

慢性結核症に対する化学療法強化の限界 に関する実験的研究

京都大学結核胸部疾患研究所 内科 1

国立療養所南京都病院

馬 渕 尚 克

第1章 緒 言

近年，わが国において肺結核はようやくその死亡率が減少してきている。しかし，疫学的に患者の年齢層は，若年者より中高年齢者へと移動してきており¹⁻³⁾，なお難治・慢性疾患のひとつであることに変わりはない。

1944年，WAKSMAN の streptomycin 発見以来多数の抗結核剤が発見され，結核の化学療法は長足の進歩を示し，それが結核による死亡の低下や，要医療者数の著明な減少をもたらしたことは周知の事実である。しかしながら，化学療法によって，感染菌を個体から完全に根絶することはまことに困難であり，有力な抗結核剤の併用治療によっても，効果発現を阻害する種々の因子が介在し，化学療法の強化の限界も強く認識されてきている。

実験的マウス結核症において主として，肺および脾内感染菌数の消長を観察することにより，感染菌を根絶しようとする試みは，McCune^{4,5)}などが，1956年に発表した。その根絶の困難なことの原因のひとつとして，microbial persistence⁶⁾ すなわち，結核菌が薬剤に感受性でありながら，長期にわたる化学療法にもかかわらず，生体内で生き残るという現象が注目され，その後も Canetti⁷⁾，McDermott⁸⁾，Smadel⁹⁾ など McCune^{10,11)} と同様の目的の論文が数多く発表されている。金井¹²⁾ も，マウスによる実験を行うと同時に，最近きわめて優れた総説

を提起している。すなわち，microbial persistence の問題は，いぜんとして，重要な問題であり，こうした菌を persisters と称するが，これを持続生残菌と訳し，使用している。さらに金井の総説にも指摘されているように，今日，結核制圧の実態が，活動型から潜在型への感染様式の転換と再発という現象が今後とも問題として残り，この点においても生残菌の性格が検討されなければならぬとされている。また一方では，RFP の出現とともに，既存の数多くの抗結核剤との併用により，化学療法の多様化と同時に，短期化学療法も注目されつつあり，豊原¹³⁾をはじめ，実験的にも，臨床的¹⁴⁻¹⁶⁾にも多くの研究が行われている。

著者はマウスの実験結核症における，肺および脾内結核生菌数の経過を実験Ⅰにて短期間（2ヶ月），および実験Ⅱにおいて長期間（8ヶ月），それぞれ単独あるいは多剤併用による化学療法を行うことにより，その経過を追求し，生体内滅菌に近い効果を得るための条件を検討する目的で実験研究を行ったのでその概要を報告する。

第2章 実験材料および実験方法

第1節 実験方法

1 実験動物

実験動物としては，均一系マウス dd 系の雄を用い，体重 10 g 前後のマウスを室温（約23℃）の恒温動物室において飼育し，体重が平均

約 25 g 程度になるのを待って、これを実験に供した。

飼料については、関西研究所製ゼネラル固型のものを与え、水は充分に与えた。

飼育箱は金網製のケージで通常 1 箱内に 10 匹までとした。

2 接種結核菌株

当教室において、継代培養し保存している有毒人型結核菌 KURONO 株を、3 ないし 4 週間グリセリン・ブイヨン培地にて表面培養した後、その菌膜を釣取使用した。

第2節 実験方法

1 接種方法

前述の人型結核菌 KURONO 株の菌膜を釣取して、滅菌口紙で水分を除去した。その後秤量して、めのうの乳鉢で磨砕し、これに適量の生理的食塩水を加え、1 ml 中に 0.1 mg の菌量が浮遊するように調整し、この 0.1 ml を実験用マウスの尾静脈内に注射した。接種生菌数については、その 0.1 ml を 1% 小川培地へ順次 10 倍希釈しながら接種培養し、確認した。

