Kekkaku Vol. 56, No. 1

原　著

# 肺結核の短期化学療法

## 第2報　実験結核症による短期療法モデル実験の成績

小　田　敏　郎

長崎大学医学部第2内科(指導：原　耕平教授)

受付　昭和55年9月4日

# SHORT-COURSE CHEMOTHERAPY FOR PULMONARY TUBERCULOSIS

## 2. Evaluation of Short-course Chemotherapy in Experimental Murine Tuberculosis

Toshiro ODA*

(Received for publication September 4, 1980)

In order to confirm the favorable clinical results achieved in short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis with rifampicin (RFP), ethambutol (EB) and isoniazid (INH) for 9 months, as reported in the first paper, experimental short-course chemotherapies of murine tuberculosis were carried out using RFP, EB, INH and streptomycin (SM) in either single or combined administration. The survival rate of mice was observed in one experiment, and the viable number of tubercle bacilli in the lung was counted after their inoculation with tubercle bacilli.

0.5 mg ($4.5\sim4.9\times10^6$ CFU/m*l*) of Kurono strain cultured on a 1% Ogawa egg medium for three weeks was inoculated through a tail vein to male mice of dd strain, weighing approximately 20 g.

The mice were divided into 8 groups after inoculation with tubercle bacilli; a control group (no treatment), groups treated singly either with SM, INH, RFP or EB, and groups with RFP and INH, RFP, INH and EB, RFP, INH and SM in combination. Each group consisted of 10 to 20 mice.

In the first experiment animals were kept without chemotherapy for 4 days, then started on the 10-day chemotherapy according to the specific regimens. 0.4 mg of SM, 0.1 mg of INH and 0.4 mg of EB were injected intraperitoneally, and 0.1 mg of RFP was administered to the mice orally for 10 days. The regimen of RFP plus INH was more effective than regimens of RFP or INH alone in the experiment, according to the survival rate of the animals. However the addition of SM or EB to the regimen of RFP plus INH did not increase it's effectiveness in chemotherapy for murine tuberculosis.

In the second experiment, animals were treated with 1 mg of SM by intraperitoneal injection, and 0.4 mg of INH, 0.4 mg of RFP and 0.8 mg of EB by oral administration.

The viable counts of tubercle bacilli in the lung tissue of mice were reduced in a shorter time in animal groups treated with regimens of RFP and INH, RFP, INH and SM, RFP, INH and EB than in the groups treated with single drug regimens.

* From the Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine (Director: Prof. Kohei HARA), 7-1, Sakamoto-machi, Nagasaki-city, Nagasaki 852 Japan.

The viable number of bacilli in the lungs became negative in all animals 3 months after treatment with combined drugs.

These groups were then divided into two, one in which the regimen was discontinued and another in which the same regimen was administered for additional 3 months (totalling 6 months).

In the former animal group, regrowth of tubercle bacilli in the lungs was seen, and in the latter, negative finding continued.

These results will be useful in conducting clinical short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis.

## I. 緒　　言

すでに第1報[1]において述べたごとく，初回肺結核治療例に，RFP·INH·EB の組み合わせで9カ月治療を行なつたところ，4カ月目には100%の菌陰性化が得られ，従来の組み合わせによるものより優れた成績が得られた。このような臨床例における短期療法の効果は，諸外国ではもちろん我が国においても容認されたかの感があるが，いずれにしろこのような組み合わせでは，その抗結核作用と副作用の両面より考えても RFP と INH が基本となることは，現在までの多くの成績からみても疑いのないところである。

今回著者は，臨床例での成績を裏付けるべく，RFP と INH の組み合わせによる治療での有効性を中心に，他の抗結核剤をも組み合わせて，マウス実験結核症による短期療法でのモデル実験を行なつてみた。

## II. 実験方法

実験結核症に対する効果の判定には種々の方法が用いられている。著者はマウスの実験結核症に対して，RFP と INH を基盤とする幾つかの組み合わせで治療を行なつたが，その効果は生存日数で観察する方法と，経時的に臓器内生菌数でみる方法とで判定した。

実験動物および接種菌：体重 20 g 前後の dd 系雄マウスを用い，接種菌は黒野株の1%小川培地培養3週目の菌で，5 mg/ml の菌液を作成し，その 0.1 ml（生存日数観察での実験では $4.5\times10^6$/ml，臓器内生菌数における実験では $4.9\times10^6$/ml 生菌単位）を尾静脈内に接種した。

