

ラッテ肺結核病巣における菌の薬剤耐性獲得に関する研究

京都大学結核研究所第2部 (主任 教授 辻 周介)

新三菱京都病院 (院長 梅田 晋 博士)

小 松 幹 雄

(昭和34年6月25日受付)

第1章 緒 言

結核症に対する化学療法剤は、最近10数年間に実に目覚ましい発達を遂げたのであるが、一方これら薬剤の効果はこれを無力化しあるいは弱力化するところの菌の耐性獲得なる現象に常に脅かされている状態である。この種の抗結核剤の中でも特にその効果の優れている SM 及び INH に対して、臨床的にもまた試験管内実験でもかなり早期に菌がその耐性を獲得することは皮肉である。この数年来耐性獲得の機序を解明しようとする研究と同時に、いかにして耐性発現を阻止し得るかという検討に努力が費やされて来たのであるが、それらの問題はなお解決せられたとはいえない。

この研究の隘路の一つとして、かねてより多数の報告に見られる如く、実験的結核症においては菌の薬剤耐性を発現させ難いために、in vivo の実験的研究が進展しなかつたことがあげられる。二、三の研究者¹⁾²⁾³⁾⁴⁾は実験的結核症において、SM あるいは INH の耐性発現をかなり高率に認めたと報じているけれども、未だ動物体内において確実に耐性菌を作り得る方式は得られていない。動物体内での耐性菌出現の困難さについては、菌の毒力、動物の感受性等にその原因を求めようとする種々の推論が行われているが、一般論として菌の増殖の旺盛な病巣に適当な濃度の薬剤が働くことにより、比較的容易に菌の耐性発現が認められることが常識とされている。この意味よりすればラッテは結核菌に対する抵抗性が強く、その体内では菌は殆んど發育し得ないものと知られている動物であつて、感染ラッテに薬剤を投与してもその体内で菌が耐性を獲得することは困難であろう

と推測される。しかるに最近同僚の由本⁵⁾によつて行われた実験により、流パラ・ラノリンに包埋した結核死菌をラッテ肺に注入することにより、巨大な壊死性病巣を作ることが明らかとなり、ラッテ肺においても著明な結核性病巣を確実に作り得るに到つたのである。著者はこの手技を採用し、生菌を用いて肺病巣を形成して、これに薬剤を投与することによつて、ラッテにおいても耐性菌を出現させることが出来るものではないかと考えて、以下の実験を行つた。

第2章 実験材料及び方法

体重 200 g 前後のラッテ31匹を使用した。結核菌の接種は、ソートン培地に2週間培養した H37Rv 菌の2mgを流パラ・ラノリン混和液0.2ccに浮遊させ、これをビニール細管を通じて経気道的に肺に可及的深く注入感染させた。感染5日後より次の8群にわけて治療を開始した。

Ⅰ群：SM 4mg 週6日，1カ月間，(5匹)

Ⅱ群：INH 0.2mg 週6日，1カ月間，(5匹)

Ⅲ群：SM 4mg+INH 0.2mg 週6日，1カ月間，(4匹)

Ⅳ群：SM 4mg 週6日，2カ月間，(4匹)

Ⅴ群：INH 0.2mg 週6日，2カ月間，(4匹)

Ⅵ群：SM 4mg+INH 0.2mg 週6日，2カ月間，(4匹)

Ⅶ群：SM 4mg 週3日連続投与し4日間休薬，2カ月間，(3匹)

Ⅷ群：SM 4mg 週3日+Prednisolone 0.05 mg 週3日，2カ月間，(2匹)