2 抗結核剤投与法

結核菌 KURONO 株、感染処置の終わったマウスは、2 ケ月間の放置期間を置いた後に対照群を除いて、抗結核剤は体重に比例した投与量を 1 日 1 回、すべて水溶液とし、背部皮下に注射により投与した。なお、非治療対照群には、治療各群と同様の方法で、生理的食塩水を同量投与した。

3 剖検時の体重および肺ならびに脾の重量

幣死あるいはクロロホルムで屠殺したマウスの体重を上皿天秤にて 10^{-1} g まで秤量し、胸壁を開いて、気管の部分を除き、肺および脾を摘出した。その後各臓器毎に、上皿天秤により秤量した。

4 肺および脾における生菌数の測定

各群とも原則として、毎回 3 匹ずつ屠殺した。マウス屠殺時に剔出した肺および脾をまづその重量の 6 倍量の滅菌蒸留水を加えてテフロンホモゲナイザーにて磨砕し、ついで 3% 苛性ソーダを 3 倍量加えた。苛性ソーダの終末濃度は 1%，肺および脾の組織濃度は 100 mg/ml

になるように希釈した後に、各磨砕液を均等化し、これを更に 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍と順次希釈し、その各段階の希釈液からおのおの 3 本ずつの 3% 小川培地に検定付ピペットを用いて、0.1 ml ずつ培養した。判定にさいしては、上記各段階のうち、10~100 コロニーの範囲に入る希釈段階の 3 本の発育集落数を平均して、臓器 1 mg 中の生菌数を算出した。

第3章 抗結核剤の種類ならびに投与量

実験的慢性マウス結核症に対して、長期かつ強力な化学療法の効果を見るため、全体を対照群をも含め次の 6 群とした。

第 1 群 INH 単独 (10 γ /g)

第 2 群 INH 単独 (20 γ /g)

第 3 群 SM(20 γ /g)+INH(10 γ /g)
+PAS(200 γ /g)

第 4 群 INH(10 γ /g)+SM(20 γ /g)
+PAS(200 γ /g)+EB(10 γ /g)
+TH(5 γ /g)

第 5 群 INH(20 γ /g)+SM(20 γ /g)
+PAS(200 γ /g)+EB(10 γ /g)
+TH(5 γ /g)

第 6 群 対照群

実験 I はマウス 165 匹を 6 群に分けた。第 1 群から第 5 群までを治療群として各 24 匹、第 6 群は対照群として 45 匹とした。

実験 II はマウス 132 匹を 6 群に分けた。第 1 群から第 5 群までを治療群として各 20 匹、第 6 群は対照群として 32 匹とした。

抗結核剤の投与量については、第 1、第 3 および第 4 群の INH は 10 γ /g、第 2 および第 5 群では INH 20 γ /g、SM については各群ともに 20 γ /g、PAS は 200 γ /g、EB は 10 γ /g、TH は 5 γ /g とした。

第4章 化学療法剤の投与期間

実験 I および実験 II を施行した。

実験 I では 2 ケ月間治療を行った。実験 II では、治療期間は 8 ケ月であった。

第1節 実験 I

実験的慢性結核症のマウスを得るため、人型

結核菌 KURONO 株接種後、約2ヶ月間の放置期間をおいた。それぞれの群に対して約2ヶ月間の化学療法を施行した後に、投薬を中止した。その後、3日、1週間、2週間、4週間、6週間、9週間後に屠殺し、体重、肺および脾の重量を測定したのち、肺および脾生菌数の経時的推移を求めた。非治療の対照群でも治療群と同様の方法で、生理的食塩水を投与し、化学療法各群と全く同様に、同時に体重、肺および脾重量、さらに肺および脾臓器内結核生菌分布を経時的に追求した。

第2節 実験II は上記実験Iと同様の群を約8ヶ月間治療して、休薬後、3日、1週間および10日後に屠殺し、同様に体重、肺および脾重量を測定後、肺生菌数の経時的推移を求めた。

