

海獺の結核性皮膚潰瘍を対象とする化学療法実験

〔第1篇〕 海獺の結核性皮膚潰瘍形成に関する条件の検討

京都大学結核研究所化学療法部（主任教授 内藤益一）

松 田 好 和

（昭和33年12月20日受付）

第1章 緒 論

1935年 Domagk¹⁾によつて Prontosil が発見されてより、各種細菌性疾患に対する化学療法は著しい進歩を來たした。抗結核剤としても、Streptomycin を始め Para-aminosalicylic Acid, TB 1, Isonicotinic Acid Hydrazide, 更に Kanamycin 其他多種多様の薬剤が発見され、結核化学療法もその相を日に日に變貌しつつある。しかし、之等薬剤には結核菌の耐性獲得の問題がつきまとい、之等の薬剤のみで總ての結核症が征服出来るとは決して考えられず、更に多くの新しい薬剤の出現が望まれるのである。

さて、抗結核剤の screening test は *in vitro* においては比較的簡単にしかも短期間に施行出来るが、*in vivo* においては、*in vitro* における程簡単ではない。従来用いられている生存日数を測定したり、死後臓器剖見所見及び定量培養成績を検査する方法は、長期にわたり薬剤投与の後に病変をしらべるものであり、病變の経過を観察し続けて行くものではない。又実験開始時に病變を一定にすると云う様な事も出来ない。この様な欠点を補う方法として、教室の前川²⁾、日根野³⁾は家兎の前眼部結核性病變を用いて、抗結核剤の screening test が可能であると報告している。更に教室の神頭⁴⁾は同様な考えのもとに、Rubbo⁵⁾の動物の結核性皮膚潰瘍の経過を観察する方法を追試して、接種菌量の問題を検討し更に皮膚病變の経過の判定には痂皮の直径の測定のみで充分である事等を知り、海獺の実験的皮膚潰瘍病變を抗結核剤の screening test の対象として用い得る事を報告している。勿論 Rubbo⁵⁾等及び神頭⁴⁾も指摘している如

く皮膚における結核性潰瘍を利用する本法には当然、混合感染が予測されるのであるが、著者は實際の海獺の結核性皮膚潰瘍を観察すると極く乾燥した比較的厚い痂皮を以て被われ、外來の混合感染も否定は出来ないが、結核の治療実験として支障を來さないであろうと考えられる事他に、臨床的に肺結核症にはかなりの率及び程度に混合感染が存在し得るものであり、又他の実験的結核症に於いてはこの様な条件は求め難い点等をも考慮に加えて、敢えてこの方法を探つて検討を行なつた次第である。即ち著者は神頭⁴⁾の方法に準じて本法を抗結核剤の screening test として応用しようと思つたのであるが、時として、痂皮が小さく、かつ早期に治癒の傾向に向い、痂皮の直径の測定に困難を感じた。これは接種菌液の量及び菌濃度を増加する事によつて、大きい潰瘍の作成が可能であると考えられるが、この点の実験手技の上で制限をうける。そこで著者は別の方面から、即ち接種菌株の問題、及び実験動物の感作、未感作の問題に就いて検討を行ない、前述の困難な問題の解決を試みた。

以下その実験成績について述べる。

第2章 実験方法

1. 実験動物

体重 500g 前後の Römer 反応陰性及び下記の方法にて感作した Römer 反応陽性の黄褐色斑点を有する白色皮膚の成熟海獺を使用した。感作の方法は、後述の接種菌液の作成と同様に人型結核菌 H37Rv 株の生理的食塩水浮遊液を調製し、この 0.1cc 即ち 0.1mg の菌を実験海獺の大腿皮下に感作接種した。

2. 使用菌株

2種の菌株を用いた。即ち H37Rv 株及び黒野株である。H37Rv 株は広く我国の実験室で使用されている有毒性人型結核菌株であり、黒野株は、北里研究所の水之江氏により分離された有毒性人型結核菌で、殊にマウスに対して強力な然も安定した毒性を発揮すると云われている菌株である。之等教室保存の菌株を Sauton 培地に培養し、3週間後の発育良好な菌膜を釣取し滅菌生理的食塩水にて数回にわたり洗滌し、37°C, 30分間ほぼ重量が一定となるまで乾燥し、しかる後に化学天秤にて秤量した。この乾燥菌塊を小川氏硝子玉入コルペンに移して、充分菌塊を磨砕し、生理的食塩水を加えて攪拌混和し、0.1cc に対して 1mg の濃度とした。

