

結核マウスの生存日数を指標とせる化学療法剤の効果

〔第1篇〕 結核マウスの生存日数に及ぼす接種結核菌株、菌量及び供試マウスの系統等の影響

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

浜 田 浩 司

（受付 昭和33年12月20日）

【内容抄録】

抗結核剤の動物実験的研究に於ける *in vivo* の screening test の一方法として結核マウスの生存日数を指標として其の治療効果を比較検討する方法を検討した。本篇に於ては結核マウスの生存日数に及ぼす接種結核菌株、菌量及び供試マウス等の影響について検討した。其結果、黒野株 0.5mg per mouse 接種、dd 系マウスを用いて判定には生存率曲線と平均生存日数との総合判定による方法を採用し、此方法により SM, PAS 及び INH の 3 者の抗結核性を検討した。そして本法が抗結核剤の screening test の簡便法として利用し得ることを確認した。

第1章 緒 論

抗結核剤の “*in vivo*” screening test の手段としてマウスに実験的結核症を起し之に各種の薬剤を投与して主として其の生存日数を指標として其の薬剤の抗結核性を判定しようとしたのが本研究の主旨である。そこで、此の研究を始めるに当り基礎的研究として結核菌株はどの菌株をどの量使つたらいいか、又マウスはどの系統がいいかと言うような実験条件を検討しようとして以下に述べる実験を行なつたので本篇に於てその成績を報告する。

さて結核化学療法の実験的方法として定型とされているものは Feldman and Hinshaw¹⁾ が Streptomycin (SM) の効果を検討するに際して報告した方法で、後に Dessau 等²⁾ が比較的簡単な方法を述べているが、之は本邦に於て長谷川等³⁾ の Cepharanthin の研究に端を発して岡、柳沢等⁴⁾ が提唱した方法と

よく似ている。之は多数の海溟を用いて長期にわたる治療実験を行つた後剖検して諸種の検査を行う方法で、実験に要する資材と手数と時間とを考えると、厳密に或薬剤の抗結核性を確認する為には適当であろうが、多くの薬剤の中から抗結核性を有する薬剤を抽出し更には簡単に薬剤相互の比較をも行いたいと言うような screening test の理想に反して大規模となり過ぎる欠点がある。之に反し Raleigh and Youmans,⁵⁾ McKee and Rake,⁶⁾ 岩崎・小川⁷⁾ 等のマウスを使用して行う方法は手技が簡単で、結果の判定も早く、其の上費用の点でも経済的で、均一系の実験動物が使用され得るし、且つ又抗結核剤の治療効果判定上安価に多数の動物を使用し得るので比較的正確な価値判断を下し得る等の利点がある。この様なマウスを対象とする実験に於て、抗結核剤の治療効果の判定方法としてはマウスの治療群と対照群とについて生存日数比較により判定する方法、臓器の結核性病変の程度、重量等により判定する方法及び臓器内の結核菌の生菌数の推移により判定する方法等がある。Youmans⁸⁾ 及び柳沢⁹⁾ 等は内臓の結核結節又は重量から判定する方法を採用しているが、此の方法は主観的要素が入り込む危険が多い様に思われる。尚 Ceriotti¹⁰⁾ は経静脈感染マウスの実験的結核症に於て、肺の重量が著明に増加することを認め、抗結核剤の投与により或一定の範囲内では其の用量と比例的に肺重量の減少を示すことを報告している。そして従来迄は主観的にしか評価することの出来なかつた現象を客観的に然も定量的

に評価出来る様になつたと述べている。臓器の定量培養による方法は操作が可成り複雑であり、又結果の判明する迄の期間が長いので、**Screening test** としては考慮の余地がある様に思われる。次に1950年 **American Trudeau Society**¹¹⁾ が発表した標準実験手技中マウスを使用する場合の判定方法として次の3点を挙げている。即ち50%死亡日数(**T50**)、肺の剖検所見と其の病理組織学的所見ならびに体重曲線の3点である。そしてこれらの項目のうちマウスの場合は特に生存日数に重点を置くことが多くの学者によつて強調されている。従つて此の場合毒力の強い且つ又安定な菌株が必要となつてくるのは当然である。