第5章 実験結果および考按

第1節 実験I

肺内生菌数分布（図1）については、化学療法を2ヶ月間施行し、投薬終了後3日目に、剖検培養したものでは、各化学療法群と対照群との間で、 10^2 から 10^3 以上の差が認められた。

特に第4群と第5群のような強力と考えられる治療を行った群と対照群との間では、明らかに 10^3 以上の生菌数の差がみられた。さらに治療終了後の期間が、2週間、4週間、6週間と長くなるにつれ、各化学療法群の間には差が小さくなってゆき、各群とも $10^5/\text{mg}$ 程度に生菌数が増加した。しかし各治療群と対照群の間にはいぜんとして、 10^2 以上の差が認められる。すなわち、2ヶ月間の慢性マウス実験結核症に対する化学療法により、休薬3日後では単独化学療法群と併用強力化学療法群との間に差が認められるが、休薬期間が長くなると治療各群の間における差は認められなくなる。しかしながら治療各群と対照群の間には差が認められる。

脾内生菌数分布（図2）については、第2群はやや傾向が異なるようにみえるが、第2群以外の各治療群は対照群と比較して、投薬終了後3日から1週間では 10^3 の差が認められた。投薬終了後4週から6週後になると、第1、第2、第3群では対照群との差が 10^2 となるが、強力と考えられる第5、第6群ではいぜんとして、 10^3 の差が認められた。9週間後になると

