

原 著

マウス実験結核症による短期化学療法モデル実験

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所

受付 昭和 54 年 2 月 6 日

EXPERIMENTAL MODEL OF THE SHORT-COURSE CHEMOTHERAPY

Mareichi TOYOHARA*

(Received for publication February 6, 1979)

Model experiments of the short-course chemotherapy was carried out using experimental tuberculosis of the conventional mice.

The experimental schedule is shown in Fig. 1. As the anti-tuberculous drugs, streptomycin(SM) 1mg(40mg/kg), isoniazid(INH) 0.3mg(12mg/kg), rifampicin(RFP) 0.3mg(12mg/kg) and pyrazinamide(PZA) 2mg(80mg/kg) were employed daily. Experimental groups were divided into thirteen as shown in Fig. 1. Mice were treated for 8, 12 or 24 weeks from the fourth week after challenge with the virulent tubercle bacilli, Kurono strain.

Control groups were set for each treatment group at the beginning and end of chemotherapy and at the end of experiment.

The negative rate of tubercle bacilli *in vivo* during chemotherapy with the combination of SM, INH and RFP and the relapse were shown in Fig. 2. By chemotherapy for more than 8 weeks tubercle bacilli in lungs and spleens converted to negative completely. Bacteriological relapse was observed, however, in 60% of cases treated with 8 weeks' chemotherapy, and 40% in 12 weeks' chemotherapy and no relapse was found in 24 weeks' chemotherapy. The negative rate of tubercle bacilli *in vivo* during chemotherapy with the combination of SM, INH and PZA and the relapse were shown in Fig. 3. If treatment is terminated after 8 weeks, the relapse was seen in 80%. Even with 12 weeks' chemotherapy, the relapse was found in 100%. The negative rate of bacilli *in vivo* during chemotherapy with the combination of SM, INH, RFP and PZA and the relapse were presented in Fig. 4. In this case the negative rate after 8 weeks' chemotherapy was 80%, and no relapse was found after terminating chemotherapy. By 12 weeks' chemotherapy the negative rate became 100%, and no relapse was observed. Number of bacilli in bacteriologically relapsed cases was much smaller than the untreated control in each group as shown in the following tables.

Viable units in 10mg of lung and spleen, lung weight(mg), specific lung weight, spleen weight(mg) and degree of lung lesion at the beginning and end of treatment and during follow-up were shown in tables 1 to 7.

As shown in tables the number of bacilli in organs decreased remarkably and came down below its detection limit by chemotherapy, but regrowth of bacilli was proved in some of the treated groups after stopping chemotherapy. No regrowth was proved by 12 weeks' chemotherapy with the combination of SM, INH, RFP, PZA and 24 weeks' chemotherapy with SM·INH and RFP.

* From the Research Institute of Tuberculosis JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

1. 緒 言

十指に余る抗結核薬の発見により結核化学療法の治療方式は多様化していったが、リファンピシン (RFP) の登場により結核治療に対する考え方に大きな変化がみられるに至った。すなわち英国医学研究委員会が中心となつて行なつた臨床研究で SM, INH, RFP を中心とした1年以内の短期化療により結核治療の実をあげようとするものである^{1)~4)}。従来余りにも長期であつた結核治療に対し短期治療は社会的にも患者個人に対しても大きな福音であつた。かくして治療方式には多少の差異があるにしても今や短期化療は結核治療の主流となつた感がある。in vitro における SM, INH, RFP 殊に RFP のもつ強力な殺菌作用とともに in vivo でも RFP は persistent な結核菌に対しても有効である等の実験^{5)~9)} から短期化療の可能性が理論的にも裏付けされるようになった。

短期化療で最も問題になるのは化療終了後の再発すなわち菌の再増殖であろう。臨床的にはすでに多くの研究成果が報告されているが^{10)~14)}、これを裏付ける動物実験は多大の労力が必要ということもあり極めて少ないのが現状である^{5)15)~17)}。菌の毒力、化療期間、使用薬剤更に宿主の抵抗性等、化療の予後を左右する因子は多い。臨床的にはこのような条件をすべて一定にして観察することは不可能である。このような見地からマウス実験結核症を用い人の短期化療に相当するモデル実験を行ない興味ある知見を得た。また欧米と日本で評価の異なるピラジナマイド (PZA) についても検討を加えた。