そこで著者は実験用菌株として普通用いられている有毒性人型結核菌 **H₃₇Rv** 株と、北研水之江氏¹²⁾ により分離された人型結核菌黒野株とについて比較実験を行つた。マウスに対する接種経路による黒野株の毒力のあらわれ方の差違について、水之江¹²⁾ は静脈内感染が最も強く、脳内感染が之に次ぎ、以下腹腔内、皮下、皮内感染の順で、経鼻感染が最も弱く、菌を培養することが出来なかつたし又、この中で静脈内感染及び脳内感染はそれ以外の方法に比べて格段に強い毒性を発揮したと報告している。著者は感染経路としては尾静脈内感染を選ぶこととした。各系統マウスによる結核菌感染の実験は染谷他¹³⁾ や柴田等¹⁴⁾ が既に報告しているが、特にマウスの実験的結核症に対する感受性はマウスの均一性が関係し又、一方感染する菌の側の条件としては、菌株・菌液の分散状態・浮遊菌量及び培養日数等が関係してくると述べている。そこで著者は之等の方面からの探索を加味して次の実験を行つた次第である。

第2章 実験材料及び実験方法

第1節 実験方法

1) 実験動物

実験動物としては比較的入手し易い均一系マウス **dd** 系及び **NA₂** 系の雌マウスを用い、予め生後4週間、体重13g前後のマウスを室温23°Cの恒温室にて2週間前後飼育し、体重が

16~81gになるのを待つて、之を実験に供した。飼料は一定の混合飼料(小麦及び玉蜀黍を主とし之に乾燥魚粉、緑色野菜並に海草類等を加えたもの)を毎日1匹当り75g宛とし、水分補給は毎日新鮮なキャベツを細かく刻んで与えた。飼育箱はすべて1匹宛に区劃して使用した。

2) 接種結核菌株

当教室に於て継代培養して保存している有毒性人型結核菌 **H₃₇Rv** 株並びに黒野株を3~4週間グリセリン・ブイヨン培地に培養し其の菌膜を釣取使用した。

第2節 実験方法

1) 接種方法

前述せる有毒性人型結核菌 **H₃₇Rv** 株又は黒野株の菌膜を採取し滅菌濾紙で水分を除却した後秤量してめのうの乳鉢で磨碎し之に適当量の生理的食塩水を加え1cc中に適当量の菌量が浮遊する様に調製し、之の0.1ccを実験用マウスの尾静脈内に注射した。

2) 供試検体投与法

供試検体はすべて体重に比例した投与量を1日1回経口又は皮下注射によつて投与した。供試検体はすべて水溶液とし、水溶性でないものはアラビヤゴムで乳剤として投与した。経口投与の方法は注射針の太いものの先端を切断し適当な長さとしたものを注射筒にはめて強制的に胃内に注入した。皮下注射は背部皮下に行つた。尙非治療対照群には治療群と同じ方法で生理的食塩水を投与した。

3) 治療効果の判定

判定は生存率曲線と平均生存日数との総合判定により、**T50**は参考程度に止めた。観察期間中は全実験マウス死亡迄とし、毎日1回生死を調べ斃死マウスは毎回剖検して結核性病変の有無を確めた。体重は毎週1回測定して記録した。体重経過も後述する如く効果の判定に役立つも