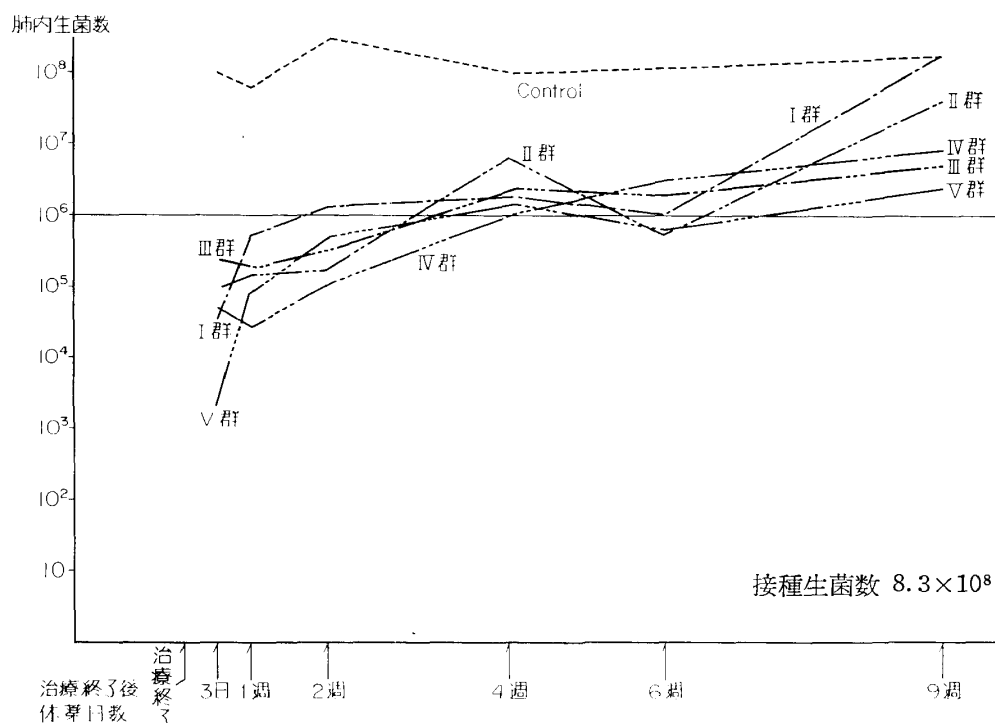


図1 肺生菌数の経時的推移（実験I）

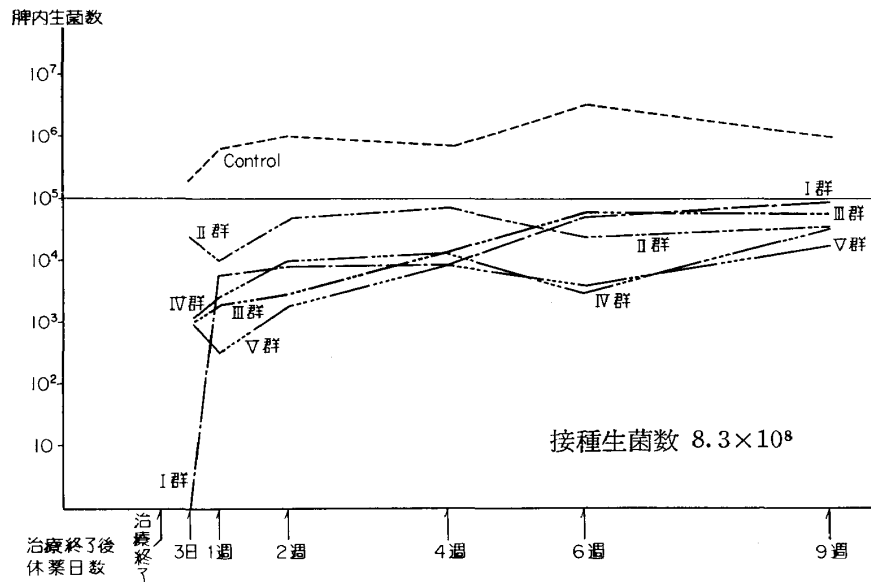


図2 脾生菌数の経時的推移(実験I)

治療群全体の生菌数が増加し、対照群との差が少なくなってくるが、比較的強力な化学療法と考えられる第4, 第5群では 10^2 の差が認められた。

体重については、対照群と治療各群のいずれにおいても、投薬終了後3日, 1週間, 2週間, 4週間, 6週間, 9週間いずれの時期でも、特に著しい差異は認められなかった。

肺重量については、投薬終了後3日の時点で、対照群と治療各群の間に見るべき差異はなかった。しかし休薬後, 1, 2, 4, 6および9週間の各時期に剖検したものでは治療各群の肺重量は対照群と比較して著しく軽かった。

脾重量についても、投薬終了後, 3日間, 4週間および9週間の各時期では、対照群の脾重量は治療各群のそれと比較して明らかに重かった。6週間の時点では両者に余り大きな差が認められないようであったが、投薬終了後1週間および2週間の時点では、第1群および第2群のINH単独治療群と対照群では余り差がないが、強力な化学療法と考えられる第3, 第4および第5群の脾重量は対照群のそれと比較して軽かった。全般に、このような強力と考えられる多剤併用治療各群の脾重量はINH単独治療群のそれと比較して軽い傾向がみられた。

平均ルート比肺重およびルート脾指数につい

ては、表1に示すように、比肺重では、第3群接種後140日で9.4を示す以外はいずれも10を越えており、特に対照群では休薬後1週間(接種後133日), 2週間(同140日), 4週間(同154日), 6週間(同168日)および9週間(同191日後)でいずれも15.6から18.9という高い値であった。脾指数は各群とも、1以下であるが、休薬後3日後(接種後130日), 2週間(同140日)および9週間(同191日)で対照群では1以上であった。

慢性実験的マウス結核症の比較的長期間治療の各群において、投与された化学療法剤の耐性の上昇の有無について検討した。THを除いた他の抗結核剤では耐性の上昇は全くみられなかった。すなわち治療後休薬9週間後のもので、第4群では、THが12.5 γ で耐性上昇が認められた以外は、大部分の抗結核剤ではこのように比較的長期間の治療でも、十分に薬剤の感受性があるものと考えられる。

マウスにBCG免疫後^{17,18)}に、あるいは接種後に多量の有毒菌を投与したり、本実験のように比較的少量の菌を接種することによって、慢性マウス実験結核症を容易につくり得ることは分っており感染菌数の消長曲線を定量培養等により、追求することにより、それぞれ「対数増殖期」, 「動的平衡期」, 「静的平衡期」などが