表

治療方式	動物番号	肺眼の変肉化	主な顕微鏡所見	臓器稀釈倍数の数	対照培地	SM 含有培地 per cc			INH含有培地per cc		
						1γ	10γ	100γ	0.1γ	1γ	10γ
I群 SM 4mg 週6日, 1ヶ月	1	卅	増殖性肺胞炎	× 100	+	61	0	0			
	2	卅	増殖性肺胞炎	× 100	+	+	0	0			
	3			× 10000	+	0	0	0			
	4	卅	繁殖性肺胞炎	× 1000	卅	0	0	0			
	5	+	胞隔炎	× 100	卅	卅	0	0			
II群 INH 0.2mg 週6日, 1ヶ月	6	+	剥離性肺炎	× 1000	卅				0	0	0
	7	卅	繁殖性肺胞炎	× 10000	23				4	0	0
	8	卅	壊死性気管支炎	× 1000	卅				0	0	0
	9	÷	繁殖性肺胞炎	× 100	5				0	0	0
	10	—	胞隔炎	× 1000	卅				0	0	0
III群 SM 4mg+INH 0.2mg 週6日, 1ヶ月	11	+	繁殖性肺胞炎	× 1000	卅	0	0	0	0	0	0
	12	+	繁殖性及び増殖性肺胞炎	× 100	卅	0	0	0	0	0	0
	13	+	繁殖性肺胞炎	× 100	15	0	0	0	0	0	0
	14	卅	繁殖性肺胞炎	× 1000	17	0	0	0	0	0	0
IV群 SM 4mg 週6日, 2ヶ月	15	÷	胞隔炎	× 100	0	0	0	0			
	16	卅	被包乾酪巣	× 100	+	0	0	0			
	17	卅	類上皮細胞結節	× 100	+	1	0	0			
	18			× 100	+	0	0	0			
V群 INH 0.2mg 週6日, 2ヶ月	19	+	繁殖性肺胞炎	× 100	+				0	0	0
	20	+	類上皮細胞巣	× 100	13				0	0	0
	21	+	剥離性肺炎	× 100	+				0	0	0
	22	÷	剥離性肺炎	× 100	0				0	0	0
IV群 SM 4mg+INH 0.2mg 週6日, 2ヶ月	23	卅	気管支性肺炎及び線維性増殖巣	× 100	5	0	0	0	0	0	0
	24	卅	類上皮細胞巣	× 100	5	0	0	0	0	0	0
	25	卅	気管支炎型空洞	× 100	13	0	0	0	0	0	0
	26	+	類上皮細胞巣	× 100	+	0	0	0	0	0	0
VII群 SM 4mg 週3回, 2ヶ月	27	卅	類上皮細胞結節	× 1000	+	+	0	0			
	28	卅	類上皮細胞結節	× 100	60	1	0	0			
	29	卅	類上皮細胞結節	× 100	+	11	0	0			
VIII群 SM 4mg週3日+ Pred. 0.05mg 週3日, 2ヶ月	30	+	増殖性肺胞炎	× 100	卅	卅	0	0			
	31	卅	繁殖性肺胞炎及び気管支炎	× 1000	46	42	0	0			

以上の8群共、すべて薬剤は背部皮下注射によつて投与した。I～III群は治療1カ月後に、IV～VII群は治療2カ月後にそれぞれ投薬を中止し、3日間放置後屠殺、肺病巣の病理組織学的検査と併せて、存在する菌の耐性を検索した。耐性測定法は次のように直接法によつて行なつた。即ち、各動物の肺のhomogenateの100倍、1,000倍及び10,000倍の稀釈液0.1ccを、SM, INH含有1%小川培地に注入し、4週間培養後生じた集落を算出して耐性度を判定した。培地中の各薬剤有効濃度は、SMについてはper ccそれぞれ1γ, 10γ, 100γであり、INHについては、0.1γ, 1γ, 10γである。

菌接種後早期に薬剤の投与を開始したためか、各動物の肺病変の程度には種々の差が認められ、由本⁵⁾の報じたような画一的な巨大壊死巣を形成するには到らなかつた。形成された病変は表に併記したが、検査部位の相違に基づく差もあつて、病変の度と、対照培地に発育した菌集落数とは必ずしも平行しなかつた。表の菌培養成績は各肺homogenateの稀釈段階の中、集落数算出に相当と考えられる部分を抽出し、発生したコロニー数を表に記載したが、集落数100個以上のものは次の3段階にわたつて記号によつて表わした。