治療薬剤の組み合わせ：無治療群を対照とし，これに SM 単独，INH 単独，RFP 単独，EB 単独，および RFP·INH 併用，RFP·INH·EB 併用，RFP·INH·SM 併用の8群に分け，各群 10～20 匹ずつを用いて行なつた。

投与量および投与期間：生存日数の観察では，それぞれ1匹当り SM 0.4 mg，INH 0.1 mg，RFP 0.1 mg，EB 0.4 mg を，感染4日目より10日間毎日投与し，その後これを放置した。SM, EB, INH は腹腔内に投与し，RFP はエチルアルコール溶解後蒸留水で希釈し，ビニールチューブを用いて経口的に投与した。

これに対し，臓器内菌数の観察では感染後4日間これを放置した後，1匹当り SM は 1 mg を腹腔内に，その他 INH 0.4 mg，RFP 0.4 mg，EB 0.8 mg を経口的に投与した。INH, RFP, EB の各剤は毎日，SM は初めの1カ月は毎日，以後は週2回の投与とした。

菌数の計算：一定日数経過後，これを屠殺し，無菌的に肺を取り出し，正確に秤量した後10倍量の1%苛性ソーダを加えてホモゲナイズし，10倍希釈法にて作成した資料の 0.1% を1%小川培地に接種し，3週間培養した後菌数を計算した。

## III. 実験成績

a）生存日数による治療効果の比較

その成績を図1に示した。無治療群は感染後4週間前後ですべてが死亡した。単独投与では，INH, EB, RFP, SM の順に良好な効果が認められた。RFP 投与群の治療成績がよくなかつた理由としては，RFP の投与量が少なかつたことと経口投与によるためかと思われた。RFP と INH を併用すると，RFP 単独または INH 単独の場合よりかなり良好な成績が得られたが，これに SM または EB を加えても，生存曲線のうえでは RFP·INH 治療群と大差を認めなかつた。

b）肺内菌数よりみた治療効果の比較

各治療群の経時的肺内生菌数の平均値（3匹平均）をプロットし，これを結んだのが図2である。感染後4日間放置した後，治療開始時の菌数は平均 $1.4\times10^5$ を示した。無治療群では3週目に平均 $7.4\times10^6$ の菌数を示して，その後短時日の間に残りはすべて死亡した。SM 単独治療群では1カ月目に $5.7\times10^5$，2カ月目に $5.3\times10^5$ を示し，EB 単独治療群では1カ月目に $5.1\times10^6$，2カ月目に $2.4\times10^6$ を示して，その後残りのマウスはすべて死亡した。これら死亡マウスはいずれも解剖にて結核の肺内散布が強いことを確かめた。INH 単独治療群では，1カ月目 $7.7\times10^3$，2カ月目 $5.7\times10^3$，3カ月

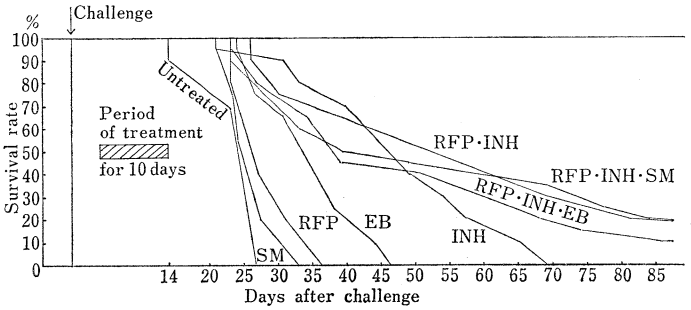


Fig. 1. Therapeutic effect of SM, EB, RFP, and INH used singly or combined for experimental tuberculosis of mice.

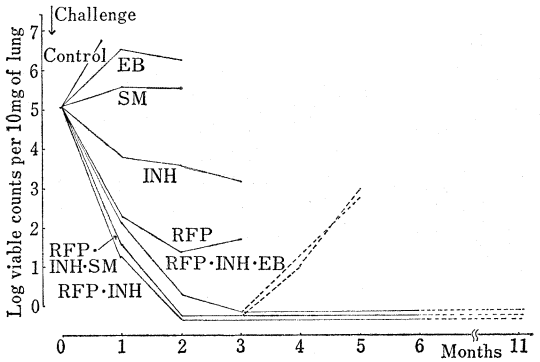


Fig. 2. Viable counts in lungs after treatment of different regimens.

