

INH, INH 誘導体及び之を中心とする併用療法 に就てのマウスの治療実験

〔第2編〕 マウス結核症に於ける INH-Sulfisoxazole 併用の INH
耐性獲得に及ぼす影響

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

辻 野 博 之

（受付昭和33年12月20日）

〔内 容 抄 録〕

有毒性人型結核菌黒野株を感染せしめた結核マウスの肺及び脾に於ける INH 耐性菌の発現状況を、INH を単独投与した場合と之に SI を併用した場合とについて、マウスの接種菌量、INH の投与量及び投与期間を変えて比較検討して次の結果を得た。

1) INH の単独投与時に於ける肺及び脾内の結核菌の INH 耐性上昇は3週治療では著明ではないが、6週及び9週の治療に於いては $10\gamma/\text{cc}$ の不完全耐性を示したものが相当数観察された。

2) 耐性の発現状況を接種菌量について比較すると、菌量が多いと耐性菌の出現が著明となる傾向があることを部分的に認めたが、薬剤の投与量が INH $1\gamma/\text{g}$ と INH $2\gamma/\text{g}$ とでは投与量による耐性発現の相違は観察されなかつた。

3) 投与期間の耐性獲得に及ぼす影響は、肺に於いては長く治療した場合に耐性の上昇が著明となる傾向が観察されたが、脾に於いては寧ろ逆に9週治療の方が6週治療より耐性菌の出現が少ない成績を得た。

4) SI がマウスの肺及び脾内の結核菌の INH 耐性の上昇を抑制する効果については、INH の投与量を $2\gamma/\text{g}$ とし、之に SI $20\gamma/\text{g}$ を併用した場合に相当程度に耐性菌の出現が抑制され、併用効果が認められた。

第1章 緒 論

Sulfisoxazole (SI) が Isoniazid (INH) の耐性獲得を遅延せしめ或は抑制する効果があることは伊庭¹⁾、東村²⁾ 等の試験管内実験に於て認められている所であるが、この点に関する動

物実験についてはその報告は甚だ少ないようである。

一方、実験的結核症において、動物に化学療法剤を投与した場合の耐性菌の出現は一般に少ないものと云われている。然しながら、マウスの実験的結核症に対しては Williston & Youmans³⁾ 等、神津⁴⁾ 等、北本⁵⁾ 等 及び安田⁶⁾ の如く耐性菌を認めた報告があり、更に牛場⁷⁾、手塚⁸⁾、岩下⁹⁾、小川¹⁰⁾ 等は何れも北研水之江¹¹⁾ 等によつて分離された黒野株を用いての実験で比較的短期間に耐性菌の出現を認めたと報告している。

著者は第1編に於て黒野株を感染せしめた結核マウスの生存日数に及ぼす INH・SI 併用の治療効果を検討したが、之に続いて INH と SI の併用が動物体内に於ける結核菌の INH 耐性獲得に及ぼす影響を、同様に黒野株を接種感染せしめたマウスについて検討した。又同時に諸種の実験条件が生体内に於ける結核菌の INH 耐性出現に及ぼす影響を観察する為に夫々 INH の投与量及び投与期間、マウスの接種菌量を変えた場合に於ける結核マウスの臓器内菌の耐性について検討したので、その結果を報告する。

第2章 実 験 方 法

1. 供試結核菌株

第1表に示されるマウスの臓器より分離培養したものを使用した。即ち、体重 17g 前後の

dds 系雌マウス144匹を選び、第1編に於いて述べたと同様の方法で有毒性人型菌黒野株 (INH 0.1r/cc 含有の1% KH_2PO_4 培地にて発育阻止) の0.1mg, 0.01mg 及び 0.001mg を静脈内に接種し、その各々を INH 1r/g 単独投与群 INH 1r/g+SI 10r/g 併用群, INH 2r/g 単独投与群及び INH 2r/g+SI 20r/g 併用群の12匹宛の12群に分ち、感染翌日より連日経口投与により治療を開始し、各治療群は夫々4匹宛

第1表 実験群編成

治療方法 及び投与量	治数 療(週) 日	接 種 菌 量 (黒野株)		
		0.1mg	0.01mg	0.001mg
INH 1r/g	3	4	4	4
	6	4	4	4
	9	4	4	4
INH 1r/g + SI 10r/g	3	4	4	4
	6	4	4	4
	9	4	4	4
INH 2r/g	3	4	4	4
	6	4	4	4
	9	4	4	4
INH 2r/g + SI 20r/g	3	4	4	4
	6	4	4	4
	9	4	4	4
動 物 数				