卅：培地全面に融合した集落を認めるもの
 卅：きわめて多数の集落発生があるが、融合を認めないもの

十：集落数100個以上で廿に達しないもの

成績は表に示す通り、Ⅰ群では5例中3例にSM 1 γ の耐性を認め、中1例は完全耐性であった。Ⅱ群は5例中1例にINH 0.1 γ 、Ⅳ群は4例中1例にSM 1 γ のそれぞれ不完全耐性を認め得た。Ⅶ群及びⅧ群は計5例共SM 1 γ の耐性を認め、中3例は完全耐性を示した。Ⅲ群、Ⅴ群及びⅥ群は計12例共すべて感受性であった。即ちSM単独治療群の方がINH単独治療群よりも耐性発現の率が多く、さらにSM間歇投与群及びSM, Prednisolone併用群では全例にSM耐性の獲得を見たことは注目されてよい。SM, INHの併用群では1例も耐性発現を認めることが出来なかつた。

1カ月治療群と2カ月治療群との間では、却つて前者の方に耐性出現率が高い傾向が見られた。

しかしながら総じて耐性獲得の程度は、SMについては1 γ 迄、INHについては0.1 γ 迄であつて、高度の耐性を生じさせることが出来なかつた。

第4章 総括並びに考按

実験的結核症に対する抗結核剤の治療実験は、古くから枚挙にいとまがない位行われて来た。その際細菌学的検索の一つとして同時に検査された菌の薬剤耐性の測定では、その殆んど報告が耐性獲得を認め難かつたという結論を示している⁶⁾⁷⁾⁸⁾。

臨床的にもまた試験管内実験においても、化学療法剤は結核菌にかなり早期に高度の耐性を獲得させる事実があるのに反して、実験動物の体内においては、かくの如く耐性出現が困難であることに対しては、種々の議論が行われて来た。ことにINH耐性菌はモルモットに対する毒力が減弱していることが判明して以来、沢田等⁹⁾もモルモット体内における耐性菌の低い増殖能がINH耐性を生じさせ難い原因であると報じている。また牛場等¹⁰⁾の報告によれば、耐性菌の出現には一定数の菌の増殖が必要で、この菌の増殖力が動物種類によつて変化すること、即ち動物の結核感受性如何がin vivoにお

ける菌の薬剤耐性獲得に重大な関係を有するものと述べている。さらに牛場等¹⁾は黒野株を用いた実験で、マウスでは2～4週間の比較的短期間に30匹中20匹にSM 5 γ 以上の耐性を獲得させることが出来たが、モルモットにおいてはSMに対してもINHに対しても、耐性の出現を認め難かつたといつている。同様に手塚²⁾は、マウスに黒野株0.1mgを接種し、SM 1000 γ によつて4カ月間治療した後の動物の肺より、15例中7例にSM耐性を認め、岩下³⁾も同様黒野株をマウスに接種して、INH及びIHMSで治療した結果、かなり早期に高率の耐性出現を認めたと報じている。また安田¹¹⁾は1カ月毎にマウスの体内を継代しながら治療して、INHは2代目、SMは4代目に耐性出現を見たを報告している。

以上の如くマウスに関しては耐性獲得に成功した2～3の報告が見られるけれども、これらも未だ定式化されるには至つておらず、更に他種の動物における耐性出現の方法は依然として未知のままである。

従来から臨床面においては、難治性空洞を有する症例に耐性菌出現が高度にしかも高率に認められることは周知の事実であり、更に近時切除肺の細菌学的検査においても、空洞から得た菌については、その他の病巣の菌よりも遙かに耐性獲得が大であることが知られて来た¹²⁾。これらの事実は、菌の増殖が旺盛で、しかも適当な濃度の薬剤がこれに作用する状態の部位において、耐性菌が増殖して来ることを物語つていると考えられる。

一方試験管内実験でも内藤門下の今井¹³⁾は、培地の組成、培養温度及び薬剤濃度を種々に変えた組合わせて菌を培養した結果、その薬剤耐性出現のための菌の発育条件に、至適な範囲が存在することを確かめた。