目 $1.8\times10^3$ を示し，RFP 単独治療群では1カ月目 $2.6\times10^2$，2カ月目 $4.0\times10^1$，3カ月目 $7.0\times10^1$ を示して，SM や EB 単独投与に比してかなりの菌数の減少が認められた——これは投与量にも関連があるが——。

これらの投与量で組み合わされた INH·RFP と，INH·RFP·SM および INH·RFP·EB 併用群では，図2に示したごとく，単独投与に比べていずれも短時日の間に菌数が減少して，治療開始後1カ月目には $10^1$～$10^2$ 代に，2カ月目には2コないしは0となつて，ほとんど菌が認められず，3カ月目にはこれらのすべてが陰性化した。そこで，3剤を併用した群については，生存したマウスを2群に分けた。1群は3カ月で治療を中止して更に菌数を追つたところ，1カ月後には $10^1$ 代，2カ月後には $10^2$ 代と菌は再び増殖を示した。これに対し，6カ月目まで治療を継続した群では，その後長期にわたり，肺内菌数は $2\times10^{-1}$ 以下にとどまつた。

## IV. 考　　案

RFP が強力な殺菌性を有することは，すでに試験管内や動物実験でも確かめられている。豊原らは，RFP と結核菌を *in vitro* で接触させた場合 INH より再増殖が著明に遅れることや[2]，マウスの実験結核症において RFP の効果の持続は INH よりかなり長いことを証明したが[3]，近藤らはマウスの実験結核症において，RFP は INH や EB とは異なつて[4)5)]，菌が増殖を停止した時期にも効果を示したと述べている[6)7)]。

一方近年臨床的に結核に対する短期化学療法が問題になるにつれて，そのモデルとしての RFP や INH を中心とした組み合わせによる実験が，実験結核症や試験管内で行なわれるようになつてきた。

実験結核症に対する抗結核剤の組み合わせに RFP を導入した場合，これを含まない組み合わせに比べて著明にその治療効果が増強されることはすでに多くの実験において確かめられているが，その投与量や投与法に幾つかの意見が分かれている[8)~10)]。短期化学療法をモデルとした場合の抗結核剤の組み合わせは，その臨床的な使用薬剤とも絡み合わせて，INH, RFP, SM, EB が中心となるが，その細胞内の分裂静止菌に対する殺菌作用をも考慮して，主として外国では PZA もそのレジメンに加えられることがある。臨床的にも2剤よりは3剤の組み合わせがより強力なものであろうことが確かめられて一般に用いられているが[11)]，実験結核症におけるモデルにおいてもこの2剤と3剤による成績の比較が行なわれている。

著者の第1の実験における成績では，INH と RFP を併用したものでは，INH または RFP 単独の場合よりかなり優れた成績を得ることができたが，これに SM や EB を加えても，INH·RFP 併用を凌駕するほどには至らなかつた。同様の成績は Dickinson ら[12)]によつても得られ，EB 自体では INH または INH·RFP の効果に更に加えるべき作用を認めなかつたとしている。しかし Grumbach ら[13)]は，RFP·INH に SM を加えた場合，これに勝るという治療効果は得られなかつたものの，その再発抑制において優れていたと述べ，短期強化の治療薬に INH と RFP のほかに SM を加えることの意義を強調している。

多くの実験系の中には，必ずしも INH や RFP のみ

が強い抗菌力を有するとの成績も得られていないが[14]，著者が行なつた第2の実験で証明されたごとく，INH・RFP・SM または INH・RFP・EB の併用は極めて優れた効果が得られて，近藤ら[15][16]の実験において示された成績と同様，そのまま臨床的な成績を反映しないまでも，極めて有望な組み合わせと考えられた。

上記のような組み合わせによる治療においても，その投与の中止時期とその後の再発の問題は臨床的な主題ともなつていて，未解決の問題と言わざるをえない。このような治療は最初に強力に行なえば，その後は間欠法に切り替えても毎日投与法と余り効果は変わらなかつたとするものもあつて[13]，その初期における治療の組み合わせが，この短期療法の一条件に加えられるべきこととなろう[16]。更に近藤ら[17]は，この短期療法のモデルとして，再発例を少なくするための組織内残存菌数を最少限にとどめることを目安として，INH・RFP・SM 28日間投与後 INH・RFP・EB の24日間投与を持続，更に INH・RFP・EB 週2日の14日間投与後に，INH 持続投与群と無治療群に分けて実験を行なつている。いわば臨床的に投与される組み合わせのモデルと考えられるが，投与中止後に菌の再増殖を認めたことから，少なくともこのレジメンではその根絶に成功しなかつたとしている。豊原[18]も SM と INH を基盤に，これに RFP や PZA または RFP・PZA を加えた形で実験を行ない，8週治療を行なつた後の6週後には SM・INH・RFP・PZA 併用群を除き再発を認めたのに，24週治療では再発を認めなかつたとしている。