2. 実験材料ならびに方法

- 1) 使用動物
dd 系♀マウス。使用開始時の平均体重 25 g
- 2) 感染菌と菌量
強毒結核菌黒野株の凍結乾燥菌 0.1 mg (6.5×10^5 生菌単位/mg) を尾静脈に接種した。
- 3) 使用薬剤
1 日量 SM 1 mg (40 mg/kg) 皮下注, INH 0.3 mg (12 mg/kg), RFP 0.3 mg (12 mg/kg), PZA 2 mg (80 mg/kg) 経口とし感染後 4 週より日曜日を除き毎日投与した。

4) 実験計画
図 1 に示す。すなわち全群を 13 群とし SM・INH・RFP 併用群は 8 週, 12 週, 24 週治療の 3 群, SM・INH・PZA 併用群では 8 週, 12 週治療の 2 群, SM・INH・RFP・PZA 併用群では 8 週, 12 週治療の 2 群とし治療開始および終了時点で無処置対照群をおく。8 週治療群は治療終了後 4 週放置, 12 週, 24 週治療群は終了後 6 週放置とする。

Gr. 1 より Gr. 7 までは各群 10 匹とし治療終了時点と放置後実験終了時点で 5 匹ずつ殺す。無処置対照群は 5 匹ずつとする。

3. 成 績

治療開始時すなわち感染 4 週後 (表 1), 8 週治療終了時 (表 2), 8 週治療後 4 週放置時 (表 3), 12 週治療終了時 (表 4), 12 週治療後 6 週放置時 (表 5), 24 週治療終了時 (表 6), 24 週治療後 6 週放置時 (表 7) の肺, 脾の生菌数, 肺重, $\sqrt{\text{比肺重}}^{18)}$, 脾重, 肺の肉眼的病変¹⁹⁾を各表に示す。

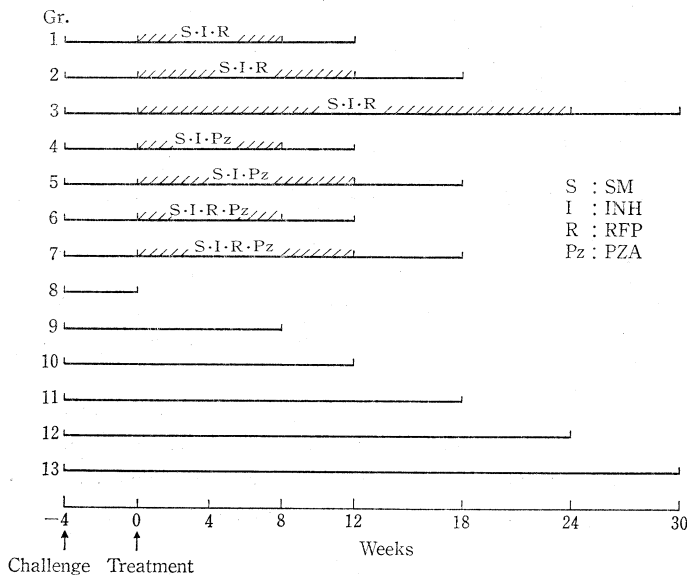


Fig. 1. Experimental schedule.

表1にみるように治療開始時、肺病変は1.8と比較的軽いが菌は既に増殖し実験結核症は成立していると考えてよい。

Table 1. Before Chemotherapy (4 weeks after infection)

	8 Control
*1 v.u./10 mg of lung	1.5×10^4
v.u./10 mg of spleen	1.5×10^3
Lung weight (mg)	304±40
*2 $\sqrt{\text{S.L.W.}}$	9.19±0.72
Spleen weight (mg)	284±117
*3 Lung lesion	1.8

*1 v.u.: Viable unit

*2 S.L.W.: Specific lung weight

*3 Ref.19

表2にみるように8週治療により Gr. 6 (SM·INH·RFP·PZA 併用群) の肺 10 mg に 0.1 の生菌数を認めただけは肺、脾内菌数は0すなわち検出限界以下となった。肺病変も無処置対照群は4と高度の病巣を形成したが治療群は軽減した。