以上の如く、空洞性病巣において菌の薬剤耐性の起り易い事実について各方面から研究が進められ、また意見が述べられているのであるが、一方堂野前等¹⁴⁾が行つたように、家兎に実験的に作成した肺空洞に対する治療実験によつて、空洞内の菌の薬剤耐性の獲得を示した報告も行

われている。

以上の如き観点から、著者は、結核に対して強い抵抗性を示し、従つて従来 *in vivo* で耐性菌を作り難かつたラッテにおいてさえ、これに限局性壊死性病巣（出来るならば空洞性変化）を作ることにより、これに薬剤耐性を獲得させることが出来るかも知れないと考えた。この意味で先に同僚の由本⁵⁾がラッテの肺に経気管支性に結核病変を形成させた実験に倣い、著者はその死菌を生菌に代えて、さらに菌接種後 SM あるいは INH の投与を行つた。

成績はすでに述べた通りであり、著者の実験では予め動物の感作を行わなかつたためか、ラッテの肺病変は多くは撒布巣で、由本⁵⁾が作り得たような限局性の壊死巣を認めた例が比較的少なかつた。しかしその一部では空洞形成直前の状態を思わせる巨大な壊死巣を認めることの出来た例もある。このように形成された病巣が画一的でなかつたため、得られた菌の薬剤耐性に関する成績も必ずしも満足し得る結果とはいへなかつた。

先ず SM 治療群では 1r 耐性の出現をかなり認め得、ことに週 3 日投与群は週 6 日投与群よりも高率に耐性菌が現われ、またその出現は 1 カ月治療群の方が 2 カ月治療群よりも高率であつた。Prednisolone を併用したものでは例数は少ないが、全例に SM 1r の完全耐性を認め得た。

実験的結核症に対する副腎皮質ホルモンの影響を検討した報告は、近年きわめて多数に見ることが出来る。それらによると、Cortisone 投与時には結核病巣の細胞反応及び病巣の被包化傾向が弱く、線維増殖や肉芽組織の減弱を認めるが、病巣内の結核菌についてはその増殖がきわめて旺盛であると報じている¹⁵⁻¹⁸⁾。更に最近小川等¹⁹⁾及び岩崎等²⁰⁾は実験的結核症に及ぼす副腎皮質ホルモンの影響を検査して、これに化学療法を行つたものでは菌の薬剤耐性獲得が著しいことを報じている。又一方 Cortisone が実験的結核性空洞形成に及ぼす影響を検討した報告では、三島²¹⁾は空洞形成に促進的に働くといつており、これに反して木村²²⁾はある程度

阻止的に作用するが、組織学的には渗出傾向が著明であつたと述べている。さらに榊原等²³⁾は Cortisone の大量では空洞形成を著明に阻止したが、少量投与では対照と同様に全例に空洞を形成したと報じている。これらの報告よりするも、実験的空洞の形成と、形成された空洞内での菌の増殖とに対する Cortisone の影響は、まさに相反する結果といえるものであり、かかる実験では使用する菌と SM と Cortisone の量的関係が難かしいものとなる。

著者の実験においては、非感作ラッテを使用したためか、肉眼的に認め得る著明な空洞は形成されなかつたが、その中でも Prednisolone 併用群では病変の範囲及び菌増殖の程度はやや大であり、しかもその病巣より検出し得た菌はすべて薬剤耐性の獲得を示すものであつた。

次に INH 投与群では、1 カ月治療群 5 例中 1 例のみに 0.1r の耐性を認めたにすぎず、2 カ月治療群では 4 例共感受性であつた。

更に SM と INH の併用では、1 カ月治療群、2 カ月治療群共全例においてその菌は薬剤感受性を示し、既に著者がマウスを用いて報告した成績²⁴⁾と同じく、薬剤耐性獲得を完全に阻止して併用効果が明らかに認められた。