のと思はれるが残存匹数が少くなると必ずしも治療効果と平行せず、判定には参考程度に止めることとした。

第3章 実験成績

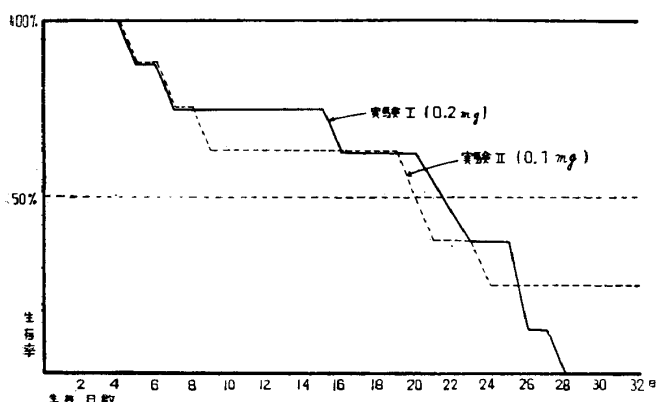
第1節 黒野株と H₃₇Rv 株との比較

菌株による感染性の比較実験を黒野株と H₃₇Rv 株について行つた。マウスは dd 系を使用した。最初の実験は H₃₇Rv 株について菌量 0.2mg 及び 0.1mg を尾静脈内に接種した。実験Ⅰ及びⅡは第1表に示す如く、予め調製した有毒性人型結核菌 H₃₇Rv 株の生理的食塩水浮遊液 (1mg/cc) の各 0.2cc 及び 0.1cc を尾静脈より接種して其のまま経過を観察した。其の成績は第1図の如く、生存率曲線を実験Ⅰは実線、実験Ⅱは点線を以て示した。実験Ⅰでは感染後28日目に 100%死亡しているが、実験Ⅱでは感染後32日でも75%しか死亡していない。又接種菌量に2倍量の差があるにも拘らず其の成績に大きな差が見られない。

第1表 実験群の編成

	動物数	体 重	接種菌量
実験Ⅰ	8	20g 前後	0.2mg
実験Ⅱ	8	13g 前後	0.1mg

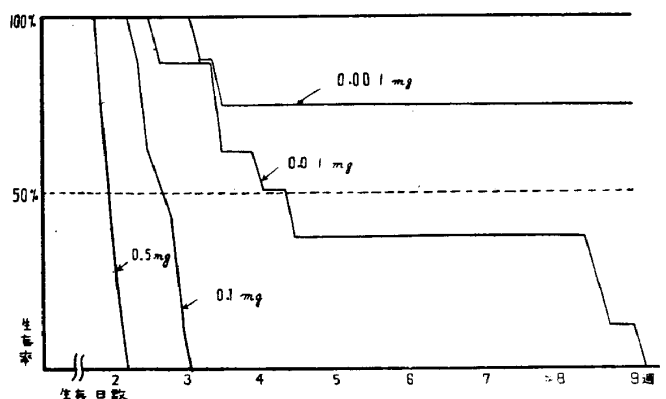
第1図 dd 系マウスに H₃₇Rv 株を静脈内感染せしめた場合の生存率



次に有毒性人型結核菌黒野株を使用して之の生理的食塩水浮遊液 (5mg/cc, 1mg/cc, 0.1mg/cc 及び 0.01mg/cc) を第2章に述べた方法で調製し之の各 0.1cc 宛を体重 16~18g の

dd 系マウスの尾静脈より接種し其のまま経過を観察した。之が実験Ⅲである。尚、マウスは各群8匹を以て1群とした。其の成績は第2図に示す如く 0.001mg/mouse の群では感染後9週後も25%しか死亡していない。又、0.01mg/mouse の群でも感染後9週余り経たない

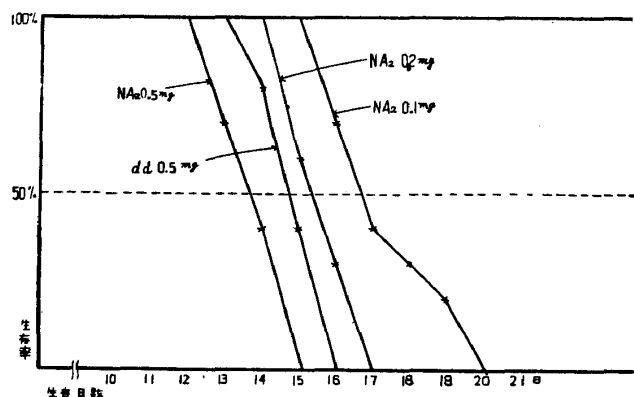
第2図 黒野株尾静脈内感染、dd 系マウスの生存率



と100% 死亡しない。之に反し 0.5mg/mouse 及び 0.1 mg/mouse の群では2~3週間のうちに 100%死亡している。従つて生存日数を指標として判定する screening test は此の位の菌量を以てするのが適当ではなかろうかと考へた。以上実験Ⅰ、Ⅱ及びⅢを比較検討して見るに、比較的短期間にしかも死亡し始めてから 100% 死亡する迄の期間の短い、即ち生存率曲線が急角度で直線的になる様な菌株の或る菌量が一番望ましいものであり、之は H₃₇Rv 株よりも黒野株の 0.1~0.5mg/mouse のあたりがよいのではないかと云う結果を得た次第である。