を3, 6, 9週後に投薬を中止して一週間無処置の儘放置した後、屠殺剖検し、肺及び脾内の結核菌について1% KH_2PO_4 培地にて6週間定量培養したものを使用した。

尚、定量培養の成績は第2及び第3表に示される如く、マウスの接種菌量が0.01mg ないし0.001mg の場合において、肺の菌数は INH 2r/g 単独投与群とこれに SI 20r/g を併用した群を比べると、6週及び9週治療において併用群は単独群よりかなり少いようであり、脾臓に於ても同じく接種菌量が0.01mg ないし0.001mg で投薬量が INH 2r/g 単独投与と之に SI 20r/g を併用した場合に6週治療群の間

に併用効果が観察されるのである。

2) 耐性培地

1% KH_2PO_4 培地を用い、INH を0.1r/cc, 1r/cc, 10r/cc の割合に含む培地を調製した。

第2表 臓器定量培養成績 (INH 単独)

投薬 日数	治療 群	接種菌株 及び 菌量	黒 野 株					
			0.1mg		0.01mg		0.001mg	
			肺	脾	肺	脾	肺	脾
3	INH 1r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
			+++	+++	+++	+++	+++	+++
	INH 2r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	INH 1r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
			+++	+++	+++	+++	+++	+++
	INH 2r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	INH 1r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
			+++	+++	+++	+++	+++	+++
	INH 2r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
週	INH 1r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
			+++	+++	+++	+++	+++	+++
	INH 2r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
週	INH 1r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++
			+++	+++	+++	+++	+++	+++
	INH 2r/g		+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : 培地全面に菌発育を認めるもの
++ : 培地面1/4以上1/2以内に菌発育を認めるもの
+ : 培地面1/4以内に菌発育を認めるもの
(1% KH_2PO_4 培地に各臓器の0.2% 苛性ソーダ液の10倍稀釈液 0.1ccを加えたもの)

3) 菌 接 種

前述の如く培養した菌集落中より菌塊をとり小川氏肉厚コルベンで約1分間磨碎し、生理的食塩水を入れて略々平等な菌浮游液を作り、約15分間放置して粗大な菌塊を沈め、その上清から約1mg/ccの菌液を作製し、培地1本宛にその0.1ccを接種した後37°Cの孵卵器に於いて培養し、4週後にその発育状態を観察した。

4) 成 績 判 定

判定基準はコロニー数約100個迄は、すべてコロニー数を計算し(+), コロニー多数で数えられないものを(++), それ以上のコロニー数が甚だ多数で数え切れないものを(+++)とした。

但し本編に於いては記述の煩雑を避ける為、

菌の分離が出来なかつたので比較の対象より除外した。比較は総て同一条件のものについて行い、半数以上に差を認めるものを採つた。

第4表 肺臓内菌の INH 耐性 (完全耐性)

▲ $10\gamma(+)$ ● $1\gamma(+)$ △ $0.1\gamma(+)$ ○ $0.1\gamma(-)$

対照培地(0r/cc)と同等の菌発育を認めるもの(完全耐性)と対照培地に比して劣る発育を示すもの(不完全耐性)とについて第2～5表に示される如き略号をもつて表現した。

第3章 實驗成績

尚、接種菌量 0.1mg, INH の投与量 1g の治療群は6週迄に大部分が死亡し臓器よりの

第5表 肺臓内菌の INH 耐性 (不完全耐性)

● $10\gamma(+)$ $\triangle$ $1.0\gamma(+)$ $\bigcirc$ $1.0\gamma(-)$

1 INH 単独投与群について

A 肺内結核菌の INH 耐性獲得の状況

第4及び第5表に示される如くであるが、3週治療の各群に於ける INH 耐性獲得は何れも著明でないので6週及び9週治療の場合について検討した。

まず薬剤の投与量即ち INH 1 γ /g と INH 2 γ /g とについて比較すれば、接種菌量及び投与期間の何れについてみても特に著明な差は観察されなかつた。

接種菌量について比較すると INH 1 γ /g 投与の場合、6週治療に於いて 0.01mg 接種は 0.001mg 接種に比して、耐性獲得が著明であり、又9週治療に於いて INH 2 γ /g 投与の場合、0.1mg 接種は 0.01mg 及び 0.001mg 接種に比して耐性獲得が少々著明である。即ち著者の条件では治療期間が同一であれば、接種菌量の多い群の方に耐性獲得が強くと見られると云う成績である。