3. 皮膚病変の作成

Rubbo⁵⁾の方法に準じて、予め脱毛消毒せる海猿の背側皮膚の4個所に、滅菌したツベルクリン注射器にて上述の結核菌浮遊液 0.1cc を皮内注射して皮膚病変を作成した。

4. 観察方法

硬結、潰瘍、痂皮等の結核性皮膚病変の経過は、単に痂皮の直径を測定する事によつてその程度を表現し得る事がすでに神頭⁴⁾によつて確かめられているので、著者は痂皮の長径と短径とを測定し、その平均値をもつて、病変の程度を現わした。測定は週1回乃至2回行ない、測定に際して潰瘍縁を明らかにするために、生理的食塩水を浸した綿花を用いて皮膚面を清拭した。

5. 体重測定

週1回、痂皮の測定と同時に行つた。

第3章 実験成績

実験第1：実験的皮膚病変の経過に及ぼす接種菌株の影響

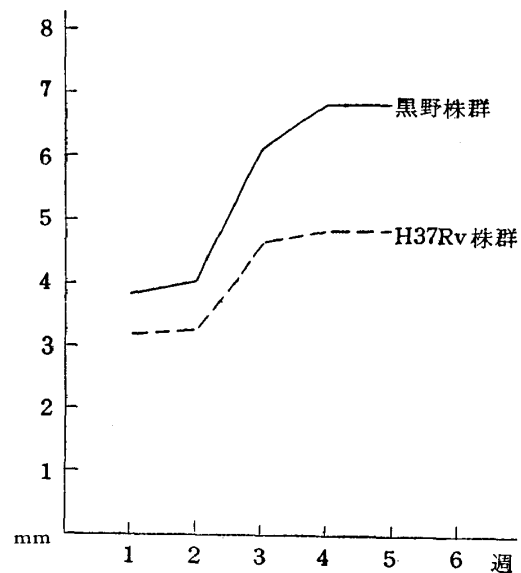
A. 実験動物群の編成

Römer 反応陰性の海猿6匹を選び、各群3匹宛2群に編成し、第1群には人型結核菌 H37Rv 株を、第2群には人型結核菌黒野株を夫々接種菌株とした。

B. 実験成績

菌液を皮内に注射後、皮膚病変の経過は個々の動物により若干は異なるが、接種後数日乃至十数日は注射部周辺の皮膚に硬結性腫脹強く、注射部に菲薄な茶褐色の境界不鮮明な痂皮の形成を見る。以後痂皮は次第に乾燥して、厚さを増し、2乃至3週間後には境界は全く明瞭となる。この様にして出来た痂皮の大きさを、実験方法の項で述べた如く、長径と短径の平均値にて現わして、人型結核菌 H37Rv 株と黒野株接種の場合の皮膚病変の経過を比較した。第1図及び第1表にその成績を示すが、黒野株接種群は H37Rv 株接種群に比して、痂皮の平均値は可成り大きく、かつ日数の経過と共に両群の平均値の差は大きくなり、接種後5週後には、黒野株群に於いては、平均値が 6.8mm になるのに

第1図 黒野株群と H37Rv 株群の比較 (各群平均, 単位 mm)



第1表 黒野株群と H37Rv 株群の比較 (各群平均, 単位 mm)

週	1	2	3	4	5
黒野株群	3.8	4.0	6.1	6.8	6.8
H37Rv 株群	3.1	3.2	4.6	4.8	4.8

比して、H37Rv 株群に於いては僅かに 4.8 mm である。

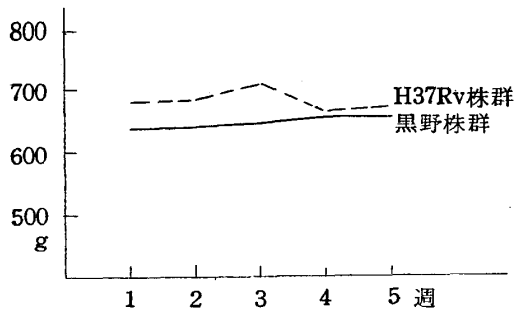
又痂皮測定と同時に行なつた体重計測の経過は第2図及び第2表に示す如く、僅かに H37Rv

株接種群の方が重い様であるが、皮膚病変の経過の如く著しい差は認められない。

C. 小括

以上の実験成績により、海猿の実験的皮膚病変の経過には、接種菌株によつて可成りの差のある事を知つた。抗結核剤の screening test

第2図 体重の経過 (各群平均)