第2節 dd 系マウスと NA₂ 系マウスとの比較

マウスの系統による感受性の比較実験を黒野株を使用して dd 系と NA₂ 系マウスについて行つた。dd 系マウスは接種菌量 0.5mg/mouse NA₂ 系マウスは 0.5 mg/mouse, 0.2 mg/mouse 及び 0.1mg/mouse の3群合計4群、各群10の匹実験群を編成した。使用マウスは何れも体重16~18g の雌マウスである。其の成績は第3図及び第2表に示す如くであるがこの成績から次の結果を得た。

第3図 dd系マウス系マウスと NA₂系マウスとの比較

第2表 平均生存日数

dd 0.5mg	NA ₂ 0.5mg	NA ₂ 0.2mg	NA ₂ 0.1mg
12.3日	13.1日	14.9日	16.7日

1) 此の菌量の範囲内では両系統共11日以内に死亡するものは認められない。

2) 菌量 0.5mg では両系統共死亡し始めてから3日間で全部死亡し、其の死に方も畧々直線的であり、両系統の間に大きな差は認められない。

3) NA₂系では接種菌量 0.2mg と 0.1mg とでそれぞれ死亡期間は畧々菌量に比例して延長する様であるが、何れも感染後17日、20日には全部死亡し、黒野株に対する感受性の大きいことを示している。

4) 以上のことから NA₂系も dd系と共に抗結核剤治療実験に適するものであると言えよう。即ち、著者の実験成績では黒野株の様にマウスに強い毒性を発揮する結核菌株を使用すれば、一般に入手可能な均一系と言われるマウスで充分抗結核剤の screening test に利用し得ると考えられ、マウス側の条件よりは菌株側の条件の方が著者の目的とする実験にとって比重が高い様である。

第3節 黒野株, dd系で菌量の差による生存日数の比較

黒野株, dd系マウスを使用し、接種菌量を変えて 0.5mg から 0.1mg の間の菌量について其の接種後の生存日数を検討した。特に此の

間を採つたのは第1節実験Ⅲの成績を参考にしたためである。其の成績は第4図及び第3表に示す如くであるがこの成績から次の結果を得た。

1) 何れの菌量でも感染後19日以内に死亡している。

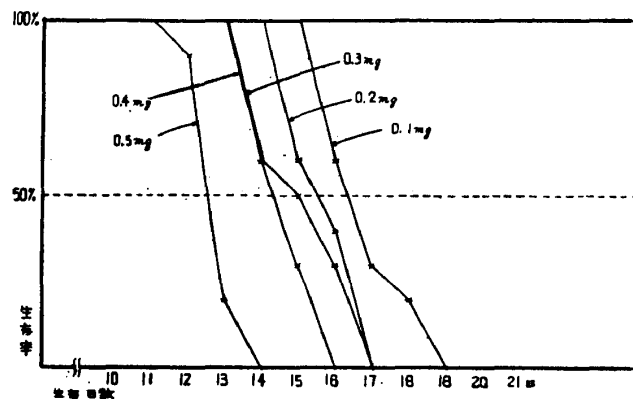
2) 菌量 0.5mg の場合は11日目から死亡し畧々直線的に、死に始めてから3日以内に全部死亡している。

3) しかし菌量を減らしても黒野株はやはり相当強い毒力を示し、菌浮遊液の菌分布も畧々平等になつている様に見られる。

4) 以上の成績から抗結核剤治療実験用の接種菌量は 0.5mg が適当と考え、著者は第2篇以下に述べる各種抗結核剤の治療実験には黒野株 0.5mgを用いる事とした。そして昭和32年5月から昭和33年7月までの過去約14ヶ月に行つた15回の実験で非治療対照群として用いたもののみを取り出して表にしたのが第4表である。感染後10日目から斃死し18日目には死亡率 100%を示して、T₅₀の平均は13.8日であり、其の毒力の均一なことが認められる。

