3. Effects of Chemotherapy with RFP, INH or INH plus PZA on the Fate of Multiplying Tubercle Bacilli in the Mouse Spleen and Lung



INH そして INH と PZA の併用投与はほとんどみるべき効果を示さなかつた。

他方, Ravenel R-KM 株については Fig. 3 の示すように, 肺においては 60 日間増殖を続け, 脾においてははじめの 2 週間のみ菌数上昇をみた。このような感染に対してはいずれのレジメンも治療効果を発揮した。特に菌増殖率の高い肺において感染菌の減少効果が顕著であつた。

以上のように, 一つの個体の中に分裂静止菌と増殖菌とが混合感染している場合, RFP がそのいずれにも効果を発揮し, INH は分裂菌にのみ有効であつた事實は, RFP が INH にない特性をもつという点で高く評価される。INH と PZA の併用については, 文献<sup>11)</sup>に基づくはじめの期待がかなえられなかつたが, 投与方法の違いや, SM 依存株という特殊な状態によるものかもしれない。

同じ分裂増殖菌であつても, 局所免疫が強く発現してその増殖率の低い脾におけるよりも, 逆の環境である肺で化学療法効果が強くでる所見は, 宿主(免疫力), 菌, 薬剤の 3 者の関係によつて, 治療効果のきまることを示唆している。

実験 3: 60 匹の正常マウスを 15 匹ずつの 4 群に分ち, うち 2 群には SM 欠乏 18b 株の 0.5 mg で静注感染し, 残り 2 群には SM 含有ソートン培地上で生育 18b

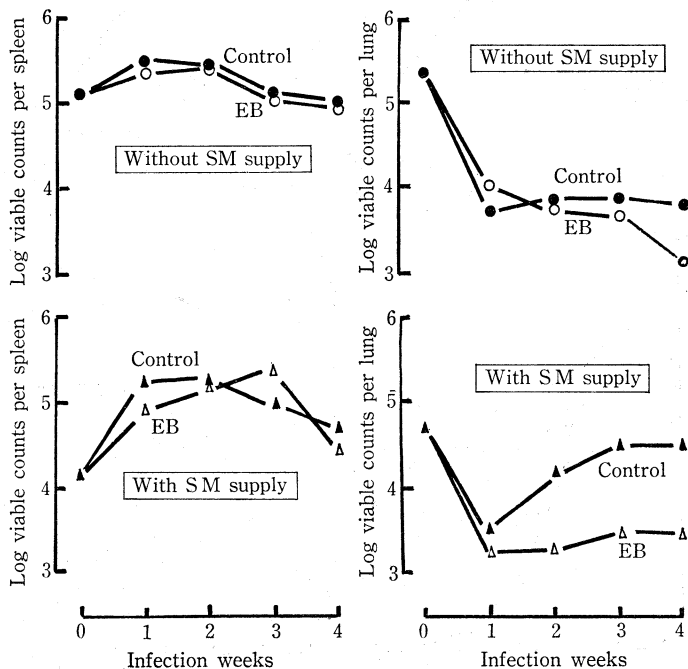
株の 0.01 mg で同様に感染した。このあとの 2 群のマウスに対しては, 感染直後から SM を毎日 10 mg 腹腔内に注射して, 感染菌の増殖を支持した。感染 3 日目に 2 種類の感染動物をそれぞれ 2 群に分け, 一方を非治療対照群とし, 他方を EB 0.5 mg の腹腔内注射(週 6 回)で治療を開始した。肺, 脾における感染菌の消長は, 毎週定量的培養法によつて型のごとく追求した。成績は Fig. 4 に示した。SM 投与によつて肺で増殖中の菌に対しては EB の効果が明らかに発揮されているが, SM 不投与の場合, あるいは脾でみられるように分裂静止状態の菌には, EB は効果の弱いことが示されている。

## 考 察

マウスの実験的結核感染の慢性期において, 感染菌は長期間ほぼ一定菌数レベルで残存するが, これは Rees と Hart<sup>10)</sup> の研究によつて, 宿主防御力と菌との間に成立する静的平衡, すなわち分裂増殖を静止したまま菌が生残するためと解される。このような菌に対して, INH 単独投与では効果が少ないが, PZA と併用することによつて著明な菌数減少をみることは, McCune, Tompsett, McDermott<sup>11)</sup> によつて報告され, 臨床的にも英国の指導のもとに PZA が東アフリカ地区で広く用いられている<sup>12)</sup>。

私たちの実験系においては, PZA の併用効果が認め

Fig. 4. Effects of Chemotherapy with Ethambutol on the Fate of Resting and Multiplying Tubercle Bacilli in the Mouse Spleen and Lung



られなかつたが、上述の研究者が飼料にまぜて PZA を投与したのに対し、私たちは飲料水に混じて与えたという違いはあつた。しかし RFP がこの分裂静止菌による感染に顕著な治療効果を示し、この点で INH や EB にない優れた RFP の特性が確認された。SM 欠乏による SM 依存株の分裂静止が、ヒトの閉鎖病巢中の菌とどの程度に共通点が存在するかは、さしあつて不明である。しかし現在、RFP によつて結核化学療法が一つの飛躍的發展を画し<sup>13)</sup>、咯痰の菌陰転化を促進し、悪化と再発とを減少せしめているという報告<sup>14)</sup>に接するとき、私たちの成績も何らかの意味をもつように思われる。