第2表 体重の経過 (各群平均, 単位 g)

週	1	2	3	4	5
黒野株群	640	646	650	660	660
H37Rv 株群	680	685	710	665	680

として実験的皮膚潰瘍を用いようとする場合、大きい潰瘍乃至痂皮の形成される場合の方が薬剤の効果の判定に際して誤差が少なく、より正確な結果が得られる。ただ黒野株は H37Rv 株に比して一般的でないで、この点不利であるが、抗結核剤の screening test としては好都合の様に考えられる。

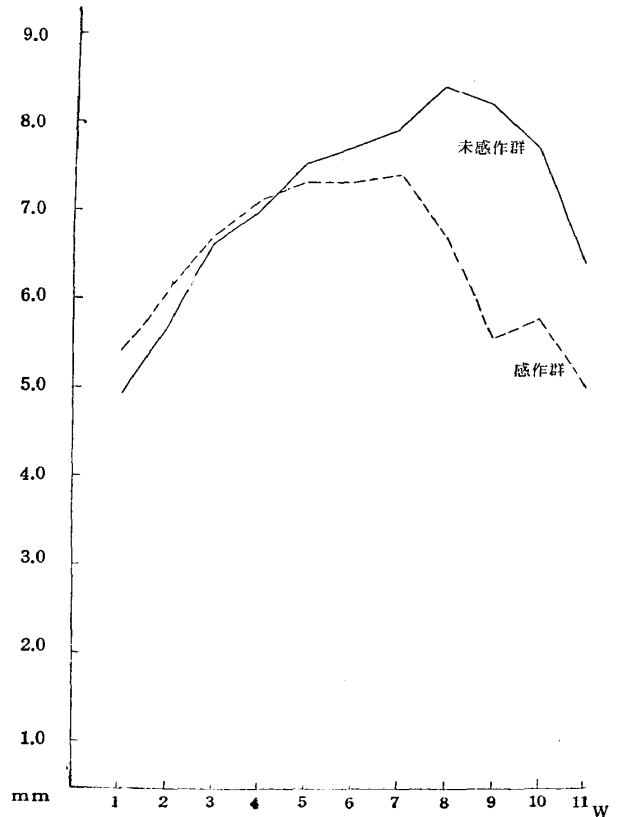
実験2：感作及び未感作海猿に於ける実験的皮膚病変の経過

A. 実験動物編成群

海猿8匹を用い、第1群には Römer 反応陰性の海猿4匹を、第2群には実験方法の処で述べた如く感作を行つて、Römer 反応陽性となつた海猿4匹を選んだ。接種菌株は何れも人型結核菌 H37Rv 株を用いた。

B. 実験成績

第3図 未感作群と感作群との比較 (各群平均)



菌液接種後の両群の痂皮の平均値の経過は第3表及び第3図の如く、接種後5週後位までは両群の間に著しい差を認めないが、6週後以後になると未感作群の方が感作群に比して大きい痂皮の形成が認められる。

皮膚病変経過の測定実験終了後、実験動物を撲殺し、肺、肝、脾及び淋巴腺の肉眼的所見をしらべた。その成績は第4表に示す如く、両群に著るしい差を認めなかつた。

C. 小括

以上の実験的皮膚病変の経過に及ぼす実験動物の感作及び未感作の影響に就て実験を行つたのであるが、特に第6週以後に於て両群に差のある事がわかつた。即ち接種後5週位までは両群に差が認められないが、第6週以後に於ては Koch 氏現象⁶⁾によつてむしろ未感作の方が強い病変を来たす様になる。

第3表 未感作群と感作群の比較 (各群平均, 単位 mm)

週	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
感作群	5.4	6.1	6.7	7.1	7.3	7.3	7.4	6.7	5.6	5.8	5.0
未感作群	4.9	5.7	6.6	7.0	7.5	7.7	7.9	8.4	8.2	7.2	6.4

第 4 表 各臓器の肉眼的及び結核菌定量培養成績

	動物番号	肺		脾		肝		淋 巴 腺 (剖見)			
		右	左	剖検	重量	剖検	重量	右 上	右 下	左 上	左 下
未 感 作	B 61	++	++	—	6.2	卅	62.0	+	—	卅	+
	C 4	+	+	—	1.5	++	28.0	++	÷	—	+
	C 11	++	++	+	1.2	卅	40.0	—	—	—	—
平 均		1.83	1.83	0.33	2.97	2.67	43.33	1.0	0.17	1.0	0.33
感 作	C 2	++	++	++	2.0	卅	47.0	++	—	卅	++
	C 9	+	+	+	1.2	+	31.0	+	—	—	—
	B 15	卅	卅	卅	5.5	卅	63.0	+	—	+	—
	B 64	++	++	—	1.5	++	36.0	+	—	卅	卅
平 均		2.5	2.5	1.63	2.55	2.63	44.25	1.25	0	1.75	1.25