以上の実験成績にもとづいて、著者は dd系マウスを用い之に黒野株 0.5mg を接種し、治効作用の明らかな SM, p-Aminosalicylic acid (PAS) 及び Isonicotinic acid hydrazide (INH) を投与して之等の抗結核性を比較検討した。

第4図 黒野株, dd系で菌量の差による生存日数の比較



第3表 平均生存日数

0.5mg	0.4mg	0.3mg	0.2mg	0.1mg
11.8日	13.9日	14.4日	15.0日	16.1日

第4表 黒野株 0.5mg 接種によるマウス生存日数

No. of Exp.	Date of infection	Strain of mice	Number of mice	Survival time in days			
				Dead range	25% dead	50% dead	100% dead
1	may 1957	dd	13	12~15	13.4	12.7	15
2	Jun. //	//	10	12~15	12.6	13.2	15
3	Jun. //	//	10	12~15	12.8	13.5	15
4	Jul. //	//	12	12~15	12.6	13.2	15
5	Jul. //	//	10	13~16	14.1	14.8	16
6	Jul. //	NA ₂	10	12~15	12.8	13.6	15
7	Aug. //	dd	10	11~14	12.2	12.6	14
8	Sep. //	//	10	13~16	13.8	14.5	16
9	Oct. //	//	10	13~16	13.3	13.7	16
10	Jan. 1958	//	10	14~18	14.8	16.0	18
11	Feb. //	//	10	12~14	12.0	12.6	14
12	Mar. //	//	8	12~15	12.7	13.3	15
13	Apr. //	//	10	13~17	14.1	15.0	17
14	May. //	//	10	14~17	15.3	16.2	17
15	Jul. //	//	10	10~14	11.2	12.2	14

第4節 SM, PAS 及び INH 単独投与の治療効果

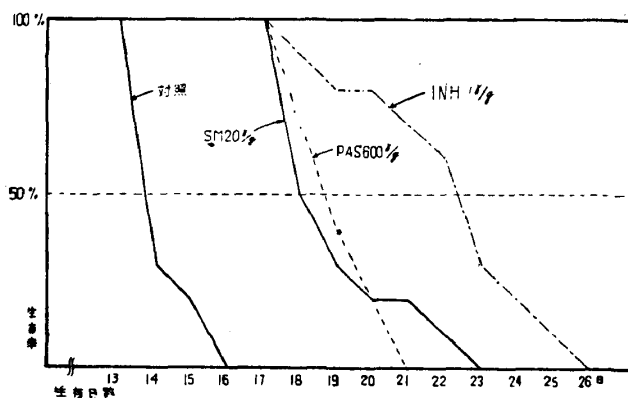
第2章に於て述べた方法で予め調製した有毒性人型結核菌黒野株の生理的食塩水浮遊液(5 mg/cc)を 0.1cc (0.5mg)宛既に述べた実験条件にて 1~2 週間飼育せる体重18g 前後の dd 系雌マウスの尾静脈内に接種した。各10匹を1群として4群を編成し、第1群は SM 20 r/g 毎日皮下注射、第2群は PAS 600 r/g 毎日経口投与、第3群は INH 1 r/g 毎日経口投与の各治療群とし、第4群を非治療対照群とした。治療は感染翌日から開始し治療群中の1群が半数死亡する迄続行し、全実験マウスが死亡する迄観察を行つた。体重測定は毎週1回行つて投薬量を体重に比例して決定した。実験群を表示すれば第5表の通りである。

成績は第5図及び第6表に示す如く、平均生存日数で見ても此の量では INH 治療群は SM 治療群に比し3.1日、PAS 治療群に比し 3.3日

第5表 実験群の編成

	動物数	治療の種類及投与量
第1群	10	SM 20r/g 毎日皮下注射
第2群	10	PAS 600r/g 毎日経口投与
第3群	10	INH 1r/g 毎日経口投与
第4群	10	対 照