表1 Root Indices of Spleen and Lung in Experimental Animals (実験I)

Group	Index	Days after Inoculation								
		28	42	56	130	133	140	154	168	191
G1	Lung				10.1	12.0	11.0	11.7	12.0	13.9
	Spleen				0.84	0.64	0.93	0.89	0.64	1.13
G2	Lung				10.6	11.4	13.0	11.7	11.4	14.0
	Spleen				0.94	0.91	0.71	0.69	1.09	0.86
G3	Lung				12.2	11.8	9.4	11.7	12.0	13.6
	Spleen				0.76	0.58	0.70	0.72	0.71	1.06
G4	Lung				10.8	12.2	10.1	10.3	11.0	12.1
	Spleen				0.89	0.66	0.76	0.80	0.69	0.64
G5	Lung				11.2	11.7	11.2	10.6	10.4	10.9
	Spleen				0.76	0.64	0.75	0.51	0.68	0.58
G6	Lung	10.9	11.6	12.4	11.3	18.0	15.6	18.9	18.5	17.3
	Spleen	0.97	0.87	0.71	1.15	0.74	1.09	0.98	0.74	1.48

考えられる¹⁹⁾。また、化学療法などの治療により dormant infection (休眠感染) と latent infection (潜在感染) の両者の状態が考えられるが^{4,12)}、本実験では、肺および脾内生菌数についてみると、化学療法の組合わせのうち多剤併用の3者、5者でも、2ヶ月間という加療期間では、その後の休薬期間が治療終了後2週、4週、6週さらに9週間と長くなるにつれて、生菌数分布が対照群のそれに徐々に近づいていくことから static equilibrium の状態で潜在感染に近い状態ではあるが、やはり休眠感染と呼ぶ状態と考えられる。このことは McCune⁴⁾ が INH, SM, PAS を使用して、16週治療したり、Rees & Hart et al⁹⁾ が INH, PZA を使用して35週加療したマウス実験結核症の実験結果と同様の傾向である。太田^{20,21)} も SM 依存型人型結核菌 18b 株を用いて、増殖休止状態の結核菌に対して、INH, KM, EB の併用による化学療法を試み、増殖休止状態の結核菌に対する治療効果はあまり期待できず、菌の分裂増殖期の盛んな感染初期に多剤かつ大量の抗結核剤を使用することをすすめている。また最近注目されている RFP は persistent な結核菌に対しても有効^{22~26)}とされているが、RFP を含まない抗結核剤による化学療法でも、本実験のよう

に、2ヶ月間の治療ではともかく、実験Ⅱで述べるように、長期間しかも多量に使用することにより潜在感染に近い状態をつくり出すことは可能である。すなわち RFP の登場により結核化学療も強化されるとともに、治療期間の短縮も考えられているが、RFP, PZA を除く抗結核剤による化学療法でも、2ヶ月間では根絶は望むべくもないが、少なくとも持続生残菌 (persisters) が休眠菌の状態となるものと考えられる。

体重、肺および脾重量については肺および脾内感染菌数の消長曲線にみられるほど、著明な差は認めなかった。しかしながら平均ルート比肺重およびルート脾指数 (表1) を検討すると治療各群と対照群との間では明らかな差があった。すなわち治療各群の平均値と対照群の比肺重および脾指数を比較してみても、それぞれ 11.5と16.6および0.77と1.03であり、また治療群の間でも、第1、第2および第3群よりも、第4、第5各群の方が値が小さい傾向にあり、もっとも強力と考えられる第5群では、比肺重 11.0、脾指数は0.65ともっとも小さい値で、対照群の16.6および1.03と比較して大きな差が認められる。このことは両指数ともそれぞれの臓器の病変や生菌数の多少を反映する傾向にあ