投与期間について見ると、INH 1 γ /g 投与の場合 0.01mg 接種に於いて、又 INH 2 γ /g 投与の場合 0.1mg 接種に於いて、何れも9週治療は6週治療に比して少々耐性の上昇が著明である。

つまり、INH の投与量 及び 接種菌量が一定であれば投与期間が永い程耐性獲得の上昇が著明である成績が見られた。

B 脾内結核菌の INH 耐性獲得の状況

第6及び第7表に示される如くであるが、3週治療の各群に於ける耐性獲得の状況は INH 2 γ /g 投与の場合に若干の耐性上昇がみられるが、その他の場合に於いては耐性菌の出現はみられなかつた。6週及び9週治療の各群について検討すると INH の投与量が 1 γ /g と 2 γ /g の場合、接種菌量及び投与期間の何れについてみても特に耐性菌の出現に差を認め難い。

接種耐量について比較すると INH 2 γ /g 投与の9週治療に於いて 0.1mg 接種は 0.001mg 接種に比べて耐性の上昇がやや著明である。

投与期間については INH 1 γ /g の投与の場合 0.001mg 接種に於いて9週治療は6週治療に比して耐性獲得の程度が低いようである。

第6表 脾臓内菌の INH 耐性 (完全耐性)

投 薬 日 数	接 種 菌 株 及 び 菌 量 治 療 群	黒 野 株		
		0.1mg	0.01mg	0.001mg
3 週	INH 1 γ /g	○ ○ ○ ○	△ △ ○ ○	△ △ ○ ○
	INH 1 γ /g+SI 10 γ /g	△ ○ ○ ○	△ ○ ○ ○	△ △ ○ ○
	INH 2 γ /g	△ ○ ○ ○	△ △ △ ○	△ △ △ ○
	INH 2 γ /g+SI 20 γ /g	△ ○ ○ ○	△ △ ○ ○	○ ○ ○ ○
6 週	INH 1 γ /g	△	△ △ △ ○	△ △ △ △
	INH 1 γ /g+SI 10 γ /g	△ △ △	△ △ △ △	△ △ △ △
	INH 2 γ /g	△ △ △	△ △ △ ○	△ △ △ △
	INH 2 γ /g+SI 20 γ /g	△ △ ○ ○	△ △ △	△ △ △ ○
9 週	INH 1 γ /g		△ △ △	△ △ △ ○
	INH 1 γ /g+SI 10 γ /g	△	△ △ ○ ○	△ △ ○ ○
	INH 2 γ /g	△ △ △ △	△ △ △ ○	△ △ ○
	INH 2 γ /g+SI 20 γ /g	△ △ ○ ○	△ △ △ △	△ △ △ ○

▲ 10 γ (+) ● 1 γ (+) △ 0.1 γ (+) ○ 0.1 γ (-)

第7表 脾臓内菌の INH 耐性 (不完全耐性)

投 薬 日 数	接 種 菌 株 及 び 菌 量 治 療 群	黒 野 株		
		0.1mg	0.01mg	0.001mg
3 週	INH 1 γ /g	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
	INH 1 γ /g+SI 10 γ /g	○ ○ ○ ○	● ○ ○ ○	● △ △ ○
	INH 2 γ /g	● ○ ○ ○	△ ○ ○ ○	● ○ ○ ○
	INH 2 γ /g+SI 20 γ /g	○ ○ ○ ○	● △ △ △	△ ○ ○ ○
6 週	INH 1 γ /g	○	● ● △ ○	● ● ● △
	INH 1 γ /g+SI 10 γ /g	● ● ●	● ● ● △	● ● ● ○
	INH 2 γ /g	● ● ●	● ● ● △	● ● △ △
	INH 2 γ /g+SI 20 γ /g	● △ △ △	● ● △ ○	● ● △ ○
9 週	INH 1 γ /g		● △ △	● △ △ △
	INH 1 γ /g+SI 10 γ /g	△	● ● △ △	△ △ △ ○
	INH 2 γ /g	● ● ● △	● ● △ ○	△ △ ○
	INH 2 γ /g+SI 20 γ /g	△ △ △ ○	● ● △ ○	△ △ △ ○

● 10 γ (+) △ 1 γ (+) ○ 1 γ (-)

2 SI の INH 耐性獲得に及ぼす効果

A 肺内結核菌について

3週治療の場合には INH 単独投与及び之に

SI を併用した場合の何れにおいても耐性菌の出現は著明でなく、従つて併用投与の影響も観察されなかつた。6週治療に於いてはかなりの耐性菌が出現しているが、INH に SI を併用した場合と INH 単独投与の場合と比較して耐性上昇の差は著明ではない。