8週治療後4週放置すると表3にみるように各治療群とも菌の再増殖をみた。

12週治療終了時は表4に示すように各治療群の肺、脾には菌は認められず肺の肉眼所見も極めて軽微であつた。

12週治療後6週放置すると表5にみるように SM·INH·RFP·PZA 併用群 (Gr. 7) では肺、脾ともに菌の再増殖はみないが SM·INH·RFP 併用群 (Gr. 2) では肺にわずかの菌の再増殖を認めた。SM·INH·PZA 併用群 (Gr. 5) では肺 10 mg 当り 415, 脾 10 mg 当り 4.9 と他の2治療群に比べ比較的多数の菌の再増殖をみたが無

Table 2. At the End of 8 Weeks' Chemotherapy (12 weeks after infection)

	9 Control	1 SM·INH·RFP	4 SM·INH·PZA	6 SM·INH·RFP·PZA
v.u./10 mg of lung	3.5×10^4	0	0	0.1
v.u./10 mg of spleen	3×10^2	0	0	0
Lung weight (mg)	475±99	273±45	223±29	248±45
$\sqrt{\text{S.L.W.}}$	11.77±1.64	8.54±0.56	8.48±0.65	8.52±0.67
Spleen weight (mg)	234±53	216±92	142±34	128±20
Lung lesion	4	1.2	1	0.6

Table 3. Follow-up for 4 Weeks without Treatment after 8 Weeks' Chemotherapy (16 weeks after infection)

	10 Control	1 SM·INH·RFP	4 SM·INH·PZA	6 SM·INH·RFP·PZA
v.u./10 mg of lung	3.4×10^4	75	43.5	54.8
v.u./10 mg of spleen	1.2×10^2	0.1	0.6	0
Lung weight (mg)	550±194	230±15	222±52	252±61
$\sqrt{\text{S.L.W.}}$	12.94±4.57	8.23±1.15	8.13±0.61	7.83±0.80
Spleen weight (mg)	228±124	126±20	154±52	156±53
Lung lesion	4.75	0.2	0.8	0.2

Table 4. At the End of 12 Weeks' Chemotherapy (16 weeks after infection)

	10 Control	2 SM·INH·RFP	5 SM·INH·PZA	7 SM·INH·RFP·PZA
v.u./10 mg of lung	3.4×10^4	0	0	0
v.u./10 mg of spleen	1.2×10^2	0	0	0
Lung weight (mg)	550±194	234±30	252±15	254±11
$\sqrt{\text{S.L.W.}}$	12.94±4.57	8.40±0.58	8.22±0.53	8.48±0.67
Spleen weight (mg)	228±124	143±36	168±94	154±25
Lung lesion	4.75	0.2	0.4	0.2

Table 5. Follow-up for 6 Weeks without Treatment after 12 Weeks' Chemotherapy (18 weeks after infection)

	11 Control	2 SM·INH·RFP	5 SM·INH·PZA	7 SM·INH·RFP·PZA
v.u./10 mg of lung	7.4×10^3	0.8	415	0
v.u./10 mg of spleen	80	0	4.9	0
Lung weight (mg)	452±153	268±29	524±71	218±23
√S.L.W.	11.30±1.35	8.37±0.64	13.32±1.01	7.82±0.50
Spleen weight (mg)	272±139	166±35	172±30	136±15
Lung lesion	4.2	0.4	1.2	0

Table 6. At the End of 24 Weeks' Chemotherapy (28 weeks after infection)

	12 Control	3 SM·INH·RFP
v.u./10 mg of lung	1.1×10^4	0
v.u./10 mg of spleen	43	0
Lung weight (mg)	794±183	246±38
√S.L.W.	16.01±3.03	8.25±0.60
Spleen weight (mg)	280±100	154±25
Lung lesion	4.4	0

Table 7. Follow-up for 6 Weeks without Treatment after 24 Weeks' Chemotherapy (30 weeks after infection)

	13 Control	3 SM·INH·RFP
v.u./10 mg of lung	1.0×10^4	0
v.u./10 mg of spleen	53	0
Lung weight (mg)	598±195	232±11
√S.L.W.	12.95±3.24	8.08±0.28
Spleen weight (mg)	258±168	122±61
Lung lesion	4.2	0