り、今後とも検討を要する有力な指標と考えられる。

第2節 実験 II

8ヶ月間の長期の化学療法を加えた実験については、3日後、7日後および10日後のいずれの休薬期間を置いたものでも3者以上の化学療法群（第3、第4および第5）では菌発育が認められなかった。これに反して、第1および第2群のINH単独群ではその投与量の多少にかかわらず、肺生菌数の経時的推移（図3）をみると再増殖がみられ、殆んど対照群と同数の生菌数を見た。このことからマウスに対して比較的強力と考えられるPZAやRFPを使用しなくても、このように長期間の加療により、潜在感染(latent infection)ないし根絶(eradication)に近い状態が得られることを示している。本実験の場合は治療中止後のcortisoneによる処理^{12,18,27)}は行っていないので完全なeradicationの指標とはなりにくい。RFP, PZA等による強力な抗結核剤を含まない治療でも、いぜんとして、有効な化学療法であり、種々の短期化学療法が失敗しても、このような方法がある限り、耐性獲得という点で問題はあるが臨床的な応用面にも効果が期待できそうである。脾については、対照群をも含め各群とも治療終了後、

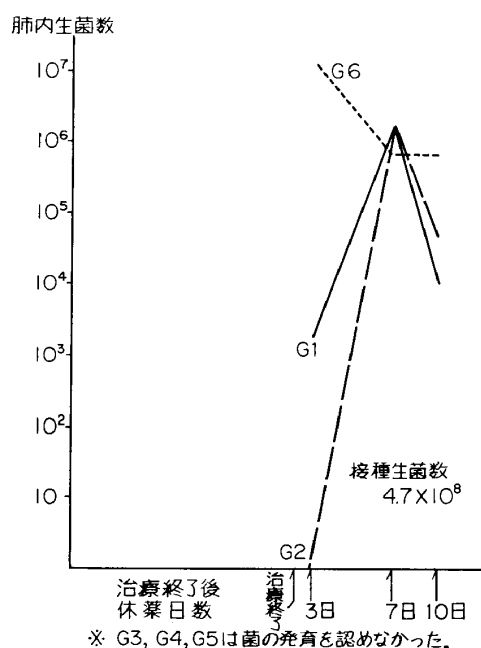


図3 肺生菌数の経時的推移（実験Ⅱ）

表2 Root Indices of Spleen and Lung in Experimental Animals (実験Ⅱ)

Group	Index	Days after Inoculation		
		283	290	293
G1	Lung	10.8	13.1	16.1
	Spleen	0.76	1.10	0.86
G2	Lung	11.0	12.8	11.6
	Spleen	0.87	0.57	1.16
G3	Lung	10.4	9.8	9.9
	Spleen	1.04	0.64	0.53
G4	Lung	10.8	11.0	8.6
	Spleen	0.94	0.82	0.86
G5	Lung	8.7	9.4	11.3
	Spleen	0.72	0.83	0.70
G6	Lung	21.8	15.5	19.6
	Spleen	0.93	1.34	0.88

休薬3日、1週間および10日後のいずれも、小川培地にて発育集落を認めず生菌数は求められなかった。第1群、第2群および対照群では肺内生菌数の求められたことから、長期治療による何らかの影響か、あるいは実験手技の誤りが考えられるので、今後とも検討したい。

体重、肺および脾重量についても実験1とほぼ同様の傾向であり、平均ルート比肺重およびルート脾指数を検討してみても(表2)比肺重では治療各群と対照群の間には差があり、治療終了後休薬3日(接種後283日)、7日(同290日)、10日(同293日)で対照群では、21.8、15.5、19.6とそれぞれ高い値を示しているが、比較的強力と考えられる第3、第4および第5群では11.0を越えていない。第1と第2群ではいずれも10.8から16.1までの値であった。脾指数でも、第1、第2および第3群と対照群では1を超えるものがあったが、第4および第5群はいずれも1以下であった。各平均値を比較してみても、治療の比較的強力と考えられる群ほど、ルート比肺重およびルート脾指数とも小さくなり、各治療群と対照群との差は明らかである。