第 4 章 考 按

以上著者は海狸の実験的結核性皮膚病変を抗結核剤の screening test として用いる場合の実験条件に就て検討を行つたのであるが、以下之等の問題に就て個々の考察を行ないたい。

先づ接種菌株の問題であるが、Rubbo⁵⁾ は H37Rv 株と肺結核患者より分離された人型結核菌の 2 種を用いて実験を行なつたが、H37Rv 株よりも患者より分離された毒力の強い人型結核菌を用いる方が便利であると報告している。著者は H37Rv 株とマウスに対して比較的強毒であると考えられている人型結核菌黒野株を比較したのであるが、黒野株の方が大きい痂皮を作り、測定に便利である事を知つた。ただ痂皮を大きくする為には、接種菌液を多くし、或は菌液濃度を濃くする、即ち多量の菌を接種する事によつて、この目的は達せられそうに思われるが、この様な事は神頭⁴⁾も述べている如く、菌液の濃度を高めたり或は注射する菌液量を多くすると皮内注射に困難を来たしたり或はツベルクリン注射針がつまる等手技上困難をとまらうのである。

次に実験動物として感作動物を用いるか或は未感作動物を用いるかの問題であるが、著者の行なつた実験成績に於いては、感作動物よりも未感作動物を用いた方が大きな痂皮が得られ、且つ長期間にわたつてこの病変が持続する事が認められた。松本等⁷⁾はすべて死菌による感作

動物を用いて皮膚病変を作成し、可成り大きい潰瘍の形成を認めているが、接種菌株として人型結核菌 Frankfurt 株を用い、且つラノリン—パラフィン溶液に懸濁して用いているので、局所に於けるアレルギー反応が、抗原性物質の局所蓄積のため特に強く現われ、その結果大きい痂皮が形成されたものと考えられる。従つて抗結核剤の screening test の対象として用いる結核性病変としては不適當ではないかと考えられるが、この点については尚検討を要するものと思われる。

ただ人体に於ける結核症が Koch 氏現象⁶⁾のみによつて説明される病変ではない為、単に未感作動物を実験に用いる事によつて大きい痂皮が得られると云う理由で、screening test として利用する場合未感作動物を用いるのが適當であると云う事にも問題がある様に思われる。

この点については結核感作動物に於いて更に測定容易な大きい痂皮形成をもたらす方法を検討し、各種結核化学療法を施行してそれとの効果の比較を試みる事も必要であらう。

第 5 章 結 論

著者は抗結核剤の効果を検討する為の screening test として、海狸の実験的結核性皮膚病変を利用する場合の実験条件の検討を行い、次の如き結論を得た。先づ第 1 に接種菌株としては H37Rv 株よりも黒野株を用いた方が長期間にわたつて観察可能な大きい痂皮が得られる事

を知つた。次に実験動物としては感作動物を用いるよりも未感作動物を用いた方が、即ち初感染皮膚病変を利用する方が、大きい痂皮が形成される事を認めたのである。従つて著者は抗結核剤の **Screening test** として用いる場合、未感作動物に黒野株を接種する事により生ずる結核性皮膚病変を観察するのが適當であると考え以下の諸篇に述べる如き実験を行つた次第である。

(擱筆に臨み終始御懇切なる御援助を賜つた前川助教授と御助力を賜つた研究室諸氏に深甚の謝意を捧げる。)

参 考 文 献

- 1) Domagk, G., Dtsch. Med. Wschr., 61 ; 250 (1953)
- 2) 前川暢夫 : 京大結研紀要 1 ; 29 (1953)
- 3) 日根野吉彦 : 京大結研紀要 4 ; 130 (1955)
- 4) 神頭勝太 : 胸部疾患 1 ; 275 (1957)
- 5) Rubbo, S. D. and Pierson B. J. : Am. Rev. Tuberc., 68 ; 48 (1953)
- 6) Koch : Dtsch Med. Wsch. 101-102 (1891)
- 7) Matsumoto, S., Nagao, S. and Kobayashi, H. : The Annals of Tuberculosis 7 ; 28-35 (1956)