著者の成績においても，INH・RFP・EB の組み合わせで，治療3ヵ月後に中止した群では菌の再増殖を認めたのに，6ヵ月では全く肺内菌数が陰性にとどまつたことは，当然のことながら，その治療期間の重要性を示唆したものと言えよう。臨床的にこの成績がそのまま反映されないまでも，短期化学療法の“短期”の時期をいつに区切るべきかは，今後の大きな課題になるものと思われる。

## V. 結　　語

臨床的な短期化学療法に多く使用される SM, INH, EB, RFP の4剤を組み合わせて，マウスの実験結核症に対する治療実験を行ない，次の成績を得た。

1. 生存日数による治療実験では，RFP と INH を併用すると，RFP 単独または INH 単独の場合よりかなり良好な成績が得られた。しかし，SM または BE をこれに加えても，RFP・INH 併用治療群の効果と大差を認めなかつた。

2. 肺内菌数でみた治療実験では，INH・RFP，INH・RFP・SM および INH・RFP・EB 併用群ともに，単独投与群に比べて短時日のうちに菌数が減少し，3ヵ月目にはこれらすべてが陰性化した。INH・RFP・SM および INH・RFP・EB 併用群では，3ヵ月目に中止したものと更に3ヵ月の治療を追加したものとに分けて，肺内菌数を調べたところ，前者では菌の再増殖が認められたのに，後者では菌は陰性化したままであつた。

以上の成績は，臨床的な短期化学療法を行なつてゆく際に，参考となる所見と思われた。

稿を終わるに当たり，終始ご指導頂いた原耕平教授に深謝すると共に，ご鞭撻頂いた佐賀大学助教授中富昌夫博士に感謝の意を捧げる。

## 文　　献

1) 小田敏郎：肺結核の短期化学療法．第1報．未治療肺結核患者に対する RFP・INH・EB 9ヵ月治療の成績，結核，55：331，1980.
2) 豊原希一：Rifampicin の抗結核作用に関する基礎的研究，結核，46：211，1971.
3) 豊原希一他：マウス実験結核症に対するRifampicinの抗結核作用に関する研究，結核，46：19，1971.
4) 金井興美他：再発と化学療法，その実験結核モデル，結核，45：159，1970.
5) 金井興美他：実験モデルよりみた結核化学療法の限界，結核，44：379，1969.
6) 近藤瑩子他：感染菌の増殖度と結核化学療法効果．1. ストレプトマイシン依存株を用いたマウス実験モデル，結核，52：411，1977.
7) 近藤瑩子他：マウス実験結核症におけるリファンピシンとイソニアジッドの治療効果の比較，結核，53：261，1978.
8) Batten, J.: Rifampicin in the treatment of experimental tuberculosis in mice: Sterilization of tubercle bacilli in the tissues, Tubercle, 51：95, 1970.
9) Grumbach, F.: Traitement de la tuberculose de la souris par l'association isoniazide-rifampicine, Rev. fr. Mal. Resp., 3：1027, 1975.
10) 近藤瑩子他：抗結核剤投与効果に関する実験的研究．1. 単独あるいは併用による間欠投与，結核，52：339，1977.
11) 日本結核病学会治療専門委員会：肺結核化学療法の期間に関する見解，結核，55：189，1980.
12) Dickinson, J. M. et al.: Bactericidal activity *in vitro* and in the guinea-pig of isoniazid, rifampicin and ethambutol, Tubercle, 57：251, 1976.
13) Grumbach, F. et al.: Rifampicin in daily and intermittent treatment of experimental murine tuberculosis, with emphasis on late result, Tubercle, 50：280, 1969.
14) Dickinson, J. M. et al.: Bactericidal activity of streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide alone and in conbination against mycobacterium tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 116：627, 1977.
15) 近藤瑩子：1. 短期強化化学療法に関する実験的検討，結核，53：590，1978.

16) 近藤莹子他：実験的観察よりみた短期化学療法，治療学，2：721，1979.
17) 近藤莹子他：短期強化化学療法の検討を目的とするマウス結核症の治療実験(1)，結核，53：295，1978.
18) 豊原希一：マウス実験結核症による短期化学療法のモデル実験，結核，54：369，1979.