以上著者の今回のラッテにおける実験は、実験開始に当つて期待したような実験的肺空洞を動物に惹起することが出来ず、従つてラッテ肺空洞における菌の薬剤耐性の獲得を検査することが出来なかつた。しかし空洞性病変に到らなくとも、ラッテ肺に形成された壊死病巣において結核菌は比較的低い薬剤耐性を獲得することが出来る事実が示され、薬剤の併用はその耐性獲得を抑制し、副腎皮質ホルモンの使用はこれを増強する事実を知り得たもので、この意味でラッテにおいても菌の増殖が起り得る条件で薬剤が働くならば、試験管内や他の動物におけると同様に、菌は薬剤耐性を獲得し得るものであることが明らかとなつたのである。

第5章 結 論

著者は流パラ・ラノリンに包埋した H37Rv の生菌 0.2mg を経気道的にラッテの肺に感染

させ、これに限局性壊死性肺病巣を作成し、薬剤を投与して病巣における菌の薬剤耐性獲得の事実を明らかにしようとした。以上実験的に肺病巣を形成させた動物に対する化学療法は、SM 4mg 週6日、INH 0.2mg 週6日及びその併用各々1カ月及び2カ月間治療、SM 4mg 週3日2カ月間治療、更に SM 4mg 週3日 + Prednisolone 0.05mg 週3日、2カ月間治療等である。

1) SM 単独治療では、1カ月目5例中3例、2カ月目4例中1例に SM 1 γ の耐性を認め、その一部は完全耐性を示していた。

2) INH 単独治療では、1カ月目5例中1例に 0.1 γ の不完全耐性を認めたのみであった。

3) SM, INH 併用群では1カ月目及び2カ月目共、全例において菌は感受性に止まった。

4) SM 週3日治療では3例共 SM 1 γ の耐性を認め、中1例は完全耐性を示した。

5) SM, Prednisolone 併用群では2例共 SM 1 γ の完全耐性を示した。

撰筆するに臨み、終始御懇切な御指導と御校閲を賜った安平公夫助教授、並びに実験上の御援助を戴いた教室の小原幸信博士、由本伸両氏に感謝致します。

文 献

- 1) 牛場大蔵他：結核，30：114，1955.
- 2) 手塚孝：結核，31：17，1956.
- 3) 岩下一郎：結核，32：489，1957.

- 4) Williston, E. H. & Youmans, G. P. : Am. Rev. Tuberc., 62 : 156, 1950.
- 5) 由本伸：アレルギー，8：123，1959.
- 6) Karlson, A. G. et al : Am. Rev. Tuberc., 68 : 575, 1953.
- 7) 北本治他：結核，29（増）：133，1954.
- 8) Wolinsky, E. & Steenken, W.: J. Bact., 66 : 229, 1953.
- 9) 沢田藤一郎他：結核，29（増）：275，1954.
- 10) 牛場大蔵他：結核，29（増）：132，1954.
- 11) 安田正憲他：結核，30：89，1955.
- 12) 岩崎竜郎：結核，30（増）：1，1955.
- 13) 今井節朗：胸部疾患，1：164，1957.
- 14) 堂野前維摩郷，河盛勇造：文部省科学研究費結核班昭和29年度報告.
- 15) Spain, O. M. & Molomut, N.: Am. Rev. Tuberc., 62 : 337, 1950.
- 16) Le Meister, C. & Tompsett, R. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 295, 1951.
- 17) 林久子，金井興美：結核，30：631，1955.
- 18) 日置辰一郎：京結紀要，6：99，1957.
- 19) 小川辰次他：文部省科学研究費総合研究結核班昭和33年度第一回班会議報告.
- 20) 岩崎竜郎他：文部省科学研究費総合研究結核班昭和33年度第2回班会議報告.
- 21) 三島淳三郎：結核，30：530，1955.
- 22) 木村良知，桜井徹：結核，33：716，1958.
- 23) 榊原英夫他：結核，33：417，1958.
- 24) 小松幹雄：京結紀要，7（3増2）：9，1959.