9週治療に於いては INH 2r/g 投与の接種菌量 0.1mg, 0.01mg, 0.001mg の各群に於いて、SI を併用した場合に INH 耐性出現が抑制されているようである。

B 脾内結核菌について

3週治療に於いては INH 耐性獲得に及ぼす SI の効果は観察されなかつた。6週治療に於いては接種菌量 0.1mg 及び 0.01mg で INH 2r/g と SI 20r/g の併用群に於いて耐性獲得阻止が若干みられるようであり、9週治療に於いても INH・SI 併用群で接種菌量 0.1mg INH 2r/g 投与の場合に、INH 単独投与群に比べて耐性出現を少々抑制しているようである。

第5章 総括並に考按

以上の実験成績を総括すると、INHを単独投与した場合の結核マウスの臓器内菌の INH 耐性の発現状況は、INH 1r/g 及び INH 2r/g の投与に於いては3週治療の場合は肺及び脾の何れに於いてもその発現は著明でなく、6週及び9週治療に於いて可成りの例に 10r 不完全耐性がみられたが、完全耐性で 1r を認めたものは肺に於ける1例のみであつた。INH 耐性の出現状況を投与量及び投与期間、接種菌量について比較すると一定条件の下に於いては、投与量の差即ち INH 1r/g と INH 2r/g とでは耐性獲得に特に差は見られないが、接種菌量及び投与期間に於ては一部にある程度の差が観察された。即ち INH 1r/g 投与の場合、肺に於いては6週治療では接種菌量 0.01mg は 0.001mg より耐性菌の出現が著明であり、又接種菌量 0.01mg に於いては9週治療より、又脾臓では 0.001mg 接種に於いては6週治療は9週より耐性菌が多く検出され、INH 2r/g 投与では肺及び脾において接種菌量 0.1mg 9週治療の場合に最も著明な耐性上昇がみられた。

SI の INH 耐性獲得阻止効果は肺に於いては INH 2r/g と之に SI 20r/g を併用した群との9週治療に於いて、又脾臓に於いては INH 2r/g と之に SI 20r/g を併用した群の 0.1mg 接種の6週及び9週に於いて観察された。

マウスの実験的結核症に INH を投与して耐性菌の出現を検討した実験報告によれば、Karlsn & Kemi¹³⁾ は H₃₇Rv 株を接種し、55日間治療を行つたが耐性菌を認めなかつた。北本等⁷⁾ は H₃₇Rv 株の 0.1mg を接種したマウスに INH を 0.15mg 乃至 0.75mg 宛、2～4カ月治療して27検体中2例に 10r 耐性を認めており、神津等⁶⁾ は陸F株、安田⁸⁾ はF株を用いて実験しているが、7週迄の治療では何れも耐性菌を認めていない。

一方、北研水之江¹²⁾ によつて分離された有毒性人型結核菌黒野株を用いた小川等^{3) 4)} 及び岩下¹¹⁾ の報告によれば、接種菌量 0.1～0.5mg にて感染せしめた場合、INH 0.04mg～0.2mg を3～5週間投与することによつて著明な耐性菌が得られているようである。著者の実験成績に於いては3週治療では、著明な耐性の獲得はみられなかつたが、6週及び9週治療に於ては相当数の耐性菌の出現を認めた。その発現の程度の相違は彼我の実験条件、就中直接法と間接法のちがいがあり比較は困難である。

接種菌量が耐性獲得に及ぼす影響についての小川等¹⁴⁾ の報告によれば、黒野株を 0.5mg, 0.1mg, 0.01mg と3段階にわけて接種したマウスに INH 0.2mg 宛を3週及び5週治療し、肺により直接法で耐性検査を行つた結果、接種菌量の多いもの程耐性の出現が著明であつたとしている。

手塚等¹⁰⁾ の黒野株接種マウスの Streptomycin (SM) に対する耐性獲得についての実験成績も略々同様の結果を認めている。

著者の実験成績に於いても、一部のマウスの死亡の爲全体に亘つて観察されなかつたが、その傾向が観察されるようである。

投与薬剤の量と期間の影響については、Yomans 等¹⁵⁾ 及び手塚等¹⁰⁾ の SM に関する報告では投与量が多く、且投与期間の長い程耐性の

上昇が著明であるとしているが、著者の実験成績に於いては、投与量の差による耐性発現の状況には特に影響が認められなかつた。之は、INHの量が 1r/g と 2r/g とであり、投与量の差が少かつた為とも考えられる。