第6章 結 語

RFP, PZA を含まない抗結核剤 (SM, PAS,

INH, TH, EB) の使用により, 2ヶ月間の化学療法では, 終了後肺および脾内生菌の再増殖をみたが, 8ヶ月間の治療では, 終了後, 3者および5者の多剤併用化学療法群については肺内生菌の再増殖をみなかった。

文 献

- 1) 前川暢夫: 結核, 52: 595, 1977.
- 2) 石原啓男他: 日本胸部臨床 27: 96, 1973.
- 3) 砂原茂一: 結核, 53: 527, 1978.
- 4) McCune, R. M. and Tompsett, R.: J. Exptl. Med., 104: 737, 1956.
- 5) McCune, R. M. et al.: J. Exptl. Med., 104: 763, 1956.
- 6) McDermott, W.: Yale J. Biol. and Med., 30: 257, 1958.
- 7) Canetti, G.: The tubercle bacilli in the pulmonary lesion in man. Springer, N. Y., 1955.
- 8) McDermott, W.: Amer. Rev. Resp. Dis., 86: 323, 1962.
- 9) Smadel, J. E.: Bull. N. Y. Acad. Med., 89: 159, 1963.
- 10) McCune, et al.: J. Exptl. Med., 123: 445, 1966.
- 11) McCune, et al.: J. Exptl. Med., 123: 469, 1966.
- 12) 金井興美: 結核, 53: 573, 1978.
- 13) 豊原希一: 結核, 54: 369, 1979.
- 14) 山本和男他: 結核, 52: 39, 1977.
- 15) 山本和男他: 結核, 52: 168, 1977.
- 16) 浦上栄一: 結核, 53: 596, 1978.
- 17) Sever, J. L. and Youmans, G. P.: Amer. Rev. Tuberc., 76: 616, 1957.
- 18) Lefford, M. J. and McGregor, D. D.: Cellular Immunol., 14: 417, 1974.
- 19) Rees, R. J. W. and Hart, P. D.: Brit. J. Exptl. Pathol., 42: 83, 1961.
- 20) 太田令子: 結核, 46: 295, 1971.
- 21) 太田令子: 結核, 46: 493, 1971.
- 22) 近藤瑩子, 金井興美: 結核, 52: 411, 1977.
- 23) 近藤瑩子, 金井興美: 結核, 52: 475, 1977.
- 24) 近藤瑩子, 金井興美: 結核, 53: 261, 1978.
- 25) Fox, W. and Mitchison, D. A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 111: 325, 1975.
- 26) Fox, W.: 結核, 53: 503, 1978.
- 27) Battern, J.: Tubercle, 51: 95, 1970.

STUDIES OF THE EFFECT OF ANTITUBERCULOSIS AGENTS AGAINST TUBERCLE BACILLI OF THE CHRONIC TUBERCULOSIS IN MICE

Hisakatsu MABUCHI, M.D.

Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Kyoto, Japan

Two large groups of mice were infected intravenously with *Mycobacterium tuberculosis* Kurono-strain. Each of these two large groups was sub-divided into six smaller groups as shown in this paper. After the intravenous challenge, all of the mice were observed without any treatment for two months to ensure the suitable chronic tuberculosis lesions. And then, in the Experiment I mice were treated for two months. And in the Experiment II mice were treated for eight months. The anti-tuberculous drugs, streptomycin (SM), para-aminosalicylic acid (PAS), isoniazid (INH), ethionamide (TH) and ethambutol (EB) were employed in these experiments.

After chemotherapy of two months' duration, a survival of the tubercle bacilli in the lungs and spleens were noted in all groups including the control.

No survival resulted in the eight months' chemotherapy with the combination of SM, PAS, INH or SM, PAS, INH, TH, EB. The long term usage of the multiple combination of chemotherapy such as SM, PAS, INH, TH and EB may eliminate so called persistent bacilli.