第5図 SM, PAS 並に INH 単独投与による生存率



の延長を認めて居り、INH 治療群は SM 治療

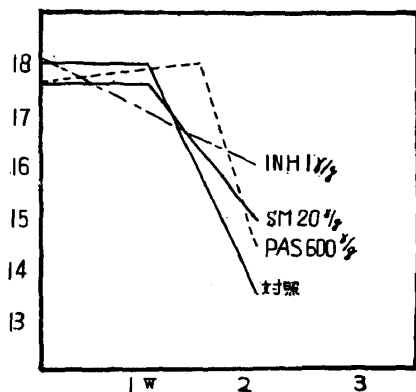
群, PAS 治療群より可成り優り, SM 治療群,

PAS 治療群の間には殆んど差が認められないが, 非治療対照群に比べると可成りの延命効果を示していることが観察された。更にここで興味のあるのは第6図で, 之は全身状態を窺う1つの資料である体重経過について各群の各週に於ける平均値を表にしたもので, 此の実験に於

第6表 平均生存日数

対 照	PAS600 $\frac{1}{2}$	SM20 $\frac{1}{2}$	INH $\frac{1}{2}$
3.5日	18.1日	16.3日	21.4日

第6図 体重経過



いては SM, PAS, INH の治療効果を表わす生存率曲線と体重経過殊に第2週目に於ける各群体重平均値の相互の間には1連の有意の関係が見出される様に思われる。従つて此の体重経過は今後の実験成績の判定の際参考とする事にした。しかし既に著者が述べた如く, 残存匹数が少くなつた場合は必ずしも治療効果と平行関係を示すものではないことは当然予想されるところであり, 著者の行つた数多くの実験でも之を認めている。

第4章 総括及び考按

抗結核剤の “*in vivo*” に於ける screening test に於ては感染に使用する菌株の毒力が強いこと, 更に使用する動物の感染性が高く比較的短日数の間に死亡して一定した実験成績を示すことが必要である。Mckee等⁶⁾はマウスの実験的結核症に牛型結核菌 Ravenel 株を用いて経静脈感染させた場合, 感染後35日以内に99%

が死亡し, 其の平均 T_{50} は 19.8日であつたと述べている。又, American Trudeau Society¹¹⁾ の発表した方法では $H_{37}Rv$ 株で均一 CF_1 系マウス18~20gに対し2~3週間表面培養菌の湿潤菌量 (moist weight) 0.1~0.2mg 静注で16~28日間のうちに大多数が斃死することを記載している。しかし著者は第2章第1節の実験成績から $H_{37}Rv$ 株よりも黒野株の方が望ましい結果を得られることを証明した。更に著者は其他の実験成績から, 黒野株 0.5mg を用いて入手容易な dd 系マウスを使用して数多くの実験で短期間中に 100%斃死することを観察した。(第4表)そこで著者の方法で毒力の比較的安定な黒野株を用い入手容易な均一系のマウスで比較的小規模且つ短期間に被検物質の抗結核性を判定することを企て, 第2篇以下に述べる様な各種抗結核剤の治療効果の比較実験を行つた次第である。治療効果の判定については多くの研究者は生存率殊に T_{50} を指標とする方法を推奨している様であるが, 著者は此の方法は半数死亡後の生存率曲線の推移如何によつて必ずしも妥当ではないのではないかと考え, 染谷等¹³⁾や Hobby 等¹⁵⁾の報告にある様に平均生存日数を主として判定の一助とし, 生存率曲線と之との総合判定によつて治療効果の判定を行う様にした。そして出来得る限り長期間観察して全実験マウスが死亡する迄観察を継続した。極めて長期間にわたり猶生存する場合はあれば, 之は剖検して臓器定量培養を行い生菌数を比較検討した。しかし screening test の理想とする短期間に於ける治療効果の傾向の判定を急ぐ場合は T_{50} を比較して早期判定の一助とすることも出来る。

供試検体の投与方法については経口並びに皮下注射により投与方法をとつたが, それぞれの投与方法にて特に著しい効果を示す薬剤についてはそれぞれ経口投与又は皮下注射によつて行はねばならないのは勿論であらう。