治療対照群に比べればはるかに少なかった。

24週治療は SM·INH·RFP 併用群のみについて行なったが表 6, 7 にみるように治療終了時も 6 週放置後も肺, 脾のいずれにも菌を認めず肉眼所見も 0 であった。

次に治療群別に治療期間による肺, 脾の菌陰性率と治療中止後の relapse を図で示す。各群 5 匹の肺, 脾のいずれにも菌が検出限界以下の場合を菌陰性率 100% とする。肺, 脾いずれかに少数でも菌が還元培養された場合そのマウスは菌陽性とする。例えば菌陰性率 40% とは 5 匹中 3 匹の肺, 脾のいずれかに菌の増殖を認めたが 2 匹には認めなかったことを示す。

図 2 に SM·INH·RFP, 図 3 に SM·INH·PZA, 図 4 に SM·INH·RFP·PZA による体内菌陰性率と relapse を示す。

図 2 にみるように SM·INH·RFP の治療期間が長く

なるにつれ relapse が減るが, 8 週治療では 60%, 12 週治療ではまだ 40% の relapse を認めた。24 週治療により relapse を認めなかった。

図 3 にみるように SM·INH·PZA 併用の場合は 8 週および 12 週治療で菌陰性率は 100% となったが放置により前者では 80%, 後者では 100% 菌の再増殖をみた。

SM·INH·RFP·PZA の 4 者併用の場合は図 4 にみるように 8 週治療では陰転率 80% であったが, これは 5 匹中 1 匹の肺に 1 コロニーを証明したためである。4 週放置しても菌陰性率の低下はなかった。12 週治療により 100% 菌は陰転し 6 週放置しても relapse を認めなかった。

なお治療後再増殖した菌はいずれも使用薬剤に対し感性であった。

4. 考 察

緒言で述べたように結核治療の短期化は今や世界の潮流といつてよく数多くの臨床成績が報告されている。しかし従来, 長期間であった結核治療を短期化するためにはそれを支持する基礎的のデータが必要であろう。

なぜ, またいかにしたら短期化が可能であるか。いかなる因子が治療終了後の relapse に関与するか等の問題は短期化療の治療方式や期間を決めるうえで基礎的に充分掘り下げるべきであろう。

理論的には Mφ 内外の結核菌に対し殺菌的な薬剤をより多く使用し生体内の菌をできるだけ早く殺菌し更に慢性結核症の体内にしばしば persistent の形でみられる結核菌 (persister) に対し滅菌的に働く薬剤を用いるということであろう。まず *in vitro* の成績から殺菌性の強い薬剤としては RFP, INH, SM があげられる²⁰⁾。また結核菌は Mφ 内に貪食されその中で増殖することはよく知られているので細胞内浸透性からみると INH は優れており SM は細胞内菌に対してはその効果が減弱する²¹⁾²²⁾。RFP の細胞内浸透性は INH ほどではないが²³⁾ 細胞内菌に対する殺菌性は高いと思われる²⁴⁾。PZA は細胞外菌に対してはその効果は極めて弱いが生体内で細胞内菌に対しては殺菌性に働くことが知られている⁵⁾⁶⁾⁹⁾²⁴⁾。EB の抗菌性は静菌的⁹⁾ であるので結核感染宿主に治療を行

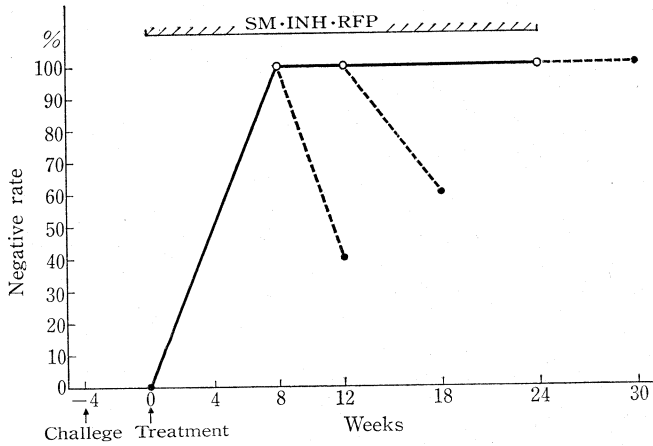


Fig. 2. Negative rate of bacilli *in vivo* and relapse.