投与期間については肺に於いては投与期間が長い程、耐性例が多い成績が観察されたが、脾臓において菌量が少い場合には却つて投与期間が長いものに耐性菌の出現が少いと云う結果を得た。この成績を第2表に於ける肺及び脾についての定量培養の成績と比較してみると、肺に於ける生菌数が9週治療にては6週治療に比して著明な差が観察されないのに反し、脾臓にては特に接種菌量の少い場合に9週に於いて著明に生菌数が減少している事に関係しているようである。

之は牛場等⁹⁾の推察している耐性菌の出現と臓器内の菌の増殖の程度が平行すると云う考えと矛盾しない成績であつたと云えよう。

又、6週治療に於ける脾臓内の結核菌の中にINH耐性菌がかなり著明に発現した事は、牛場等⁹⁾及び手塚¹⁰⁾のSMについて得た成績と若干の相違があるようであるが、脾臓内の結核菌に関するINH耐性の推移については報告がみられないので比較は困難である。

併し、小川等¹⁰⁾は Viomycin についてのマウスの実験に於いて、6週間の治療で肝臓内の結核菌にかなりの耐性が認められた事を報告しており、薬剤に対する各臓器中の結核菌の耐性獲得の態度は必ずしも一様ではないように思われる。

以上のことを要約すれば、マウスの臓器内のINH耐性菌の出現は菌の増殖がかなり盛んに行われる環境下に於いて、薬剤が充分に菌と接触するような場合に著明なのであろう。

INHの耐性獲得がINHにSIを併用する事によつて抑制されることは既に伊庭¹⁾、東村²⁾等の試験管内実験に於いて認められ、動物実験に於いても小川等⁴⁾の黒野株接種マウスに於ける実験によつても耐性獲得が遅延せしめられる事が認められている。

著者の実験に於いても総てのマウスに於て観

察されたのではないが、著者の実験条件に於ける比較的薬剤の投与量が多く、且治療期間の長いところで併用効果が観察されるようである。

第5章 結 語

黒野株を感染させた結核マウスの肺及び脾内に於けるINH耐性菌の発現状況をINHを単独投与した場合と之にSIを併用した場合とについて、マウスの接種菌量、INHの投与量及び投与期間を変えて比較検討して次の如き実験成績を得た。

1) INHの単独投与時に於ける肺及び脾内の結核菌のINH耐性上昇は3週間の治療では著明ではないが、6週及び9週の治療に於いては10rの不完全耐性を示したものが相当数観察された。

2) 耐性の発現状況を接種菌量について比較すると、菌量が多いと耐性菌の出現が著明となる傾向があることを一部に於いて認めたが、投与薬剤の量がINH 1r/g とINH 2r/g とでは投与量による耐性発現の相違は観察されなかつた。

3) 投与期間の耐性獲得に及ぼす影響は、肺に於いては長く治療した場合に耐性の上昇が著明となる傾向が観察されたが、脾臓に於いては寧ろ逆に9週治療の方が6週治療より耐性菌の出現が少い成績を得た。

4) SIがマウスの肺及び脾内の結核菌のINH耐性の上昇を抑制する効果については、INHの投与量を2r/gとしこれにSI 20r/gを併用した場合に肺及び脾に於いて相当程度に耐性菌の出現が抑制され、併用効果が認められるようである。

(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、内科医長瀧谷博士、清水博士並に同僚各位、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) 伊庭：京大結研紀要 6, 13 (昭32)
- 2) 東村他：J. Antibiotics Ser. B, 9, 409 (1955)
- 3) 小川他：文部省科学研究費結核研究化学療斑報告

(昭31,11)

- 4) 小川他：同上(昭32, 5)
- 5) Elizabeth H. Williston & Guy P. Youmans
; Am. Rev. Tbc, 62, 156, 1950
- 6) 神津他：医療, 7, 436, (1953)
- 7) 北本他：結核, 29, 133 (昭29)
- 8) 安田：結核, 30, 89 (昭30)
- 9) 牛場他：結核, 30, 114 (昭30)
- 10) 手塚：結核, 31, 17 (昭31)
- 11) 岩下：結核, 32, 489 (昭32)
- 12) 水之江：日細誌, 7 : 3 195—197 (昭27)
- 13) Alfred G. Kalson & I.Kemi : Proc. Staff
Meet. Moyo Clinic, 27, 373, 1952
- 14) 小川他：文部省科学研究費結核研究班報告, 昭和
32年10月
- 15) Youmans et al : 結核研究の進歩, 22, P, 33よ
り引用
- 16) 小川：同上より引用