投与期間は Malone等¹⁰⁾, Solotorovsty等¹⁷⁾は対照群の半数が死亡する迄続ける方法を採用しているが, 抗結核剤は元来殺菌作用と云うよりも主として静菌作用を示す面が主であるの

で、かかる薬剤の場合は薬剤投与の中止と同時に死亡率を高める結果を生ずることも考えられる。従つて少く共、比較している治療群の中の一団が半数死亡する迄は投与を継続する方がいいのではないかと考へ、著者は此の方法を採用した。

第5章 結 論

抗結核剤の動物実験的研究に於ける **screening test** の一方法として、マウスに結核菌を尾静脈より接種して後急速に進展するマウスの実験的結核症を対象として化学療法実験を行う方法を採り上げ、接種する菌株はどの菌株でどの菌量が適当であるか、又使用するマウスの系統による感受性の差違はどうか等の問題を上述の基礎的実験によつて比較検討した。

著者が行つた実験成績から有毒性人型結核菌黒野株が $H_{37}Rv$ 株より毒力の点に於いて優れて居り、殆んど常に一定の成績を示す事を知つたので、此の黒野株を用いての実験成績から次の方法を抗結核剤の動物実験的研究に於ける **screening test** の一つの方法として採り上げた。即ち、黒野株を3～4週間グリセリン・ブイヨン培地に培養して此の湿潤菌量 0.5 mg を 1cc の生理的食塩水に浮遊させ其の 0.1cc (0.5 mg) を予め一定の実験条件に飼育した 16～18 g の dd 系雌マウスの尾静脈内に静注して、感染の翌日から薬剤を体重に比例して投与した。薬剤投与は治療を加えた群の何れか一つの群の半数が死亡する迄継続し、全実験マウスが死亡する迄観察し、治療効果の判定は其の生存率曲線と平均生存日数との総合判定によつた。以上の実験方法で治効作用の明らかな SM 20r/g, PAS 600r/g, INH 1r/g 単独投与時の治療効果について検討を行い、此の量では INH は SM, PAS に比べて可成り優り、SM 及び PAS は同程度の治療効果を示した。以上の結果より著

者の選んだ実験方法は抗結核剤の **screening test** の簡便法として利用の価値あるものと考ええる次第である。

(欄筆に臨み終始懇切な御援助を戴いた前川助教授、種々便宜を与えられた済生会中津病院院長間島博士、内科医長鷹谷博士、清水博士並びに同僚各位、実験推進に御協力を戴いた塩野義研究所西村博士並びに中島清氏に深く感謝する。)

文 献

- 1) Feldman and Hinshaw : Am. Rev. Tbc., 51, 6 (1945)
- 2) Dessau, Yeager and Kulish : Am. Rev. Tbc., 60, 2 (1949)
- 3) 長谷川秀治 : 化療研彙報第1巻 第3号 (103頁) (1947)
- 4) 岡・柳原等 : 日本臨床第4巻 第11号 (674頁) (1946) 日本臨床結核第7巻 第2号 (1948)
- 5) Raleigh and Youmans : J. Infect. Dis., 82, 197, 1948
- 6) Mckee and Rake : Am. Rev. Tbc., 60, 90, 1949
- 7) 岩崎・小川等 : 結核, 24, 6, 173, 昭24
- 8) Youmans, G. P., et al : Am. Rev. Tbc., 52, 432, 1945
- 9) 柳沢謙 : 結核の臨床, 2, 601, 昭29
- 10) G. Ceriotti : Am. Rev. Tbc., 69, 104, 1954
- 11) American Trudeau Society : Am. Rev. Tbc., 61, 274, 1950
- 12) 水之江公英 : 日本細菌学雑誌, 7, 3, 195
- 13) 染谷四郎他 : 日本臨床結核, 15, 1, 28 (1956)
- 14) 柴田等 : 日本細菌学雑誌, 9, 8, 671, 1954
- 15) Hobby, G. L. et al : Am. Rev. Tbc., 63, 17, 1951
- 16) Malone et al : Am. Rev. Tbc., 65, 511, 1952
- 17) Solotorovsty et al : Am. Rev. Tbc., 70, 806, 1954