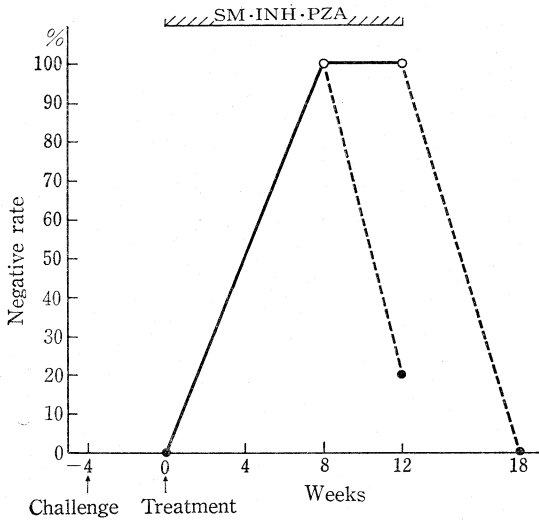


Fig. 3. Negative rate of bacilli *in vivo* and relapse.

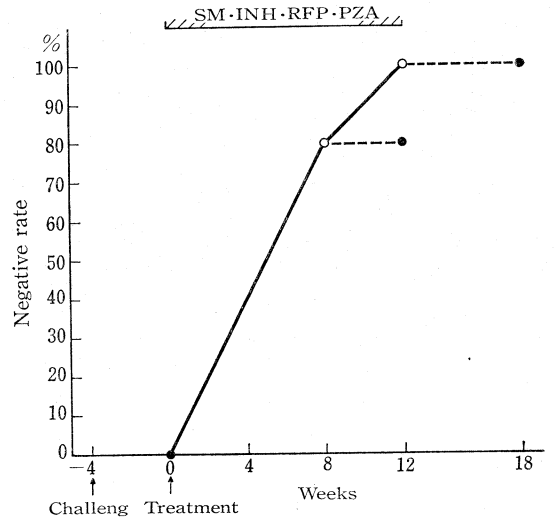


Fig. 4. Negative rate of bacilli *in vivo* and relapse.

ない、その短期化をはかるには INH・RFP を柱とし SM をこれに配するということになる。SM は細胞内菌に対しては殺菌作用が落ちるのでマウス実験結核症のようにほとんどの菌が Mφ 内に食菌されている状態では効果が著しく減弱するが人の結核症の特徴である空洞内菌は細胞外にあるので人の結核症には有力と考えられる。PZA は理論的には生体内で細胞内菌に対し殺菌的に働くといわれるがその実験ないし追試は容易でなく、その有効性を強調することは理論に流されすぎのきらいがある。動物実験では PZA と他の抗結核薬との併用により有効であるとの報告²⁴⁾ もあり本実験でも SM・INH・RFP に PZA を加えると12週治療により relapse を認めないなど、ある程度の有用性を認めたが PZA を INH, RFP や SM と同列に評価するには更に多くの基礎的実験が必要ではあるまいか。

次に治療終了時には強力な抗結核薬の併用により臓器

の培養で菌が陰性化しても結核菌が分裂に長時間を要する状態で生存していたり分裂静止の状態にあるとき、すなわち *persisters* であるとき、これが治療終了後の relapse の原因になる可能性が大きい。*persisters* に対しては従来ほとんどの抗結核薬が有効でなかつたが RFP は *persisters* に対しても強力に働き生体内で滅菌的に作用することが知られている⁷⁻⁹⁾。

このような見地からすれば relapse を阻止し短期治療を成功させるには RFP が中心となり INH, SM がその両翼となり PZA, EB を含めた他の抗結核薬を適宜、併用するということになる。

今回の実験では以上の考え方を裏付けるためマウス実験結核症に対し RFP, INH, SM および PZA の併用を8週より最長24週まで行ない生体内の菌の消長を中心として治療の効果と治療終了後の relapse を観察した。治療方式としては SM・INH・RFP 8週, 12週, 24週, SM・