SM 欠乏によつて分裂静止した SM 依存株は、いわゆる“maintenance”のための代謝に切り替わり、例えば大腸菌においては、解糖系の活性が高まり、呼吸能が減少し、チトクローム酸化酵素の活性が減弱するといわれる<sup>15)</sup>。残余の呼吸はチトクローム b とフラビンによつて代行されるとも報告された。また宿主体内に接種されてからも、そうした代謝系への傾斜はひき続き強まると考えられる。臓器から菌を SM 培地上に還元培養する際、感染後日数が経つにつれて、分離培地上で集落が形成されるまでの時間が延長する。このことは、SM のない組織内での代謝系から、SM のある培地上での分裂増殖可能な代謝系への転換が、感染日数の進展とともに、次第に困難さを増すためと解すべきであろう。

いずれにせよ、このように代謝変調を来した感染菌に対して、INH と EB はその作用を発揮できず、RFP にはなおその活性があるとすれば、その理由はいずれ菌の代謝と RFP の生化学的作用機序<sup>16)</sup>との関連で説明すべきであろう。

McCune<sup>17)</sup>らは、あらゆる細菌学的手法によつてマウス体内から菌が検出できなくても、それは必ずしも菌の“eradicate”を意味するものではなく、むしろ潜在感染への移行と考えるべきことを述べている。つまり、菌は宿主内で分裂静止しても培地に再分離可能な“dormant infection”から、上述のような“latent infection”にいたるまで、感染菌は *in vivo* において段階的な代謝状態をとると考えられる。また、その各段階に応じて薬剤感受性も変化しうるのではなからうか。とすれば、RFP の効果も、そのある特定段階に対するものにとどまるのかもしれない。

以上のような実験的報告に関連して、私たちは切除肺の培養成績に関心をもちざるをえない。数多くの文献を列挙しえないが、6カ月以上咯痰培養陰性である71名の患者について、その非空洞性病巢(肺切除標本)を培養した佐藤<sup>5)</sup>の最近の報告では、陽性率は2.8%にとどまり、それ以前の山下・松井<sup>6)</sup>の成績より更に低率となつている。塗抹陽性・培養陰性例は53.6%であり、現在のわれわれの細菌学に基づくかぎり、この成績は、閉鎖

病巢内の菌の多くが“死菌”であることを意味している。しかし、抗酸菌が *in vitro* と *in vivo* との環境では代謝系、ことに終末電子伝達系が異なるという報告<sup>18)</sup>がみられ、酸素分圧の低い病巢中に長く存在した菌が、容易に好気的な培地環境に適応しえない可能性も考えられる。*In vivo* における“persisters”のL型<sup>19)20)</sup>の問題もあるので、私たちの細菌学的手法に新たな進展をみるまで、培養陰性菌の生死については結論を保留するのが賢明であろう。ただ、このような“persisters”が化学療法に反応しないとすれば、その潜在的意味は重大であり、RFP が果たしてこの菌に対しても有効であるか否かに私たちの関心が高いのである。

## 総 括

SM 依存株の SM 欠乏菌を用いて分裂静止結核菌感染をマウスに成立せしめ、これに対する化学療法を検討した。INH, EB はこの条件の感染に抗菌効果を示さなかつたが、RFP は極めて顕著な殺菌力を示した。

この実験が、ヒトの慢性結核における閉鎖病巢中の結核菌、あるいは“persisters”のモデルになりうるか否かには議論がある。しかし RFP が INH や EB にない抗菌効果をもつことは確実で、その臨床上の高い評価の裏づけの一つと考える。

## 文 献

- 1) Mitchison, D. A.: Bulletin of Internat. Union against Tuberc., 43: 322, 1970.
- 2) Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A.: Review of Medical Microbiology, Lange Medical Publishers, 204, 1974.
- 3) 前川暢夫・池田宣昭・裏辻康秀: 結核, 48: 913, 1976.
- 4) 太田令子: 結核, 46: 295, 1971.
- 5) 佐藤瑞枝: 結核, 51: 329, 1976.
- 6) 山下英秋・松井晃一: 結核, 44: 383, 1969.
- 7) 金井興美・近藤肇子: 結核, 44: 379, 1969.
- 8) 金井興美: 結核, 49: 269, 1974.
- 9) 橋本達一郎: 結核, 30: 4, 1955.
- 10) Hart, D. P. and Rees, R. J. W.: Brit. J. Exptl. Pathol., 41: 414, 1960.
- 11) McCune, R. M., Jr., Tompsett, R. and McDermott, W.: J. Exptl. Med., 104: 763, 1956.
- 12) Second East African/Brit. Med. Res. Council Study: Amer. Rev. Resp. Dis., 114: 471, 1976.
- 13) 砂原茂一: 結核, 51, 123: 1976.
- 14) 杉山浩太郎 他: 結核, 51: 505, 1976.
- 15) Engelberg, H. and Artman, M.: Biochim. Biophys. Acta, 47: 553, 1961.
- 16) Konno, K., Oizumi, K. and Oka, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107: 1006, 1973.
- 17) McCune, R. M. et al.: J. Exptl. Med., 123: 445, 1966.
- 18) 森竜男: 結核, 51: 495, 1976.
- 19) 高橋昭三・結核, 51: 497, 1976.
- 20) Ratnam, S. and Chandrasekhar, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 114: 549, 1976.