INH・PZA 8週, 12週, SM・INH・RFP・PZA 8週, 12週とし治療終了時に各群5匹ずつ剖検し肺, 脾の培養を行なうとともに肉眼病変その他の観察を行なつた。更に治療終了後4ないし6週放置したあとの菌の再増殖をみた。その結果, SM・INH・RFP・PZA 併用群では12週治療により100%菌は陰転し, かつ relapse を認めなかつたので最強の方式といえよう。SM・INH・RFP の場合は12週治療ではまだわずかながら relapse がみられ24週治療により relapse をみなかつたので12週治療では不十分ではあるが菌の再増殖の程度からみると12週以後は INH・RFP 12週治療でも3者併用と同じ効果が得られる可能性がある。SM・INH・PZA 併用の場合は8週, 12週治療により菌は陰性化したのが6週放置により100%再増殖し再増殖菌数も SM・INH・RFP 群よりも多かつた。以上のことから SM・INH・RFP に PZA を併用すると効果は更に強力となるが RFP を除くと relapse が高くなることが分かつた。

5. 結 語

マウス実験結核症による短期治療のモデル実験を行ない次の結果を得た。

(1) 強毒結核菌感染4週後から治療を開始したとき, SM・INH・RFP, SM・INH・PZA, SM・INH・RFP・PZA のいずれの治療方式によつても12週治療により肺, 脾の菌は陰性化した。

(2) 治療終了後6週放置により SM・INH・RFP・PZA を除き relapse をみた。しかし, その菌数は無治療対照群に比べるとはるかに少なかつた。

(3) SM・INH・RFP 群は24週治療により菌は陰性化し relapse も認めなかつた。

(4) 治療終了後再増殖した菌はいずれも使用薬剤に対し感性であつた。

謝 辞

本実験遂行にあたり高橋テル技師の労に負うところが

多かつた。記して謝意を表する。

なお本論文の要旨は第53回結核病学会総会シンポジウムにおいて発表した。

文 献

- 1) East African/Brit. Med. Res. Councils: Lancet, i: 1079, 1972.
- 2) East African/Brit. Med. Res. Councils: Lancet, i: 1331, 1973.
- 3) East African/Brit. Med. Res. Councils: Lancet, ii: 237, 1974.
- 4) East African/Brit. Med. Res. Council Study: Amer. Rev. Resp. Dis., 116:3, 1977.
- 5) Dickinson, J.M. and Mitchison, D.A.: Bulletin of the IUAT (Proceedings of the Conference) 51, Tome 1: 79, 1976.
- 6) Fox, W. and Mitchison, D.A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 111: 325, 1975.
- 7) 近藤瑩子・金井興美: 結核, 52:411, 1977.
- 8) 近藤瑩子・金井興美: 結核, 53:261, 1978.
- 9) Fox, W.: 結核, 53:503, 1978.
- 10) 山本和男他: 結核, 52:39, 1977.
- 11) 山本和男他: 結核, 52:168, 1977.
- 12) 相沢春海: 結核, 53:593, 1978.
- 13) 木野智慧光: 結核, 53:595, 1978.
- 14) 浦上榮一: 結核, 53:596, 1978.
- 15) 近藤瑩子・金井興美: 結核, 53:295, 1978.
- 16) Dickinson, J.M. and Mitchison, D.A.: Tubercle, 57:251, 1976.
- 17) Grosset, J.: Bulletin of the IUAT, 53:5, 1978.
- 18) 結核菌の臨床細菌学: 結核予防会, p. 234, 1970.
- 19) 結核菌の臨床細菌学: 結核予防会, p. 233, 1970.
- 20) Mitchison, D.A.: Bulletin of the IUAT, 43:322, 1970.
- 21) 吉武洋海: 総合医学, 13:287, 1956.
- 22) 岩井和郎: 結核, 34:233, 1959.
- 23) Pavlov, E.P., Tushov, E.G. and Kotlyarov, L.M.: Probl. tub., 12:64, 1974 (結核・呼吸器抄録 Vol. 27 -1804より).
- 24) Grosset, J.: Rifampicin; Excerpta Medica, p.1, 1977.